

DEPARTAMENT D'ANATOMIA I EMBRIOLOGIA  
HUMANA

INFLUENCIA DE LA RUTA HEDGEHOG-GLI EN TUMORES  
GLIALES.

MARÍA PERIS CELDA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Servei de Publicacions  
2011

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 25 de febrer de 2011 davant un tribunal format per:

- Dra. Amparo Ruiz Torner
- Dr. Francisco Sánchez del Campo
- Dr. Alberto Prats Galino
- Dr. Francisco Doñate Oliver
- Dr. Luis Estañ Yago

Va ser dirigida per:

Dr. Ángel Ayuso Sacido

Dr. Jose Manuel García Verdugo

Dr. Francisco Martínez Soriano

©Copyright: Servei de Publicacions  
María Peris Celda

---

Dipòsit legal: V-494-2012

I.S.B.N.: 978-84-370-8143-4

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

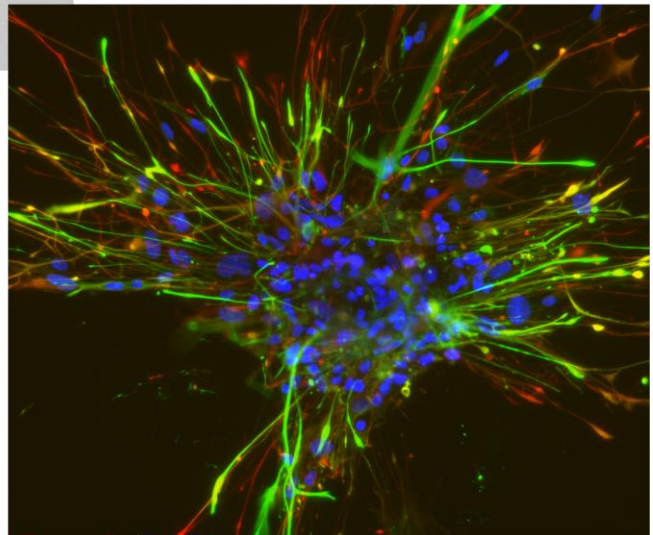
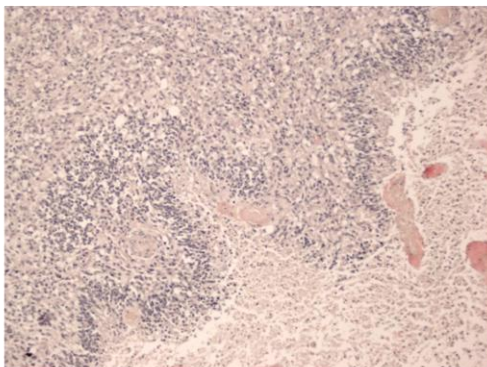
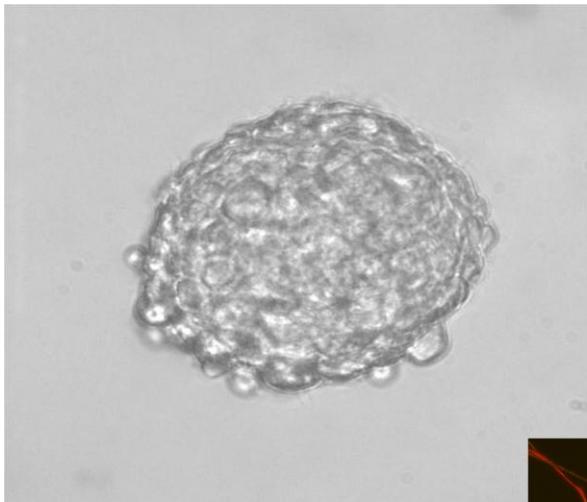
Telèfon:(0034)963864115

# Influencia de la ruta Hedgehog-Gli en tumores gliales

PROGRAMA DE DOCTORADO EN NEUROCIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

PROYECTO DE TESIS DOCTORAL



**MARÍA PERIS CELDA<sup>\*</sup>, <sup>\*\*</sup>**

**Directores: Ángel Ayuso-Sacido<sup>\*\*</sup>, Jose Manuel García-Verdugo <sup>\*\*</sup>, Francisco Martínez-Soriano<sup>\*\*\*</sup>**

**Departamento de Neurocirugía, Hospital La Fe, Valencia<sup>\*</sup>**

**Departamento de Morfología Celular, Centro de investigación Príncipe Felipe, Valencia<sup>\*\*</sup>**

**Departamento de Anatomía y Embriología Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia<sup>\*\*\*</sup>**

# Influencia de la ruta Hedgehog-Gli en tumores gliales

PROGRAMA DE DOCTORADO EN NEUROCIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

PROYECTO DE TESIS DOCTORAL



**MARÍA PERIS CELDA\*, \*\***

**Directores:**

**Ángel Ayuso-Sacido\*\*, Jose Manuel García-Verdugo\*\*, Francisco Martínez-Soriano\*\*\***

**Tutor:**

**Francisco Martínez-Soriano\*\*\***

**Departamento de Neurocirugía, Hospital La Fe, Valencia\***

**Departamento de Morfología Celular, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia\*\***

**Departamento de Anatomía y Embriología Humanas, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia\*\*\***

El Dr. Ángel Ayuso-Sacido investigador del Departamento de Morfología Celular del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia, el Dr. Jose Manuel García-Verdugo catedrático de Biología Celular de la Universidad de Valencia y director del laboratorio de Morfología Celular del Centro de Investigación Príncipe Felipe y el Dr. Francisco Martínez-Soriano, catedrático del Departamento de Anatomía y Embriología Humanas en su calidad de directores del trabajo de Tesis Doctoral

HACEN CONSTAR,

Que el presente trabajo titulado “Influencia de la ruta Hedgehog-Gli en tumores gliales” ha sido realizado bajo nuestra dirección por la Lda. D<sup>a</sup> María Peris Celda en el laboratorio de Morfología Celular del Centro de Investigación Príncipe Felipe y en el Hospital Universitario la Fe de Valencia.

Que a nuestro entender el trabajo reúne los requisitos suficientes de experimentalidad, originalidad e interés clínico y científico como para ser presentado y defendido como trabajo de Tesis Doctoral.

Y para que así conste, firmamos la presente en Valencia a diez de noviembre de 2010.

Dr. Ángel Ayuso-Sacido

Dr. Jose Manuel García-Verdugo

Dr. Francisco Martínez-Soriano

## ÍNDICE

**1. Prólogo...7**

**2. Agradecimientos...8**

**3. Abreviaturas...9**

**4. Introducción...12**

4.1 Los tumores gliales...13

4.2 Las células madre neurales y tumorales y su relación con la ruta Hedgehog-Gli...14

4.3 La ruta Hedgehog-Gli: descripción en *Drosophila* con importantes variaciones en vertebrados...15

4.4 La ruta Hedgehog-Gli en el desarrollo embrionario y postnatal...17

4.5 Implicaciones de la ruta Hedgehog-Gli en enfermedades humanas...19

4.6 La ruta Hedgehog-Gli y neoplasias no cerebrales...21

4.7 La ruta de Hedgehog-Gli y los tumores cerebrales...22

4.8 Nuevas perspectivas en el tratamiento de los tumores cerebrales: inhibición de la ruta Hedgehog-Gli...26

**5. Objetivos...31**

**6. Material y métodos...33**

6.1 Tratamiento de las muestras...34

6.2 Cultivo de células primarias de GBM...34

6.3 Extracción de RNA y síntesis de cDNA...34

6.4 PCR y QRT-PCR...35

6.5 Ensayos de diferenciación...35

6.6 Tinción con hemaxilina-eosina...35

6.7 Análisis de datos...36

## 7. Resultados...37

- 7.1 Diseño y validación de primers específicos de intermediarios de la ruta Hh-Gli...38
- 7.2 Anatomía patológica...40
- 7.3 Análisis conjunto de expresión de intermediarios de la ruta Hh-Gli mediante QRT-PCR...43
- 7.4 Análisis específico de la expresión de intermediarios de la ruta Hh-Gli mediante QRT-PCR...44
  - Niveles de expresión de Patch y Smo
  - Los efectores de la ruta: Gli1 y Gli2
  - Sufu, regulador
  - CD133
  - Homólogos de Cos2
- 7.5 Las recidivas, un modelo in vivo para estudiar la evolución del tumor en el cerebro humano...51
- 7.6 Análisis de la expresión de intermediarios de la ruta Hh-Gli en CMT de muestras quirúrgicas de GBM ...52
  - Análisis comparativo de expresión de intermediarios de la ruta Hh-Gli entre la masa tumoral y las CMT durante el primer pase en cultivo
  - Análisis de expresión de intermediarios de la ruta de Hh-Gli en CMT durante los primeros pases en cultivo
- 7.7 Estudio estadístico clínico -biológico de la ruta Hh-Gli en los tumores gliales...64
  - Variables estudiadas
  - Estudio descriptivo
  - Estudio analítico
    - *Estudio de los controles entre sí (SB, SG e HC)*
    - *Estudio en las CMT*
    - *Análisis de relaciones entre variables clínico-biológicas*



- *Estudio de tumores y controles por separado*

- *Variables dicotómicas entre sí*

## **8. Discusión...75**

8.1 Influencia en los resultados de una adecuada elección de controles...77

8.2 La ruta de Hh-Gli en el tejido tumoral...78

- Patch y Smo

- Gli1 y Gli2

- Sufu

- Estudio comparativo de intermediarios de Hh-Gli y CD133

8.3 El comportamiento de las células en cultivo y Hh-Gli...83

8.4 Hipótesis de un modelo de disregulación de Hh-Gli en los tumores gliales...85

## **9. Conclusiones...89**

## **10. Futuras líneas de trabajo...91**

## **11. Bibliografía...93**

## PRÓLOGO

Frustración e impotencia son dos sentimientos que definen al neurocirujano al enfrentarse con la realidad del paciente diagnosticado de tumor glial de alto grado, por su elevada incidencia y la corta supervivencia a pesar de todos los tratamientos disponibles.

Las nuevas líneas de trabajo que abren tanto la investigación en las rutas de desarrollo como en células madre, son prometedoras y van dirigidas a erradicar el subgrupo de células de la masa tumoral responsables del origen y mantenimiento del tumor.

No ha habido ni un sólo paciente o familiar que rechazara participar en nuestro estudio, la expresión “que al menos les sirva a otros” refleja fielmente la voluntad y agradecimiento de nuestros pacientes, muchos de ellos fallecidos en el momento de esta presentación.

Mucho queda por investigar, aunque esperamos que esta pequeña aportación pueda resolver ciertas incógnitas que nos ayuden en un futuro a plantear nuevos y eficaces tratamientos que sirvan para mejorar o curar esta devastadora enfermedad.

A ellos, a nuestros pacientes pasados, presentes y futuros, dedicamos este trabajo.

*María Peris Celda*

## AGRADECIMIENTOS

*Al Dr. Ángel Ayuso por su magistral dirección y constante apoyo, ejemplo de tenacidad y amor por la ciencia.*

*Al Dr. Francisco Martínez-Soriano, por su dirección, sus consejos, ánimo y sincera amistad.*

*Al Dr. Jose Manuel García Verdugo por su dirección, espíritu de colaboración básico-clínica y ofrecerme la oportunidad para comenzar esta investigación.*

*A los miembros del servicio de Neurocirugía del Hospital La Fe, en especial a los jefes de Servicio, el Dr. Álvarez-Garijo, ferviente impulsor de la colaboración, continuada por el Dr. Beltrán y Dr. Botella. A todos los neurocirujanos, al Dr. Prat, Dra. Galeano y Dr. Resurrección del grupo de neurooncología, al Dr. Gutiérrez por su interés en la extracción de controles. Al Dr. Miranda, tutor de residentes, a mis compañeros de residencia por su inestimable ayuda.*

*Muy especial mención merece enfermería de quirófano: Asunción Rojo, Dolores Climent, Margarita Ayuso, Amador Gramage y auxiliares de quirófano de neurocirugía por su preocupación en la extracción y preservación de muestras, sin su colaboración este trabajo no habría sido posible.*

*Al Dr. Francisco Montes y Dra. Amparo Ruiz, gracias por la revisión estadística independiente y exhaustiva.*

*A los miembros del laboratorio de Morfología Celular, gracias por su compañerismo y ayuda, en especial a Pepa Carrión, Jorge Oliver, Miriam Romaguera y Carmen Escobedo.*

*A mis padres, gracias por el apoyo incondicional. A CDPN.*

*María Peris Celda*

## ABREVIATURAS

AA astrocitoma anaplásico

bFGF basic fibroblastic growth factor, factor de crecimiento fibroblástico básico

CGH comparative genomic hybridization

CI Cubitus Interruptus

CMN célula madre neural

CMT célula madre tumoral

COS2 ó Cos2 Costal2

DAB diaminobenzidina

DHH ó Dhh Desert Hedgehog

EGFR epidermal growth factor receptor, receptor del factor de crecimiento epidérmico

EGF epidermal growth factor, factor de crecimiento epidérmico

FBS fetal bovine serum, suero bovino fetal

GBM glioblastoma multiforme

HC hipocampo

Hh-Gli ruta Hedgehog-Gli

HHIP hedgehog interacting protein

IHH ó Ihh Indian Hedgehog

KPS Karnofsky Performance Status o índice de Karnofsky

PTCH Patch

RM resonancia magnética

SB sustancia blanca

SG sustancia gris

SHH ó Shh Sonic Hedgehog

SMO ó Smo Smoothened

SNC sistema nervioso central

SUFU ó Sufu supresor de Fused

TC tomografía computarizada

TK tirosin kinasas

ZSG zona subgranular del giro dentado del hipocampo

ZSV zona subventricular

*DEDICADO A LOS PACIENTES Y SUS FAMILIAS*

# INTRODUCCIÓN

#### 4.1 Los tumores gliales

Los tumores astrogliales de alto grado constituyen el grupo más frecuente de tumores primarios cerebrales malignos y, según la clasificación de la OMS, comprenden dos entidades histológicas: el astrocitoma de grado III o anaplásico (AA) y el astrocitoma de grado IV, también denominado glioblastoma multiforme (GBM). El más frecuente de ambos, el GBM, representa del 12-15% de todas las neoplasias intracraneales y del 60-75% de los tumores astrogliales<sup>1</sup>. Los astrocitomas de grado II se engloban dentro de los tumores de bajo grado por su lento crecimiento aunque con una tendencia intrínseca a la malignización y progresión hacia astrocitoma anaplásico y por último GBM<sup>2</sup>.

Las neoplasias infiltrantes del sistema nervioso central (SNC) con células que recuerdan morfológicamente a los oligodendrocitos se clasifican como oligodendrogliomas. No es infrecuente que los tumores gliales presenten características morfológicas tanto de células astrocitarias como de oligodendroglía y en tal caso serían tumores mixtos u oligoastrocitomas. Éstos, a su vez, se clasifican dependiendo de sus características anatomopatológicas en bajo grado (II) y anaplásicos (III) con posibilidad de transformación de todos ellos a GBM.

Tanto los astrocitomas como los oligodendrogliomas se engloban dentro de los tumores neuroepiteliales junto con los ependimomas y tumores de los plexos coroideos según la clasificación de la OMS de 2007<sup>2</sup>.

El GBM es una neoplasia que típicamente afecta a la sustancia blanca subcortical de los hemisferios cerebrales, con un patrón altamente infiltrativo a través de los tractos de sustancia blanca, sin tendencia a metastatizar vía líquido cefalorraquídeo o hematógeno. Las características anatomopatológicas de estos tumores son: atipia nuclear, actividad mitótica, trombosis vascular, proliferación microvascular y necrosis.

Los AA se diferencian de los GBM en la ausencia de necrosis y proliferación microvascular y presentan una tendencia inherente a la transformación a GBM en un intervalo aproximado de 2 años<sup>2</sup>. Los GBM presentan una gran heterogeneidad genética, por lo que deberían ser considerados como un grupo de tumores malignos del SNC con características histopatológicas comunes más que una entidad nosológica única<sup>3-6</sup>.



Tanto los GBM como AA pueden surgir *de novo* (llamados primarios, mucho más frecuentes) o de forma secundaria desde un glioma previamente diagnosticado de bajo grado.

La incidencia del GBM en la mayoría de los países europeos y norteamericanos es de 3-4 casos por 100.000 habitantes por año. La historia de la enfermedad es habitualmente corta e incluye signos de hipertensión intracraneal, focalidad neurológica o crisis epilépticas. El GBM se puede manifestar en cualquier edad aunque es más frecuente en adultos con un pico de incidencia entre los 45 y 75 años, sin diferencias entre sexos<sup>2</sup>.

La importancia de su estudio radica no sólo en la elevada incidencia sino en la malignidad del proceso; su naturaleza altamente infiltrativa imposibilita su resección completa y, a pesar de los progresos en la quimio y radioterapia, menos de la mitad de los pacientes sobreviven más de un año. La media de supervivencia en el grupo tratado con cirugía, radioterapia y quimioterapia es de 14,6 meses<sup>2</sup>.

#### 4.2 Las células madre neurales y tumorales y su relación con la ruta Hedgehog-Gli

Las células madre neurales (CMN) son células multipotentes, presentes tanto en el embrión como en cerebro adulto, con capacidad para diferenciarse en cada una de las tres estirpes celulares del parénquima cerebral: neuronal, astrogliar y oligodendroglial<sup>7</sup>. El cerebro de un mamífero adulto retiene CMN en al menos dos regiones definidas: la zona subventricular de los ventrículos laterales (ZSV) y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (ZSG). Tanto la renovación como la diferenciación de las CMN está regulada por el “nicho” o microambiente que rodea a estas células, de tal forma que señales clásicamente implicadas en el desarrollo embrionario como Notch, BMP, Noggin, Eph/ephrins y Hedgehog/Gli<sup>8</sup> están también implicadas en el mantenimiento de estos nichos<sup>9</sup>.

Los primeros pasos en el descubrimiento e identificación de células madre tumorales se llevaron a cabo en leucemia y cáncer de mama y demostraron que una pequeña subpoblación dentro la masa tumoral, identificada como células madre tumorales (CMT), era la responsable tanto de la formación como del mantenimiento del tumor<sup>10-11</sup>. En 2004, Singh y colaboradores<sup>12</sup> aislaron CMT de GBM. Estas

células presentaban capacidad de auto-renovación, expresaban marcadores comunes a CMN como Nestin y CD133, potencial para diferenciarse en las distintas estirpes celulares del cerebro adulto y producían tumores en ratón con características histopatológicas muy similares a las del GBM de origen<sup>13</sup>. Esta subpoblación celular constituye en torno a un 3% del volumen tumoral. Estudios posteriores han identificado CMT en otros tumores cerebrales como meduloblastoma (MB), y ependimoma<sup>12</sup>. Por otro lado, trabajos recientes han mostrado que la existencia de diferentes mecanismos de inestabilidad genética pueden conducir a la transformación de CMN a CMT<sup>14</sup>. Una alteración en las CMN que dé lugar a su independencia de las señales de proliferación o resistencia a señales anti-proliferativas, podría causar una proliferación incontrolada y formación de la neoplasia. Si las rutas que participan en el desarrollo embrionario, entre ellas la estudiada Hh-Gli, juegan un papel importante en la auto-renovación y la diferenciación en el nicho de la CMN, y el GBM (o subpoblaciones de GBM) procede de una CMN o progenitora transformada, alteraciones en dichas rutas podrían estar implicadas en la transformación de CMN y en el crecimiento o propagación del tumor en el adulto<sup>15</sup>.

#### **4.3 La ruta Hh-Gli: descripción en *Drosophila* con importantes variaciones en vertebrados**

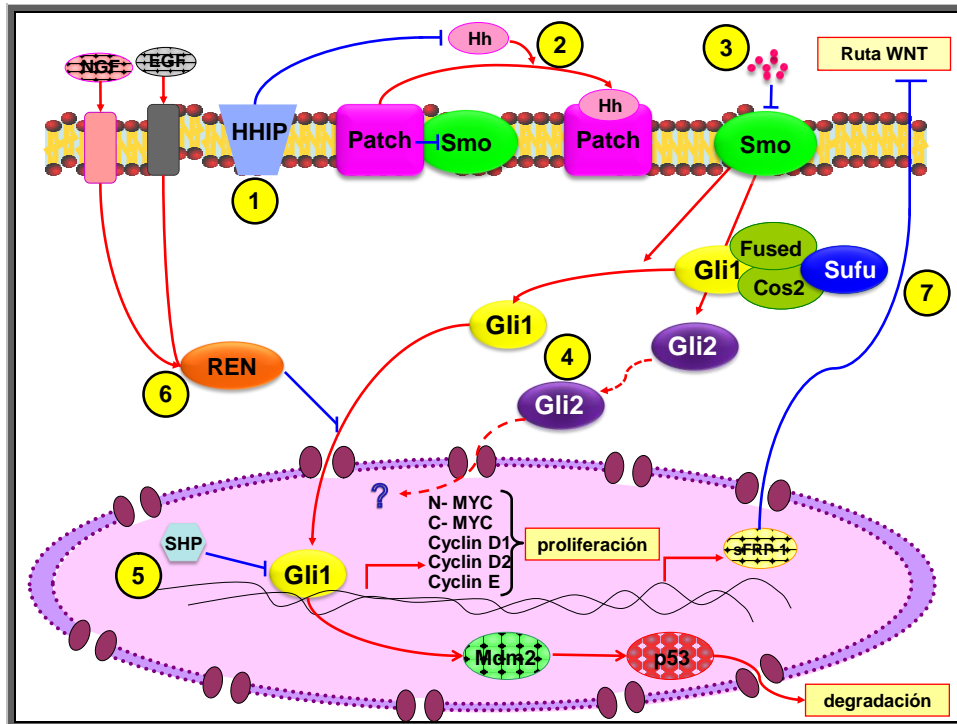
Hh-Gli fue identificada por primera vez en *Drosophila* como una ruta importante en el desarrollo embrionario implicada en la diferenciación entre los segmentos anterior y posterior.

Bien estudiada en esta especie, la ruta se activa cuando el ligando Hh se une al receptor de membrana Patch. En ausencia del ligando, Patch inhibe la actividad de una proteína G con 7 dominios transmembrana llamada Smoothened (Smo). Tras la unión del ligando, Patch es internalizada y degradada mientras que Smo se trasloca a la membrana y se activa. La activación de Smo induce la fosforilación de Costal2 (COS2) por parte de Fu (a su vez regulado por Sufu) que antagoniza la función negativa de COS2 disminuyendo el secuestro y procesamiento de Cubitus Interruptus (CI) en el citoplasma. En consecuencia, CI es transformado por un mecanismo desconocido en un factor de transcripción

activado<sup>16</sup> que se trasloca al núcleo donde participa en la expresión de distintos genes de proliferación y diferenciación entre ellos PATCH.

La ruta de Hh-Gli homóloga en vertebrados, a diferencia de *Drosophila*, incluye la señalización por medio de tres ligandos diferentes: Sonic (Shh), Indian (Ihh) y Desert Hedgehog (Dhh), que son proteínas de 45-kDa que de forma autocatalítica dan lugar a una forma activa de 20 KDa unida de forma covalente a colesterol<sup>17</sup> y palmitoil<sup>18</sup>. Las proteínas Kif7 y Kif27, aunque homólogas de COS2 de *Drosophila* no se relacionan con la ruta Hh al menos en cultivos de fibroblastos humanos<sup>19</sup>. El último miembro de la cascada en humanos comprende la familia de factores de transcripción Gli (homólogos de Ci), proteínas con dedos de zinc, de los que se han identificado Gli1 (activador), Gli2 (relacionado tanto con activación como con inhibición) y el probablemente supresor Gli3<sup>20-21</sup> (**Figura 1**). Tras la activación y traslocación de Gli al núcleo, aumenta la expresión de ciertos genes de proliferación y diferenciación como PATCH, GLI, sFRP-1 (inhibidor de la ruta de WNT<sup>22</sup>), TGF $\beta$ /BMP y probablemente otros no bien conocidos.<sup>20-21</sup>

En vertebrados, la regulación de Hh-Gli se produce a múltiples niveles. A nivel del ligando Hh, la proteína HHIP (Hedgehog Interacting Protein) secuestra Hh e impide su unión a Patch. Aunque todavía por mecanismos no bien conocidos, numerosas pequeñas moléculas se relacionan con la inhibición de Smo<sup>23-25</sup>. En el lado intracelular, los factores de transcripción Gli1,2,3 son regulados por el complejo Sufu (supresor of Fused). Sufu en ratón regula la estabilidad de los factores de transcripción Gli2 y Gli3 antagonizando el mecanismo de degradación de Gli mediado por Hih/Spop<sup>26</sup>. Se ha publicado recientemente que la acetilación de Gli1, regulada de forma fina por las histonas acetiltransferasa e histona deacetilasas y Cullin3-REN<sup>KCTD11</sup>, aumenta la proliferación y transformación celular<sup>27</sup>. A su vez, a proteína SHP (Small Heterodimer Partner) es un receptor nuclear que disminuye la expresión de los genes diana de Gli y cuyo efecto se debe a una interacción proteína-proteína a nivel nuclear<sup>28</sup>.



**Figura 1** . Esquema de la ruta Hh-Gli en vertebrados. Cuando se une el ligando Hedgehog (Hh) se libera la inhibición de Patch sobre Smo la cual activa Gli1 y Gli2 que son regulados mediante la interacción de un complejo formado por Fused, Sufu y Cos2. Gli1 se transfiere al núcleo donde actúa como factor de transcripción y activa distintos genes implicados en proliferación; la función transcripcional de Gli2 no ha sido tan ampliamente descrita y se relaciona con genes implicados tanto en proliferación como inhibición. Se muestran los puntos importantes en la regulación y control de la ruta: la expresión de ligando cuya función puede ser inhibida por HHIP(1). La unión del ligando a Patch que libera y activa Smo (2), regulada a su vez por pequeñas moléculas inhibitoras (3). La activación de proteínas de la familia Gli (4) que pueden ser reguladas por receptores nucleares como SHP (5) y por último la interconexión con otras rutas metabólicas como TK a través de REN (6) y Wnt mediante SFRP-1 (7). Activación:  $\rightarrow$  inhibición:  $\perp$ .

#### 4.4 La ruta Hh-Gli en el desarrollo embrionario y postnatal

En la ruta Hh-Gli, Shh es uno de los ligandos mejor estudiados en el desarrollo del SNC y participa en numerosos procesos clave en el mismo; control de la diferenciación celular y proliferación así como morfogénesis del cerebro, médula espinal, esqueleto axial y miembros<sup>29</sup>. Ihh se relaciona con el desarrollo del

cartílago de los huesos largos<sup>30-31</sup> mientras que Dhh está más implicado en el desarrollo de la línea germinal y las células de Schwann<sup>32-34</sup>.

En el sistema nervioso central, Hh-Gli se relaciona con la formación del tubo neural de los embriones vertebrados después del proceso de inducción neural. Shh es expresado por la notocorda caudalmente y por el mesodermo precordial rostralmente desde los primeros estadios. Además, estas señales inducen la expresión de Shh por parte de las células próximas (placa basal) y juegan un papel muy importante en la diferenciación de motoneuronas, neuronas dopaminérgicas, serotoninérgicas, interneuronas ventrales y oligodendrocitos<sup>35-41</sup>. Algunos estudios sugieren que Shh actúa de distinta manera según el gradiente de concentración<sup>42</sup>. En el cerebelo, las neuronas más abundantes, las células de Purkinje, se interrelacionan con otras partes del cerebro y con las células granulares, las cuales a su vez regulan la actividad de las células de Purkinje, formando un circuito esencial en la función cerebelosa. Las células granulares tienen su origen en precursores de la capa germinal externa que tras el nacimiento migran hacia la parte interna y se diferencian. Posteriormente, en una nueva migración, pasan a través de las capas molecular y de Purkinje para formar la capa granular interna y desaparecer la granular externa (tercera semana postnatal)<sup>43</sup>. Algunos estudios han demostrado que las células de Purkinje producen Shh y las células granulares responden a él. El bloqueo de Shh con anticuerpos durante el desarrollo embrionario temprano reduce de forma significativa el espesor de la capa granular externa<sup>44-46</sup>. Además, se ha demostrado que Hh-Gli regula el desarrollo del cortex cerebral y los colículos<sup>47-48</sup>.

Algunos experimentos evidencian que Shh es un factor vital para el desarrollo neural y regulación de las CMN adultas hipocampales *in vitro* e *in vivo*<sup>49</sup> y es indispensable para el mantenimiento de los nichos de CMN telencefálicas<sup>50</sup>. Parece que Shh actúa en los nichos de la ZSV y en la ZSG en el desarrollo embrionario tardío<sup>51</sup>. Las CMN tanto embrionarias como adultas tienen un cilio primario, receptor de señales, y Hh-Gli se relaciona con la fisiología del mismo<sup>52</sup>. En las células nodales embrionarias ventrales; Smo actúa en el cilio primario y trasduciendo señales externas al interior celular a través de la ruta Hh-Gli. La localización de Smo en el cilio es un paso clave en la regulación de la activación de la ruta<sup>53</sup>. Tras la ablación de distintos genes tanto ciliares como Smo, se logra inhibir la neurogénesis postnatal en los ratones mutantes. Por el contrario, la activación constitutiva de Smo produce una expansión importante de la

neurogénesis del giro dentado del hipocampo. Por tanto, Hh-Gli actuando por medio del cilio primario, tiene un papel crítico en la expansión y establecimiento de los progenitores hipocampales tras el nacimiento<sup>52</sup>.

#### 4.5 Implicaciones de la ruta Hh-Gli en enfermedades humanas

Alteraciones en la ruta de Hh-Gli han demostrado ser causa de numerosas enfermedades tanto tumorales como no tumorales que afectan entre otros al sistema nervioso central<sup>54</sup>.

Se han descrito malformaciones embrionarias debidas a alteraciones que disminuyen la activación normal de la ruta en humanos. La holoprosencefalia autosómica dominante, trastorno que ocasiona un plegamiento incompleto del SNC se relaciona con alteraciones genéticas de Shh<sup>55-56</sup>. En otras enfermedades autosómicas dominantes como la cefalopolisindactilia de Greig, el síndrome de Pallister-Hall y la polidactilia postaxial se implican alteraciones de Gli3<sup>31, 57-59</sup> (**Tabla 1**).

Con respecto a las enfermedades neurodegenerativas, se ha demostrado que Hh-Gli está implicada en la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra durante el desarrollo, y por lo tanto podría ser de interés en la enfermedad de Parkinson<sup>21, 60</sup>.

La activación excesiva de Hh-Gli está relacionada con síndromes neoplásicos; el paradigma lo encontramos en el síndrome de Gorlin, también llamado síndrome del nevus de células basales, que se caracteriza por la predisposición a los carcinomas de células basales de la piel, meduloblastomas y trastornos del desarrollo. Este síndrome fue descrito en los años 1950-1960 y desde entonces, sus bases moleculares han sido ampliamente estudiadas. La haploisuficiencia de la proteína Patch en células podría explicar las anomalías en el desarrollo, mientras que la pérdida de ambas copias normales de PATCH en células llevaría a la activación de determinados genes y neoplasias<sup>61-63</sup>. La aparición de meduloblastomas en estos pacientes fue el punto de partida del estudio de la ruta Hh-Gli en los tumores cerebrales.

Se ha demostrado que algunos componentes necesarios para el funcionamiento del cilio primario están también implicados en el correcto

funcionamiento de la ruta Hh-Gli<sup>64</sup>. Por tanto, es posible que determinadas enfermedades causadas por defectos en los cilios conlleven a su vez una alteración secundaria en la ruta Hh-Gli como los síndromes de Meckel, Bardet-Biedl, Kartagener y la enfermedad poliquística renal<sup>65-66</sup>.

ENFERMEDAD	TEJIDO AFECTADO	GEN AFECTADO	ALTERACIÓN
Displasia acrocapitofemoral	óseo	IHH	Mutación, pérdida de función <sup>67</sup>
Braquidactilia, Tipo A1	miembros	IHH	Mutación, pérdida de función <sup>68</sup>
Coloboma ocular	ocular	SHH	Delección <sup>69</sup>
Encondromatosis, Síndrome de Maffucci	óseo	PTHR1	Activación constitutiva de la ruta Hh-Gli por la mutación del receptor de la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHR1) <sup>70</sup>
Disgenesia gonadal	gónadas	DHH	Mutación, pérdida de función <sup>71</sup>
Holoprosencefalia	cerebral	SHH	Mutación, pérdida de función <sup>72</sup>
Síndrome de Pallister-Hall	cerebral, miembros	GLI3	Mutación, pérdida de función <sup>57</sup>
Cephalopolisidactilia de Grieg	cerebral, miembros	GLI3	Mutación, pérdida de función <sup>57</sup>
Síndrome de Smith-Lemli-Opitz	múltiples	SHH, IHH, DHH	Diferentes alteraciones del metabolismo de lípidos que afectan a la activación de Hh-Gli <sup>73</sup>
Síndrome del incisivo central maxilar	craneofacial	SHH	Mutación, pérdida de función <sup>74</sup>
VACTERL	óseo, cardíaco, miembros, renal	GLI1,2,3	Mutación, pérdida de función <sup>75</sup>

**Tabla 1.** Enfermedades del desarrollo cuya etiopatogenia se relaciona con la ruta Hh-Gli.

#### 4.6 La ruta Hh-Gli y neoplasias no cerebrales

En la tabla que se muestra a continuación, se expone un resumen de la implicación de la ruta Hh-Gli en distintas neoplasias sin afectación del sistema nervioso central (**Tabla 2**).

TIPO DE NEOPLASIA	GEN AFECTADO	ALTERACIÓN
Carcinoma de células basales	HHIP	↑ Por feed back negativo <sup>76</sup>
	SMO	Mutado en 10-20% de los esporádicos <sup>77</sup> Mutación, pérdida de función <sup>78</sup>
	PATCH1	
Cáncer de páncreas	HHIP	↓ Hipermetilación <sup>79-80</sup>
Cáncer colorectal	HHIP	↓ <sup>79</sup>
Cáncer gástrico	HHIP	↓ <sup>79</sup>
	IHH, SHH, PATCH1, SMO	↑ en tipo difuso <sup>81</sup>
	GLI1	↑ <sup>82</sup>
Cáncer de esófago	GLI-1	↑ <sup>83</sup>
Cáncer de pulmón	HHIP	↓ <sup>79</sup>
Síndrome del nevo basal	PATCH1	Mutación, pérdida de función <sup>78</sup>
Carcinoma escamoso oral	GLI2	↑ <sup>84</sup>
Rabdomiosarcoma alveolar	GLI3	↑ <sup>85</sup>
Cáncer ovárico	PATCH1	↑ <sup>86</sup>
Cáncer de próstata	SUFU	Mutación, inactivado <sup>87</sup>

**Tabla 2.** Alteraciones genéticas más frecuentes en neoplasias no cerebrales relacionadas con la ruta Hh-Gli.

Se han encontrado también diferentes asociaciones clínicas de interés pronóstico que apoyan la importancia de la implicación de la ruta de Hh-Gli en la génesis tumoral. Por ejemplo, la sobreexpresión de Gli1 en el cáncer esofágico tipo



escamoso se relaciona con las metástasis ganglionares y la progresión tumoral<sup>83</sup>. Además, la ruta de Hh-Gli está activada de forma constitutiva en neoplasias mamarias negativas para receptores estrogénicos, lo cual constituye un factor de mal pronóstico<sup>88</sup>.

#### 4.7 Hh-Gli y los tumores cerebrales

En aquellos tumores cerebrales en los que se ha demostrado la existencia de CMT (MB y GBM), se han observado alteraciones significativas en las rutas del desarrollo como Hh-Gli. Si como se postula, las CMT proceden de CMN o progenitoras alteradas y estas rutas tienen un papel importante en su disregulación y por tanto en la biología tumoral, intervenir farmacológicamente sobre dichas rutas podría formar parte de futuras terapias<sup>89</sup>.

##### ***Meduloblastoma***

El MB es un tumor maligno (OMS grado IV) embrionario invasivo del cerebelo que afecta preferentemente a los niños con tendencia a metastatizar a través de líquido cefalorraquídeo (presente en un tercio de los pacientes al diagnóstico). Sólo el 50% de los pacientes sobreviven a los 5 años. Tiene un pico de edad a los 7 años y es el tumor cerebral maligno más frecuente en niños. La mayoría de ellos surgen en el vermis (75%), asociándose la localización hemisférica al subtipo desmoplásico<sup>2, 90</sup>. Se han caracterizado varios subtipos histológicos: clásico, desmoplásico / nodular, nodular, anaplásico y células grandes. Los más frecuentes son los subtipos clásico y desmoplásico (20-25%). El MB está compuesto de una densa población celular con núcleos hipercromáticos redondos u ovals en forma de zanahoria rodeados de citoplasma escaso. Las rosetas de Homer Wright (en menos del 40%) se asocian con una elevada actividad mitótica y pleomorfismo nuclear, la necrosis es poco común. La variante desmoplásica se caracteriza por "pale islands", zonas nodulares libres de reticulina con una menor densidad de las células y las zonas internodulares, altamente celulares y con una razón núcleo-citoplasma mayor y una densa red de reticulina. La diferenciación más común en MB es la inmunopositividad para marcadores neuronales como la sinaptofisina<sup>91</sup>. Algunos autores sugieren que los tumores desmoplásicos pueden surgir a partir de células granulares en las capa germinal externa, mientras que los clásicos provienen de la matriz ventricular<sup>60, 92</sup>. Recientes estudios tras el

aislamiento de CMN del cerebelo post-natal<sup>93</sup> y CMT de MB, han abierto un nuevo campo en el estudio de la biología de los procesos que podrían llevar a la transformación maligna. Así, es posible que los tumores deriven de las CMN que son incapaces de diferenciar o detener su proliferación<sup>78</sup>.

En los tejidos normales, Gli es activo principalmente en células precursoras. Shh, como se expuso anteriormente, juega un papel esencial en el desarrollo del cerebelo normal. Las primeras investigaciones sobre Hh-Gli en relación con el MB comenzaron cuando se observó que el síndrome de Gorlin (incidencia del 5% de meduloblastomas) estaba relacionado con la mutación del gen *PATCH1*<sup>62, 78</sup>. Tras estudiar los MB esporádicos, también se encontraron alteraciones en intermediarios de la ruta de Hh-Gli en aproximadamente un 20-25%, asociados con el subtipo desmoplásico<sup>94-95</sup>.

En cuanto a modelos animales, los ratones *Patch* *-/-* no sobreviven más allá del período de embriogénesis, mientras que los ratones *Patch* *+/-* tienen características del síndrome de Gorlin, entre ellos, tumores cerebelosos similares a los MB. Esta pérdida de heterocigosidad conduce a una mayor probabilidad individual de formación del tumor. Sin embargo, el mecanismo de acción aún no está claro<sup>21</sup>. Los tumores con mutaciones en los componentes de la vía de Hh-Gli expresan altos niveles de Gli1, N-myc, C-myc, ciclina D1 y ciclina D2<sup>94, 96</sup>. Estudios activando Hh-Gli en ratones mutantes nulos Gli-1 mostraron que Gli-1 no es esencial para la formación de MB inducidos por Hh-Gli<sup>97</sup>. Se han observado mutaciones en N-myc y C-myc en el 5-8% de los meduloblastomas<sup>96, 98</sup>. Algunos miembros de la familia de proteínas Myc están implicadas en la proliferación celular. Además, N-myc podría ser un efector corriente abajo esencial en la señalización de Hh-Gli tanto en el desarrollo normal como en la formación de MB<sup>96</sup>.

La alteración genética más común en MB es la formación del isocromosoma 17q, que implica la pérdida del brazo corto del cromosoma 17 y por tanto la pérdida de una copia de genes supresores de tumores como p53 o REN. Esta aberración, sin embargo, es excepcional en el MB desmoplásico<sup>99</sup>. La idea de que Hh-Gli puede tener un papel relevante en la fisiopatología de la mayoría de MB se sugiere porque la ciclopamina, un antagonista específico de Smo, inhibe el crecimiento de casi todos los MB<sup>47, 100-101</sup>, no sólo los desmoplásicos. La explicación de cómo esta alteración del i17q se relaciona con Hh-Gli puede explicarse porque la diferenciación neuronal y la proliferación inducida por EGFR aumenta la expresión

de REN que inhibe la transición G1/S impidiendo la traslocación de Gli1 al núcleo y regulando negativamente la activación de los genes dependientes de Gli (**Figura 1**). Además, la pérdida de p53 se ha relacionado con la ruta Hh-Gli y la formación de MB en ratón al incrementarse su incidencia en aquellos *Patch1*  $-/+p53$   $-/-$ <sup>102</sup>.

Por otra parte, la ablación genética de los cilios primarios bloqueó la formación de MB en presencia de una activación constitutiva de Smo, que sin embargo, sí es responsable de la formación del tumor cuando el cilio se forma de manera correcta. Por el contrario, es necesaria la ablación de los cilios para formar los MB mediante una activación constitutiva de Gli2; por tanto, los cilios primarios tienen un papel diferente dependiendo del factor oncogénico implicado en la ruta Hh-Gli. En MB humanos, los cilios primarios se encontraron en MB con activación de Hh-Gli o WNT pero no en MB de otros subgrupos moleculares<sup>52, 103</sup>.

En conclusión, la ruta Hh-Gli juega un papel relevante en la formación y desarrollo del MB.

### ***Glioblastoma***

Desde el aislamiento de CMT de GBM, numerosos trabajos se han centrado en la biología de esta subpoblación de células dentro de la masa tumoral. Se ha demostrado que los GBM derivados de líneas enriquecidas de CMT están más cerca del genotipo y fenotipo de los tumores que las líneas celulares de GBM tradicionales cultivadas en presencia de suero. Por otra parte, las CMT de GBM tienen similitud con las CMN normales y progenitores neurales con diferente potencial en cuanto a la expresión de marcadores de indiferenciación y la capacidad para diferenciar a células que expresan marcadores específicos de los tres linajes del parénquima cerebral: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos<sup>104</sup>, aunque los GBM presentan también diferenciaciones anómalas con células que expresan marcadores de diferentes linajes al mismo tiempo. Assanah y colaboradores diseñaron una serie de experimentos donde demostraban el potencial gliomagénico de CMN: infectaron en rata adulta progenitores de la sustancia blanca con un retrovirus que sobreexpresaba PDGF y 14 de los 14 animales desarrollaron tumores cerebrales similares a los GBM<sup>105</sup>. Además, estudios recientes han demostrado *in vitro* la transformación espontánea de CMN adultas a CMT<sup>14</sup>.

Las alteraciones genéticas de los GBM son múltiples y con diferencias según sean primarios o secundarios<sup>106</sup> (**Tabla 3**).

ALTERACIÓN GENÉTICA	GLIOBLASTOMA PRIMARIO	GLIOBLASTOMA SECUNDARIO
LOH 10q	70%	63%
Amplificación EGFR	36%	8%
Deleción p16 <sup>INK4a</sup>	31%	19%
Mutación TP53	28%	65%
Mutación PTEN	25%	4%

**Tabla 3.** Alteraciones genéticas más frecuentes en GBM y diferencias (en porcentaje de pacientes que las presentan) entre primarios y secundarios<sup>106</sup>.

Sin embargo, se ha estudiado mucho menos el papel de Hh-Gli en los tumores gliales. Al igual que en MB, la ruta Hh-Gli también está involucrada en la gliomagénesis. De hecho, Gli1 fue aislado originalmente en una línea de glioma humano<sup>42</sup>. No todos los grupos apoyan el papel de Gli en los gliomas<sup>107</sup>. En este contexto, una cuestión que conviene tener en cuenta es que algunos autores utilizaron cerebelo (con alta expresión de Gli)<sup>108</sup> como control de tejido normal en experimentos de expresión génica. Trabajos recientes han confirmado la presencia general de una vía activa en GBM, siendo la transcripción de Gli1 un marcador fiable de la actividad de Hh-Gli, utilizando tres regiones de corteza cerebral normal como controles<sup>109</sup>.

Recientemente se ha descrito una variante truncada del factor de transcripción Gli1 (tGLI1), que no se expresa en células sanas, y sí en líneas celulares de GBM así como en muestras de GBM humano. Las células de GBM genéticamente modificadas para expresar esta variante han demostrado presentar una mayor tendencia a la migración e invasión ya que el gen CD24, asociado con migración es un factor transcripcional diana de tGli1<sup>110</sup>, el cual aumenta su expresión. PTEN también está relacionado con Hh-Gli ya que los tumores que expresan PTEN presentan elevados niveles de Shh y Patch1, además se correlacionan con una menor supervivencia<sup>111</sup>. NANOG, gen asociado con el desarrollo de las células madre embrionarias, ha demostrado ser un mediador esencial para la ruta de Hh-Gli en GBM y está relacionado con p53 de forma que

p53 controla mediante un mecanismo de retroalimentación negativa la función de Gli1 y NANOG<sup>112</sup>.

#### 4.8 La ruta Hh-Gli y su inhibición: nuevas perspectivas en el tratamiento de los tumores cerebrales

Los tumores cerebrales en los que la ruta Hh-Gli ha demostrado estar involucrada, MB y GBM, se corresponden además con los más frecuentes, el primero sobre todo en niños, el segundo mayoritariamente en los adultos. Hoy en día, las armas terapéuticas que tenemos contra MB son la resección quirúrgica, radioterapia y quimioterapia craneospinal, y a pesar de ello, sólo el 60% de los niños se curan y la mayoría de ellos sufren los efectos secundarios a largo plazo del tratamiento. La radioterapia en pacientes muy jóvenes puede causar morbilidad grave en el desarrollo del sistema nervioso central como disfunción neurocognitiva, endocrina y trastornos del crecimiento, entre otros<sup>91 113</sup>, posiblemente por la destrucción de los nichos de CMN entre otras causas. Con respecto al GBM, la supervivencia media es de poco más de un año tras cirugía, radioterapia y quimioterapia (temozolomida, principalmente)<sup>114</sup>. Estos agentes terapéuticos han sido desarrollados a partir de estudios en el total de la masa tumoral. Sin embargo, tras el aislamiento de las CMT, la mejor forma de estudiar la biología de estos tumores es a través del estudio exhaustivo de las características biológicas de esta subpoblación celular. Los inhibidores de la ruta Hh-Gli se consideran hoy dentro del grupo de nuevas terapias con resultados preliminares prometedores en ciertos pacientes<sup>115</sup>.

La ciclopamina ha sido uno de los primeros inhibidores, descubierto después de los estudios de holoprosencefalia en los recién nacidos de ovejas gestantes que habían comido lirios (*Veratum californicum*). De esta planta se extrae un alcaloide esteroideo que se une e inactiva Smo<sup>91</sup>. Algunos estudios mantienen que no es un buen fármaco por su relativamente baja afinidad por Smo. Tras su descubrimiento, se han identificado distintas moléculas pequeñas inhibitoras de Smo en ensayos de screening celular<sup>116-117</sup>. Una de estas moléculas, el Hh-Antag 691, presenta mayor afinidad por Smo y penetra la barrera hematoencefálica tras la administración oral, lo que lo convirtió en un fármaco prometedor para tratar los tumores cerebrales y se empleó en modelos animales<sup>118</sup>.

En un estudio con neuroesferas de GBM que mostraban activación de Hh-Gli, el tratamiento con ciclopamina causó una reducción del 40-60% en el crecimiento y no se formaron nuevas neuroesferas tras retirar el inhibidor. Además, la inyección de estas células no formó nuevos tumores en ratones atímicos. Por el contrario, el tratamiento de neuroesferas mediante radioterapia no fue capaz de destruir las CMT<sup>119</sup>.

El efecto de los inhibidores de Hh-Gli ha sido más ampliamente estudiado en meduloblastoma. La ciclopamina se ha utilizado en los modelos animales de MB: *Patch +/- p53 -/-* y se ha demostrado la reducción de los tumores<sup>120</sup>. Este compuesto también causó la regresión de los aloinjertos tumorales murinos *in vivo* e indujo la muerte rápida de las células de meduloblastomas humanos recién resecados sin efectos adversos observados en los animales tratados<sup>100</sup>. Tras la administración oral de dosis altas de Hh Antag, se consiguió la remisión de MB en un modelo de ratón<sup>118</sup>.

Considerando que sólo el 30% de los MB se deben a la activación directa de la ruta Hh-Gli, varios estudios se han centrado en otros modelos animales como los ratones mutantes CXCR6, que expresaron niveles elevados de Gli1, 2,3 a pesar de los elementos normales de la vía directa; inhibidores de Smo fueron eficaces en el tratamiento de los MB en este modelo<sup>121</sup>. Este experimento abre la posibilidad de que los pacientes se puedan beneficiar de antagonistas de Hh-Gli en MB sin que la patogenia de los MB se atribuya directamente a la alteración de la ruta. Tras varios estudios con líneas celulares y muestras de cáncer de próstata humano, se postuló que la inhibición de Gli1 podía ser efectiva en el tratamiento de estos tumores<sup>122-123</sup>. Se han obtenido resultados interesantes con pequeñas moléculas antagonistas de la función Gli, efector final de la ruta en un modelo de cáncer de próstata humano<sup>124</sup>.

En cuanto a tumores no cerebrales, la ciclopamina inhibe el crecimiento de células de cáncer gástrico *in vitro*<sup>82</sup>, de carcinoma esofágico tipo escamoso<sup>83</sup>, carcinoma de células basales, reduce la viabilidad de células epiteliales de cáncer de mama<sup>125</sup>, así como la inducción de apoptosis de células de cáncer colorectal<sup>126</sup>. En cuanto al carcinoma ovárico, se obtienen resultados similares *in vitro* e *in vivo*<sup>86</sup>.

En 2009 se publicó el caso de un paciente al que se administró un inhibidor de Smo (GDC-0449) en un meduloblastoma diseminado y resistente a múltiples tratamientos. La respuesta inicial fue muy positiva aunque pasajera y el paciente

falleció<sup>115</sup>. Se realizaron análisis en el tejido tumoral previamente y posteriormente al tratamiento: en el tejido inicial se identificó una pérdida de heterocigosidad de Patch1 mientras que en el tejido tras el tratamiento se encontró una mutación de Smo que confería resistencia *de novo* al inhibidor mientras se mantenía activa la ruta Hh-Gli<sup>127</sup>. Se han realizado ensayos clínicos en fase I para este inhibidor en pacientes con carcinoma de células basales con resultados prometedores<sup>115, 128</sup>. Están actualmente en curso ensayos clínicos en fase II tanto en carcinomas de células basales como en meduloblastomas<sup>129</sup>. Se encuentran en fase I los ensayos en carcinoma de páncreas y se está llevando a cabo un estudio en pacientes con glioblastoma recurrente y resecable quirúrgicamente así como en cáncer de estómago, pulmonar de células pequeñas, ovárico y colorectal metastásico entre otros.

El problema de resistencia adquirida a este inhibidor, hace que aunque sea el más utilizado, estén actualmente en estudio ensayos en fase I con otras moléculas como LDE225, IPI-926 en fase I para tumores sólidos y PF-04449913, en fase I para neoplasias hematológicas<sup>129-130</sup> entre otros. Los ensayos clínicos realizados con inhibidores de Hh-Gli están resumidos en la **Tabla 4**.

NÚMERO DE ENSAYO	NEOPLASIA	FÁRMACO	SITUACIÓN ACTUAL
NCT01096732	Adenocarcinoma ductal de páncreas	GDC-0449	No ha comenzado
NCT00636610	Cáncer metastásico colorectal	GDC-0449	En curso
NCT01088815	Adenocarcinoma metastásico ductal de páncreas	GDC-0449	Reclutando pacientes
NCT00957229	Síndrome del nevo basal	GDC-0449	Reclutando pacientes
NCT01195415	Cáncer de páncreas	GDC-0449	Reclutando pacientes
NCT00968981	Tumores sólidos	GDC-0449	Activo, finalizado reclutamiento
NCT00959647	Carcinoma de células basales, colorectal metastásico, ovárico	GDC-0449	Reclutando pacientes
NCT01143415	Cáncer pancreático	GDC-0449	Reclutando pacientes
NCT00739661	Cáncer ovárico	GDC-0449	Activo, finalizado reclutamiento

NCT01071564	Cáncer de mama	GDC-0449	Reclutando pacientes
NCT01125800	Meduloblastoma;;Rabdomiosarcoma;; Neuroblastoma;; Hepatoblastoma;; Astrocitoma	LDE225	Reclutando pacientes
NCT00953758	Neoplasias hematológicas	PF-04449913	Reclutando pacientes
NCT00878163	Cáncer pancreático, tumores sólidos	GDC-0449	Reclutando pacientes
NCT00833417	Carcinoma de células basales	GDC-0449	Activo, finalizado reclutamiento
NCT00991718	Mujeres sanas no fértiles	GDC-0449	Finalizado
NCT01209143	Tumores sólidos	GDC-0449	Todavía no reclutando
NCT00887159	Cáncer de pulmón	GDC-0449	Reclutando pacientes
NCT00607724	Tumores sólidos	GDC-0449	Finalizado
NCT00982592	Cáncer gástrico	GDC-0449	Reclutando pacientes
NCT00980343	Glioblastoma multiforme	GDC-0449	Todavía no reclutando
NCT01163084	Cáncer de próstata	GDC-0449	Reclutando pacientes
NCT01064622	Cáncer pancreático	GDC-0449	Reclutando pacientes
NCT00939484	Meduloblastoma	GDC-0449	Reclutando pacientes
NCT00670189	Síndrome del nevo basal	BMS-833923 (XL139)	Reclutando pacientes
NCT01174264	Efectos de los alimentos en la farmacocinética de	GDC-0449	Reclutando pacientes
NCT01154452	Diferentes tumores sarcomatosos	GDC-0449	Reclutando pacientes
NCT00822458	Meduloblastoma en pacientes jóvenes	GDC-0449	Reclutando pacientes
NCT01204073	Neoplasias no hematológicas avanzadas	TAK-441	Todavía no reclutando
NCT00761696	Neoplasias sólidas avanzadas	IPI-926	Reclutando pacientes
NCT00880308	Tumores sólidos avanzados, meduloblastoma	LDE225	Reclutando pacientes
NCT01208831	Tumores sólidos avanzados, meduloblastoma	LDE225	Todavía no reclutando
NCT01106508	Tumores sólidos avanzados, fase I	LEQ506	Todavía no reclutando



**Tabla 4.** Ensayos clínicos con inhibidores de Hh-Gli en diferentes neoplasias y estado de los mismos (actualizado en 2010)<sup>130</sup>.

Sin embargo, la inhibición no es la única vía para tratar enfermedades, sino también la activación. Los estudios con sobreexpresión de Shh mediante virus han demostrado que es capaz de favorecer la proliferación de NSC en el hipocampo. Además, el daño tisular puede regular al alza la producción de ligandos Shh y activar la señalización de Shh durante el proceso de reparación de tejidos<sup>49, 131</sup>. Esta función menos conocida, directamente relacionada con la función del SNC en el cerebro postnatal humano, podría ser importante en un futuro próximo para tratar enfermedades neurodegenerativas y el daño irreversible del SNC.

Lo más preocupante del uso de los inhibidores de la Hh-Gli son los probables efectos secundarios tras su administración en los pacientes. Estarían contraindicados en el embarazo por su relación con la holoprosencefalia en ovejas gestantes que habían ingerido ciclopamina. Sin embargo, los efectos en el cerebro tras el nacimiento siguen siendo inciertos. Son necesarios más estudios para determinar la edad después de la cual se puede bloquear de forma segura Hh-Gli en el cerebro. Todos estos datos nos llevan a pensar que el conocimiento de la biología tanto de las CMN y progenitores neurales, como de los diferentes episodios que conducen a la formación de CMT, es una prioridad en la lucha contra el GBM.

En este sentido, estudiar la implicación exacta en la génesis y expansión del GBM de vías de regulación como Hh-Gli, así como alteraciones en diferentes intermediarios de la misma, contribuirá a una mejor clasificación de un tumor de enorme heterogeneidad y ayudará a identificar nuevas dianas terapéuticas que podrán ser utilizadas en nuevos tratamientos frente a determinados subtipos de GBM.

## **OBJETIVOS**

En el presente trabajo estudiaremos la ruta de Hh-Gli en el contexto del glioblastoma multiforme, relacionando los resultados de expresión génica obtenidos en el laboratorio con parámetros clínicos. Los objetivos principales de este estudio son los siguientes:

- Cuantificar la expresión génica de los distintos intermediarios de la ruta Hh-Gli en una serie de 43 tumores gliales y comprobar si existe una disregulación de la ruta con respecto a los controles de sustancia blanca (SB), sustancia gris (SG) e hipocampo (HC).
- Establecer distintos subgrupos de tumores en base a posibles alteraciones de la ruta Hh-Gli.
- Relacionar dicha expresión con variables clínicas de interés obtenida de los pacientes.
- Estudiar la expresión de intermediarios de la ruta de Hh-Gli en CMT cultivadas a partir de los tumores extraídos de los pacientes y relacionar cuantitativamente la expresión de los distintos componentes de la ruta Hh-Gli en CMT y en la masa tumoral.
- Plantear una hipótesis de disfunción de la ruta de Hh-Gli en GBM y CMT con respecto a los controles.
- Estudiar la evolución temporal *in vivo*; estudio de las recidivas tumorales.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## 6.1 Tratamiento de las muestras

Las muestras estudiadas proceden de pacientes intervenidos en el Hospital La Fe de Valencia con la sospecha diagnóstica clínico-radiológica de tumor glial de alto grado (estudio de extensión con exclusión de metástasis, captación de contraste en anillo, edema perilesional en resonancia magnética) previo consentimiento informado al paciente y la familia.

Las muestras de controles pertenecen a pacientes epilépticos adultos sin evidencia de tumoración cerebral ni extracerebral, a los que se les extirpa HC y amígdala, asociado a lobectomía temporal (SB y SG).

El estudio fue aprobado por la Comisión de Ética del Hospital La Fe de Valencia dentro del Convenio del Hospital La Fe y el Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia.

## 6.2 Cultivo de células primarias de GBM y xenotrasplante

Todas las muestras se procesaron dentro de un plazo no superior a 12 horas, siguiendo el protocolo previamente descrito en Ayuso-Sacido et al, 2008<sup>132</sup> para la obtención de células madre neuronales de cerebro humano adulto. Las células madre tumorales se cultivaron en medios definidos libres de FBS en presencia de 20 ng/ml de EGF y 20 ng/ml de bFGF. Las tumoresferas en suspensión fueron subcultivadas un número de veces previa disociación utilizando tanto métodos enzimáticos como mecánicos.

Para evaluar la capacidad de las células iniciadoras de tumores aisladas a partir de muestras de GBM, 100.000 células fueron inyectadas en el striatum derecho de ratones inmunodempriados atímicos nude, utilizando un aparato estereotáctico (Just for Mice Digital Stereotaxis Instrument, Harvard Bioscience Company). Doce semanas después de la inyección, los ratones fueron perfundidos y perfijados con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0,5%. Los cerebros fueron postfijados 24 horas tras la perfusión. Una vez fijados, se realizaron cortes coronales de 50  $\mu$ m que fueron utilizados para detectar la presencia de células humanas mediante inmunohistoquímica con anti-human nuclei (Chemicon MAB281) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

### 6.3 Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Parte de la muestra de tejido extraída se procesó para la extracción de RNA utilizando TRIreagent (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente se trató con DNase (QUIAGEN) y fue sometido a un proceso de purificación utilizando el “RNeasy mini Kit” (QUIAGEN). A continuación se realizó la síntesis de cDNA utilizando el “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits” (Applied Biosystems) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente, se comprobó la calidad del cDNA y la ausencia de DNA genómico, mediante la realización de PCR (Paq5000 DNA Polymerase, Stratagene) de un gen control (GAPDH).

### 6.4 PCR Y QRT-PCR

Se diseñaron primers para los componentes de la ruta de SHH ( Gli1, Gli2, Smo, Patch, Sufu, CD133, Kif7, Kif 27). Se utilizó SYBR Green I Master de Roche utilizando el software y hardware Light Cycler 480 de Roche (96 pocillos por reacción). Las reacciones se comprobaron por cuadruplicado y se utilizaron como genes housekeeping GAPDH y  $\beta$ -actin. La calidad y eficiencia de los primers se comprobó mediante la construcción de curvas estandar a diferentes concentraciones para cada gen, utilizando cDNA de células embrionarias H9 y células tumorales U87. (Ver apartado de resultados).

Se realizó RT-PCR de los genes implicados en la ruta de Hh-Gli de 43 muestras de tumores gliales, 4 HC, 4 de SB, 4 de SG, 12 muestras de tumoresferas, neuroesferas procedentes del cultivo de sustancia blanca control y neuroesferas procedentes de cultivo de hipocampo.

### 6.5 Ensayos de diferenciación

Células obtenidas a partir de tejidos de GBM fueron sometidas a ensayos de diferenciación espontánea sobre “Glass Chamber Slide” (NUNC) tapizadas con Poly-D-Ornitina. Tras 10 días en medio con 10% de FBS, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos, lavadas con PBS y Triton X-100/PBS

al 0.2% durante 20 minutos a 37° y 10 minutos a temperatura ambiente. Tras el tratamiento con suero normal de cabra al 5%/0.1% Triton X-100/PBS durante 15 minutos, las células se incubaron durante la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios: GFAP (policlonal de ratón, 1:1000, Dako), Tuj1 (pollo, 1:500, Chemicon) y CNPasa (monoclonal de ratón, 1:400, Chemicon). Las células se incubaron durante 90 minutos con los correspondientes anticuerpos secundarios Alexa [488 (verde) y 555 (rojo) (1:500) y tratados con DAPI (azul) (1:1000)] durante 15 minutos. Los Coverslip se montaron sobre Fluorsave reagent (Calbiochem, 345789). Finalmente se tomaron fotografías con el microscopio de fluorescencia Leica DM6000.

## 6.6 Tinción con Hematoxilina-eosina

Para la determinación de estructuras características en el diagnóstico de tumores gliales, se incluyeron parte de todas las muestras de tumores en parafina. A continuación se realizaron cortes de 10 µm y se tiñeron con hematosilina-eosina siguiendo protocolos establecidos.

## 6.7 Análisis de los datos

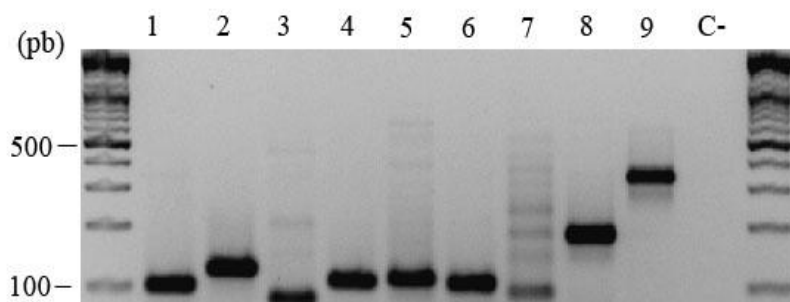
El estudio estadístico se realizó mediante SPSS versión 15. Las variables clínicas y demográficas estudiadas fueron revisadas en tres ocasiones diferentes para cada paciente con el objetivo de minimizar la posibilidad de error. Los test empleados fueron en su mayor parte no paramétricos dadas las condiciones de las variables (ver explicación pormenorizada en apartado de resultados). El análisis estadístico contó con la revisión externa e independiente del Dr. Francisco Montes, Catedrático de Estadística e Investigación Operativa de la Universidad de Valencia.

## RESULTADOS



### 7.1 Diseño y validación de *primers* específicos de intermediarios de la ruta de Hh-Gli

Con objeto de estudiar la expresión de los diferentes intermediarios de la ruta de Hh-Gli, se diseñaron parejas de primers específicos para cada uno de los diferentes componentes de dicha ruta, con un tamaño de amplicón teórico que permitiera su utilización en técnicas de PCR a tiempo real (QRT-PCR). Posteriormente se validaron las diferentes parejas de primers utilizando para tal fin cDNA procedente de muestras de células embrionarias H9 y de la línea establecida de GBM U87, con los cuales se llevaron a cabo amplificaciones de regiones específicas de cDNA mediante PCR. Comprobamos que todas las parejas amplificaban fragmentos de cDNA del tamaño esperado (**Figura 2**). Con objeto de realizar estudios comparativos de expresión de mRNA de los diferentes intermediarios de la ruta de Hh-Gli entre muestras de RNA aisladas de gliomas humanos, se construyeron en primer lugar curvas estándar para cada pareja de primers, en las que interpolar los diferentes valores de Ct obtenidos por QRT-PCR de las muestras ensayadas. Se utilizaron diluciones decrecientes del cDNA de las células utilizadas como control positivo, para obtener la curva estándar para cada gen. Las pendientes de las curvas estándar (entre -3,11 y -3,8) nos indicaron que los valores de eficiencia de las diferentes parejas de primers (100% correspondería a -3,32) así como el coeficiente de correlación lineal (0,99), eran correctos para llevar a cabo el estudio. Tanto las parejas de primers diseñados como sus curvas estándar se muestran en la **Tabla 5**.



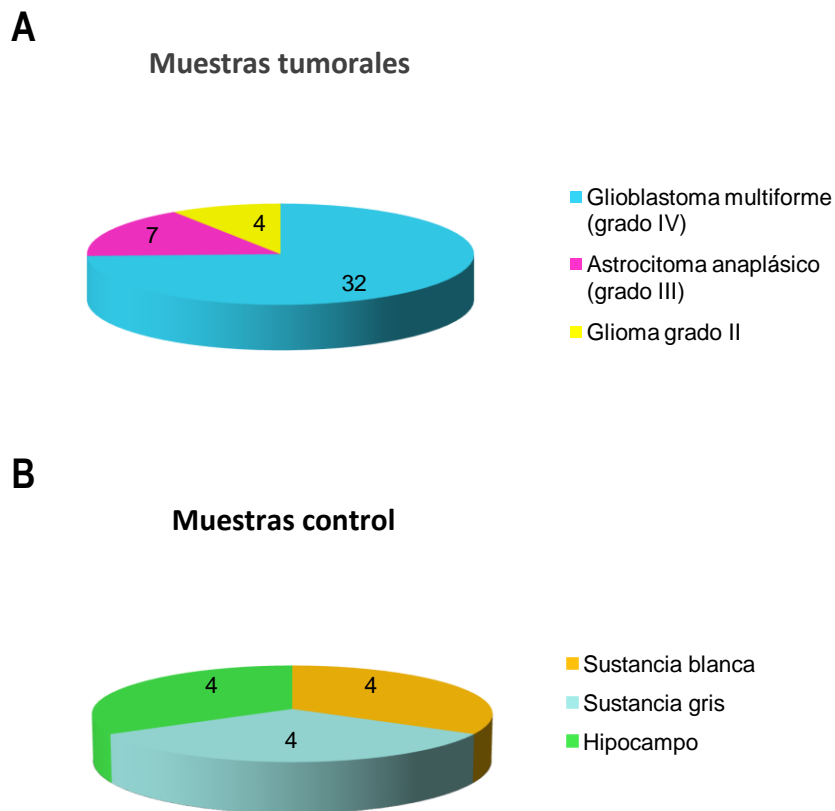
**Figura 2.** Fragmentos amplificados con las parejas de primers diseñadas en el presente trabajo. 1, GAPDH; 2,  $\beta$ -actina; 3, Gli2; 4, Kif7; 5, Kif27; 6, SuFu; 7, Gli1; 8, Patch ; 9, CD133 y C- (no cDNA).

Genebank	Nombre del primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño	Curva estándar
<u>NM_002046</u>	HGAPDH-F	TCCTCCACCTTTGACGCTG	100	$y = -3,5385x + 17,858$
	HGAPDH-R	ACCACCTGTTGCTGTAGCC		
<u>NM_016169</u>	HSUFU-F	CTAGGACATCCATGCCAGGT	103	$y = -3,1127x + 24,278$
	HSUFU-R	CTTGTCGCAGCATTGAGGTA		
<u>NM_005269</u>	HGLI1-F	TGGACTTTGTGGCTATTCTGG	95	$y = -3,4833x + 25,528$
	HGLI1-R	AGAGGGAGGTGGGGTATGTC		
<u>NM_00270</u>	HGLI2-F	CGAGAAGCAAGAAGCCAAAA	85	$y = -3,5299x + 23,929$
	HGLI2-R	AGCCACCACCAAGGAGAG		
<u>NM_006017</u>	HCD133-F	TCTCTATGTGGTACAGCCG	78	$y = -3,3915x + 27,141$
	HCD133-R	TGATCCGGGTTCTTACCTG		
<u>NM_018025</u>	HPATCH1-F	CCCCACTGAAAGATGTAGGC	186	$y = -3,4883x + 24,754$
	HPATCH1-R	TAACAAGGTGCTGGTGTGGA		
<u>NM_198525</u>	HKIF7-F	ATTGCCGCCTTGTGTCTT	107	$y = -3,6556x + 19,402$
	HKIF7-R	CGACCCTTTCGTGATGATTC		
<u>NM_017576</u>	HKIF27-F	ATGTGGGACGACTTCATGGT	110	$y = -3,5243x + 24,485$
	HKIF27-R	AATGCCAACTCCAAGACTGG		
<u>NM_001101</u>	HBACTIN-F	TTCTACAATGAGCTGCGTGTG	103	$y = -3,8386x + 14,593$
	HBACTIN-R	GGGGTGTGAAGGTCTCAAA		
<u>NM_005631</u>	SMO-F	CCTTCATAGCCTCAAACA	106	$y = -3,495x + 24,235$
	SMO-R	TGATTTCTTCTCCCAATAACCTG		

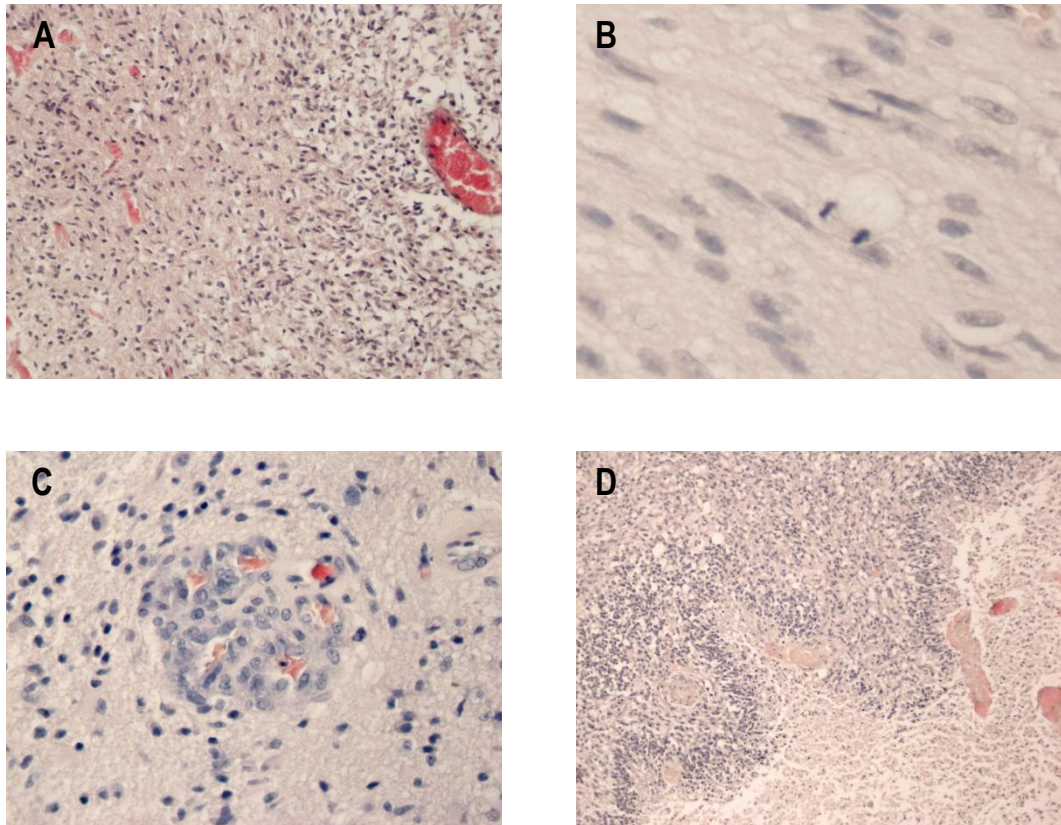
**Tabla 5.** Listado de los genes analizados con la referencia correspondiente en Genebank. Secuencia de las diferentes parejas de primers diseñadas en el presente estudio, específicos para cada gen, tamaño del amplicón y curva estándar.

## 7.2 Anatomía patológica

Se recibieron 43 muestras quirúrgicas de tumores gliales, de ellos 32 se correspondían a tumores de grado IV (GBM), 7 de grado III (AA) y 4 de grado II. Entre los tumores gliales de grado II se han analizado un xantoastrocitoma pleomórfico (tumor astrocitario, muestra 16), un oligodendroglioma (tumor glial derivado de la oligodendroglía, muestra 17) y dos astrocitomas difusos (muestras 20 y 33) (**Figura 3**).

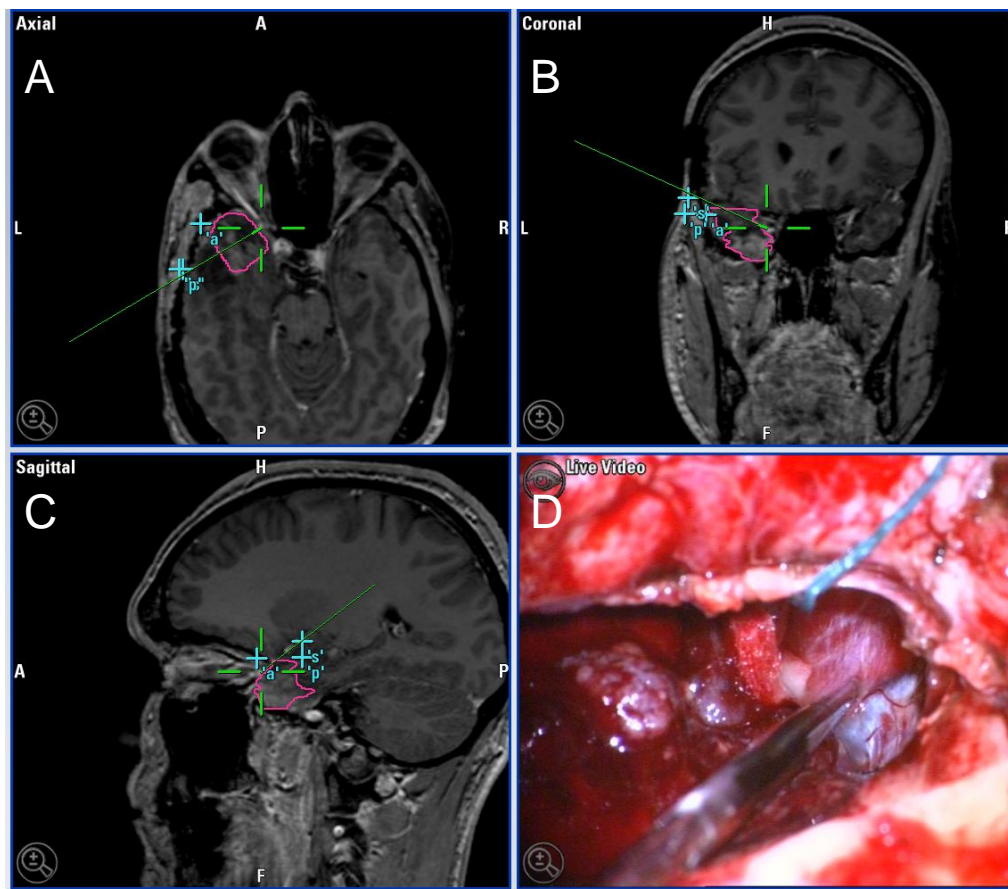


**Figura 3.** A. Diagrama que representa de forma gráfica el tipo y cantidad de muestras quirúrgicas de tumores gliales incluidas en el presente estudio clasificadas de acuerdo a los criterios de la OMS para neoplasias del SNC. B. Muestras control empleadas en el estudio.



**Figura 4** Características típicas del GBM, tinción con hematoxilina-eosina: A. Pleomorfismo celular e hiper celularidad. B. Mitosis. C. Proliferación microvascular formando estructuras glomeruloides. D. Necrosis con un componente celular formando pseudoempalizadas.

Además del diagnóstico histológico por parte del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital La Fe, se realizaron nuevas tinciones mediante hematoxilina-eosina de cada uno de los tumores analizados (**Figura 4**) con el objetivo de asegurar que las muestras correspondían a fragmento tumoral así como una doble comprobación del diagnóstico. Las resecciones fueron en su mayor parte guiadas mediante neuronavegador con escasa posibilidad de error (**Figura 5**).

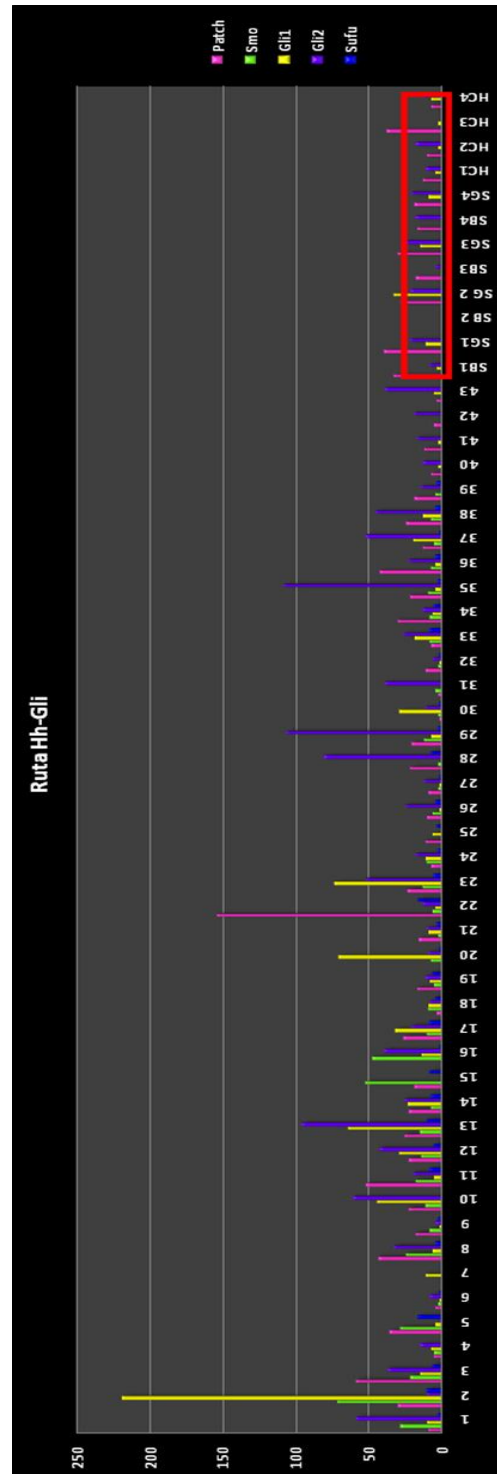


**Figura 5.** Imágenes intraoperatorias de una resección tumoral guiada por neuronavegador. A, B, C cortes axial, coronal y sagital respectivamente con delimitación del tumor. D, fotografía intraoperatoria de la resección tumoral con el posicionador situado en el polo temporal. (Cortesía Dr. Prat).

Con objeto de comparar los valores de expresión de mRNA de los diferentes intermediarios de la ruta de Hh-Gli obtenidas a partir de muestras tumorales con los valores correspondientes a tejidos similares no tumorales, se han utilizado un total de 12 controles procedentes de pacientes a los que se les realizó una lobectomía temporal y amigdalohipocampectomía por epilepsia fármaco-resistente (esclerosis mesial de lóbulo temporal). De ellos, 4 son de SB, 4 SG y 4 HC de 6 pacientes diferentes, ya que en 4 pacientes se recogieron muestras de SB, SG e HC (**Figura 3**).

### 7.3 Análisis conjunto de expresión de intermediarios de la ruta Hh-Gli mediante QRT-PCR.

Los diferentes intermediarios de la ruta de Hh-Gli estudiados aparecen sobreexpresados en los tumores gliales de forma global en comparación con los controles de SB, SG e HC (**Figura 6**).

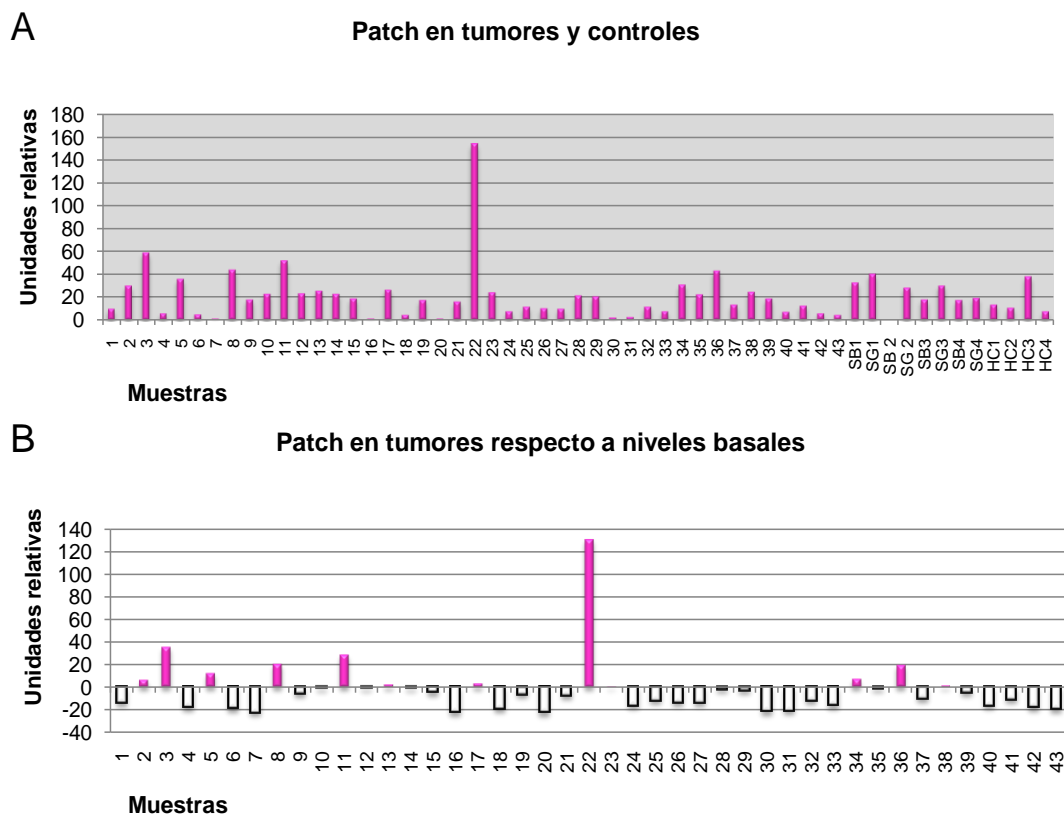


**Figura 6** . Visión general de la expresión de los intermediarios de la ruta Hh-Gli en unidades relativas (eje de ordenadas) de las muestras estudiadas (eje de abscisas); los controles de sustancia blanca (SB), sustancia gris (SG) e hipocampo (HC) aparecen destacados en el rectángulo rojo.

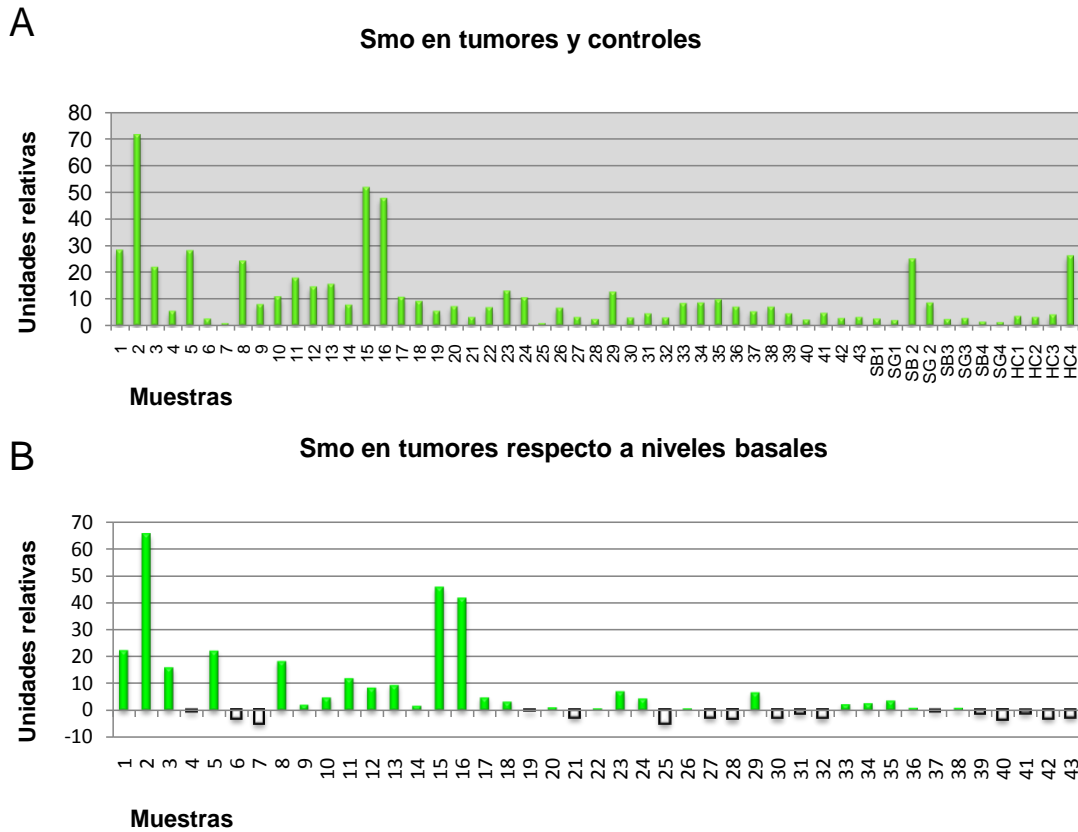
## 7.4 Análisis específico de expresión de intermediarios de la ruta Hh-Gli mediante QRT-PCR

### Niveles de expresión de Patch y Smo

Como ya mencionamos previamente, Patch es una proteína de membrana que, en ausencia de ligando, retiene a Smo inhibiendo su función. Cuando analizamos los resultados obtenidos de forma individual para Patch, observamos niveles de expresión variables, entre las diferentes muestras de tumores (**Figura 7A**). Tras sustraer a los valores de expresión, los datos obtenidos con los tejidos no tumorales, observamos que el 72% de los tumores presentan niveles de expresión de Patch por debajo de los niveles normales (31 de 43), de entre los de bajo grado, 2 de los 4 analizados. (**Figura 7B**).



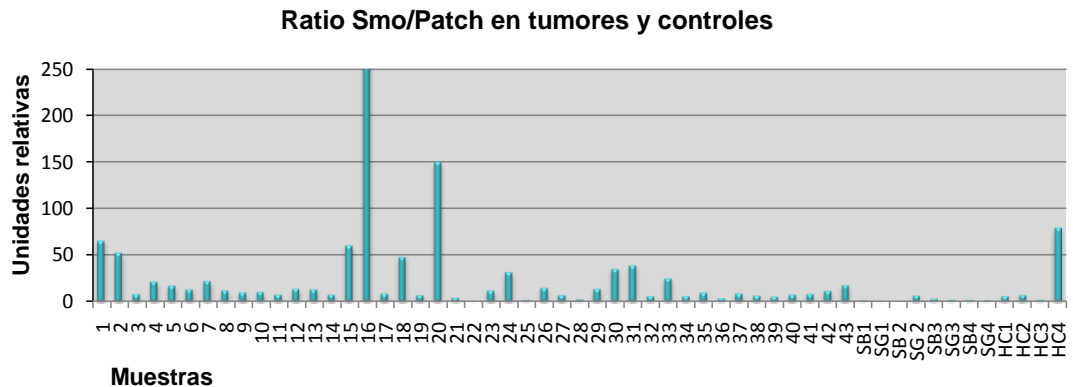
**Figura 7** Gráfica A. Patch en tumores (muestras 1 a 43) y controles de SB (1 a 4), SG (1 a 4) e HC (1 a 4). Gráfica B. Patch en tumores menos la media de los niveles de Patch en SB y SG.



**Figura 8** Gráfica A. Smo en tumores(muestras 1 a 43) y controles de SB (1 a 4), SG (1 a 4) e HC (1 a 4). Gráfica B. Smo en tumores menos la media de los niveles de Smo en SB y SG.

Cuando analizamos los valores de expresión de Smo, sin embargo, observamos una variabilidad mayor que la observada en el caso de Patch (**Figura 8A**). Una vez sustraídos a los valores de expresión, los obtenidos para las muestras no tumorales, observamos una clara sobreexpresión en 27 de los 43 tumores analizados (62,8%). Es destacable además, que un subgrupo formado por 5 tumores presentaba unos niveles de expresión más de 20 unidades superior a los niveles control, entre ellos uno de bajo grado. (**Figura 8B**). Por tanto, de modo gráfico se puede visualizar una relación Smo/Patch que tiende a un aumento transcripcional de Smo y disminución de Patch menos en los tumores 22 y 25, ambos de alto grado. La muestra 16, tumor de grado II presenta unos niveles muy elevados de Smo con respecto a Patch (**Figura 9**).

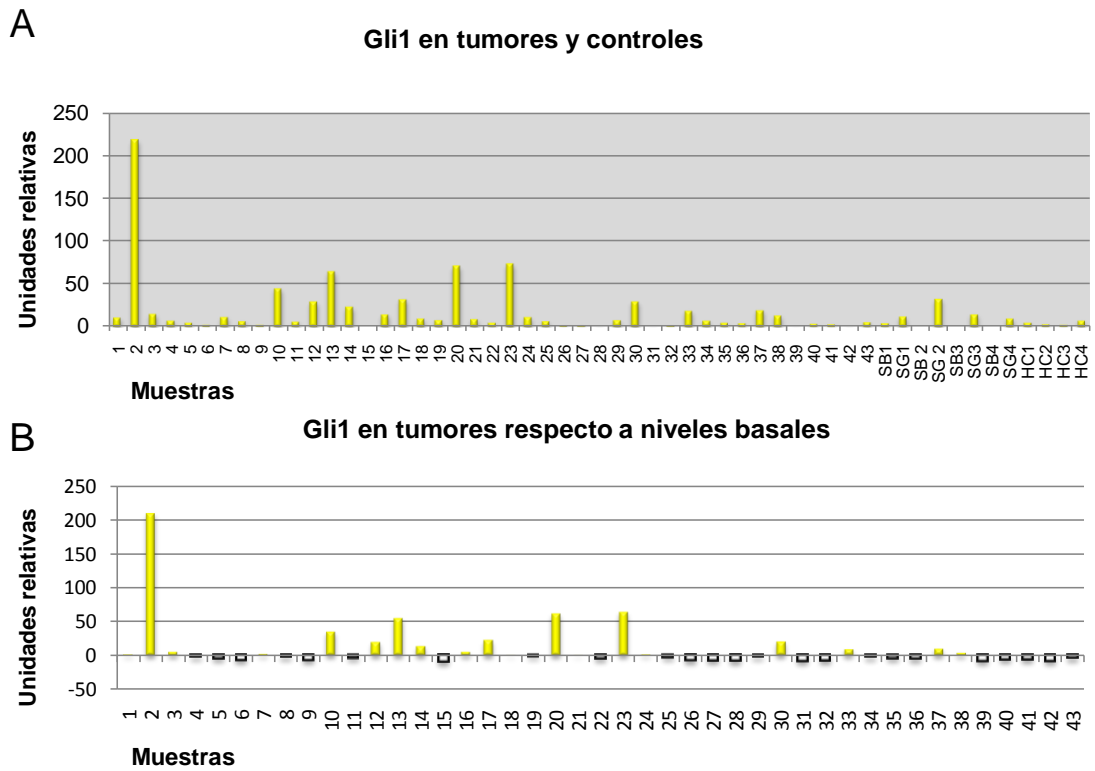




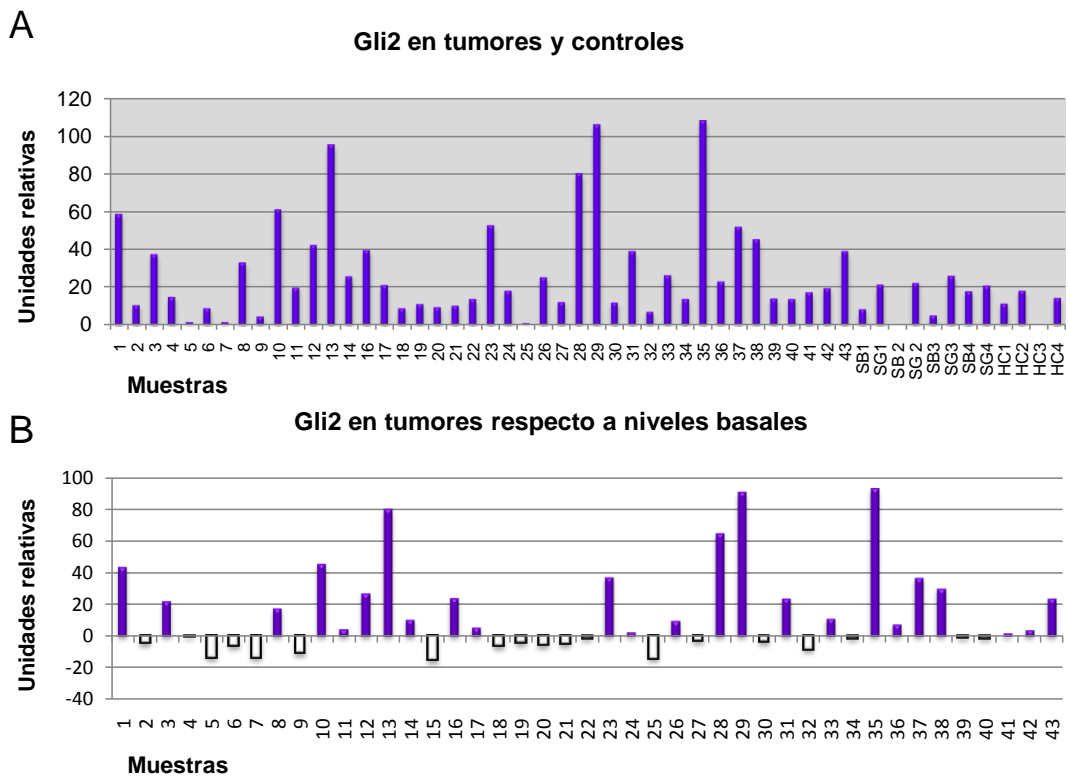
**Figura 9.** Ratio Smo/Patch en tumores (muestras 1 a 43) y controles de SB (1 a 4), SG (1 a 4) e HC (1 a 4). La muestra 16, xantroastrocitoma pleomórfico presenta una ratio más elevada de la que se muestra en la gráfica para facilitar la visualización.

### **Los efectores de la ruta: Gli1 y Gli2**

A continuación estudiamos los niveles de expresión de los efectores principales de la ruta Gli1 y Gli2 por separado. En general los niveles de expresión de Gli1 aparecen en torno a los valores promedio de las muestras control. Sin embargo, en un subgrupo de tumores (5 de 43) Gli1 aparece significativamente sobreexpresado (50 unidades o más que los valores promedio de las muestras control). Observamos, no obstante una gran diferencia entre los patrones de expresión de Gli1 y Gli2. Gli2 aparece sobreexpresado en más de la mitad de los tumores 55,8% (23 de 43). Dentro de este grupo parece haber un subgrupo con una expresión notablemente superior al resto, más de 40 unidades, con predominio de los de bajo grado (2 de 5). En 3 muestras de este subgrupo: 10, 13 y 23, coinciden niveles altos de expresión tanto de Gli1 como Gli2 (**Figuras 10 y 11A y B**).



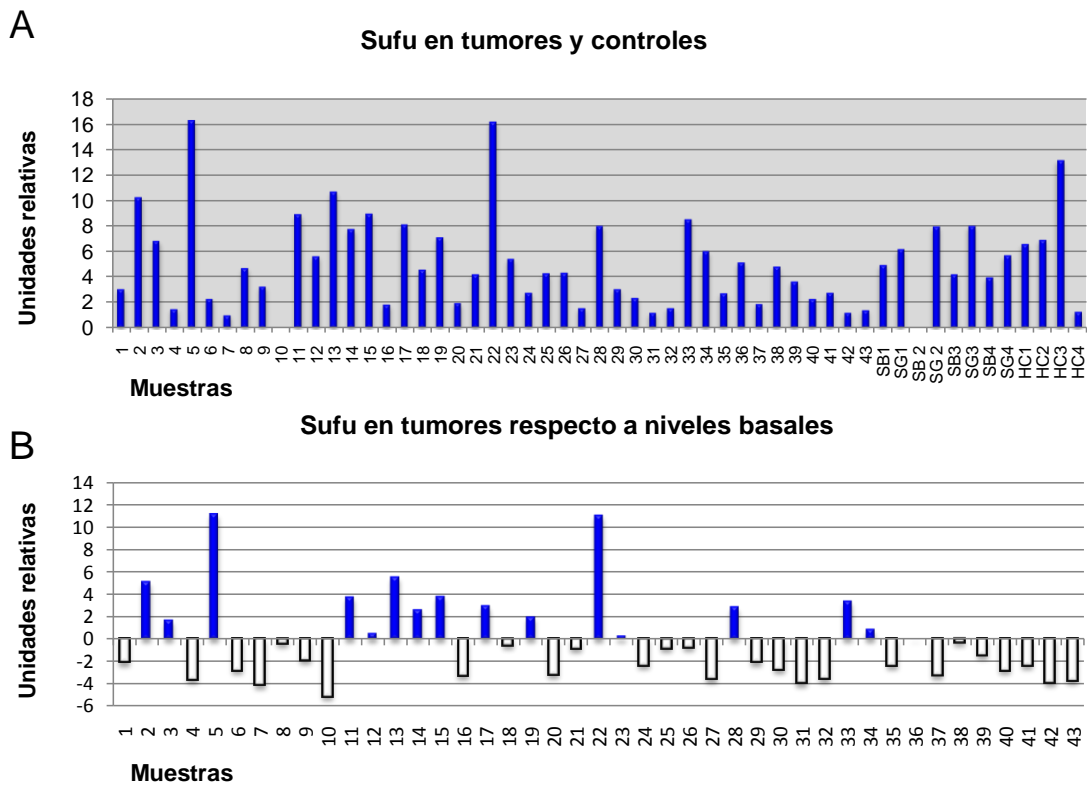
**Figura 10.** Gráfica A. Gli1 en tumores (muestras 1 a 43) y controles de SB (1 a 4), SG (1 a 4) e HC (1 a 4). Gráfica B. Gli1 en tumores menos la media de los niveles de Gli1 en SB y SG.



**Figura 11.** Gráfica A. Gli2 en tumores (muestras 1 a 43) y controles de SB (1 a 4), SG (1 a 4) e HC (1 a 4). Gráfica B. Gli2 en tumores menos la media de los niveles de Gli2 en SB y SG.

### ***Sufu, regulador***

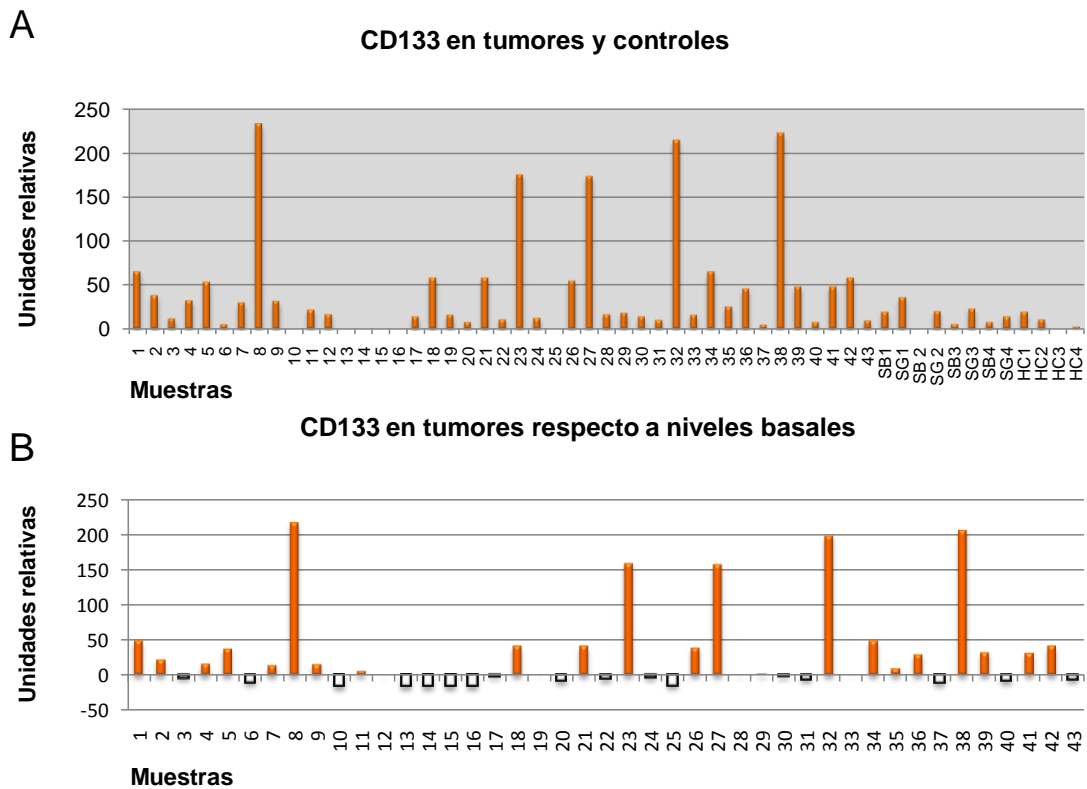
Del mismo modo analizamos de forma individualizada los niveles de expresión de Sufu. A diferencia de los intermediarios analizados anteriormente, las variaciones en los niveles de expresión se mueven dentro de una ventana más estrecha. Sin embargo, aparecen dos subgrupos de tumores claramente diferenciados. Un primer grupo con niveles de expresión entre 0 y 12 unidades por encima del promedio de los valores control y un segundo grupo donde la expresión de Sufu varía entre 0 y 6 unidades menos que los encontrados en los controles. (**Figura 12A y B**)



**Figura 12.** Gráfica A. Sufu en tumores (muestras 1 a 43) y controles de SB (1 a 4), SG (1 a 4) e HC (1 a 4). Gráfica B. Sufu en tumores menos la media de los niveles de Sufu en SB y SG.

### CD133

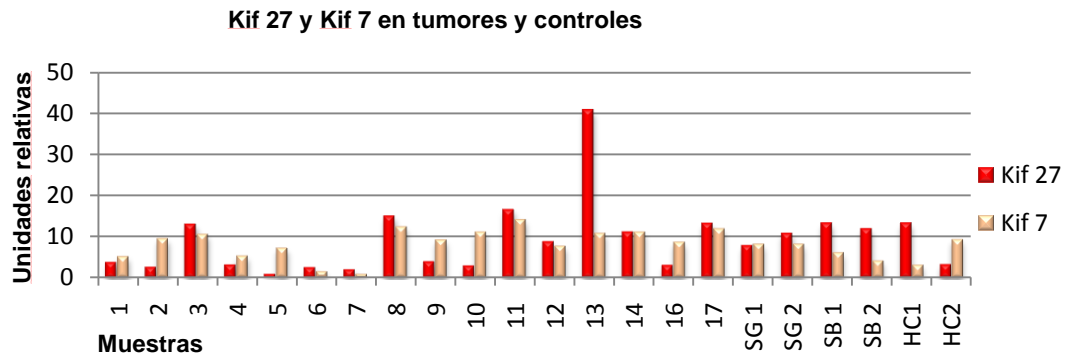
Con objeto de tener una idea más clara del papel desempeñado por los intermediarios de la ruta de Hh-Gli, analizamos la expresión de CD133 en todas las muestras estudiadas. Encontramos 3 grupos claramente diferenciados. El primero con una expresión entre 150 y 220 unidades mayor que el promedio de las muestras control (5 de 43). Un segundo grupo con valores entorno a 40 unidades superior a los valores de expresión de las muestras control (6 de 43), y un tercer grupo con valores similares o incluso inferiores a los observados en los controles. Proteína de membrana, marcador de un subgrupo de células madre, lo encontramos sobreexpresado en 20 tumores de forma notablemente alejada de la expresión en controles (**Figura 13**).



**Figura 13.** Gráfica A. CD133 en tumores (muestras 1 a 43) y controles de SB (1 a 4), SG (1 a 4) e HC (1 a 4). Gráfica B. CD133 en tumores menos la media de los niveles de CD133 en SB y SG.

### **Homólogos de Cos2**

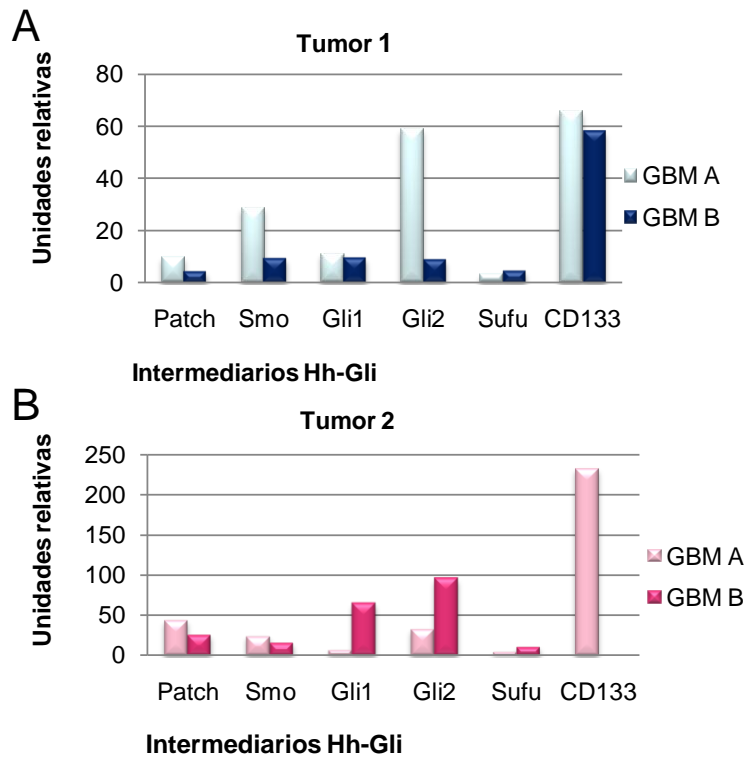
En el análisis preliminar de tejido tumoral en 17 muestras, analizamos Kif7 y Kif27, homólogos de Cos2. Se ha demostrado que estos dos intermediarios, aunque son homólogos de Cos2 en *Drosophila*, no parecen relacionarse con la ruta Hh-Gli al menos en cultivo de fibroblastos humanos<sup>19</sup>. De forma consistente con estos trabajos, los niveles de expresión de estos intermediarios no eran diferentes a los de los controles por lo que abandonamos su estudio (**Figura 14**).



**Figura 14.** Expresión de Kif 7 y 27 en tumores (1 a 17), y controles (SB, sustancia blanca; SG, sustancia gris; HC, hipocampo). Del tumor 15 no se dispuso de muestra suficiente para el análisis. Los niveles son similares a los de los controles por lo que desestimamos posteriores estudios.

### 7.5 Las recidivas, un modelo *in vivo* para estudiar la evolución del tumor en el cerebro humano

Las muestras procedentes de recidivas son de incalculable valor dado que nos permiten estudiar el tumor tras un intervalo de tiempo de al menos 6 meses (según protocolo del Comité de Neurooncología Hospital la Fe). Esta cirugía no es frecuente por la limitada supervivencia de los pacientes y porque se realiza habitualmente si la exéresis en la primera cirugía ha sido completa. No obstante, en el presente trabajo hemos estudiado dos recidivas y sus tumores de origen. Aunque no es posible poder extraer conclusiones a partir de tan sólo dos muestras, hemos podido observar algunas similitudes y diferencias entre ambas. En las dos muestras procedentes de recidivas se observa una disminución en la expresión de Smo y Patch a la par que un aumento discreto de Sufu. Los niveles de expresión de los efectores Gli1 y Gli2 aparecen claramente aumentados en la recidiva de la muestra 2, mientras que en la recidiva de la muestra 1 la expresión de Gli2 ha disminuido y la de Gli1 permanece invariable. Son interesantes los resultados obtenidos con respecto a la expresión de CD133. Mientras que dicho marcador permanece invariable en la muestra 1, no se detecta su expresión en la recidiva de la muestra 2 (**Figura 15**).



**Figura 15.** Gráfica A. Tumor 1, GBM inicial (GBM A) y GBM recidiva (GBM B): niveles de los diferentes intermediarios Hh-Gli. Gráfica B. Tumor 2, GBM inicial (GBM A) y GBM recidiva (GBM B): niveles de los diferentes intermediarios Hh-Gli.

### 7.6 Análisis de expresión de intermediarios de la ruta Hh-Gli en CMT de muestras quirúrgicas de GBM

Todas las alteraciones encontradas hasta el momento en los niveles de expresión de intermediarios de la ruta de Hh-Gli, están relacionadas con muestras procedentes del total de la masa tumoral. En la masa tumoral encontramos una representación de diferentes clones de células madre tumorales o iniciadoras de tumores, células más diferenciadas, pero todavía con capacidad mitótica, derivadas de las anteriores, células tumorales totalmente diferenciadas sin capacidad mitótica y células no tumorales del parénquima cerebral. Sin embargo, nos preguntamos si los resultados obtenidos podrían ser una extensión de lo que sucede en las células iniciadoras de tumor, responsables del inicio y mantenimiento de dicho tumor y, por tanto, si podríamos aportar información sobre la biología de dichas células. Con este fin, analizamos la expresión de los diferentes intermediarios de la ruta de Hh-Gli en líneas de células iniciadoras de tumores aisladas a partir de la masa tumoral de diferentes muestras, posteriormente estudiamos si los valores de expresión se veían alterados durante el crecimiento en cultivo de dichas células.

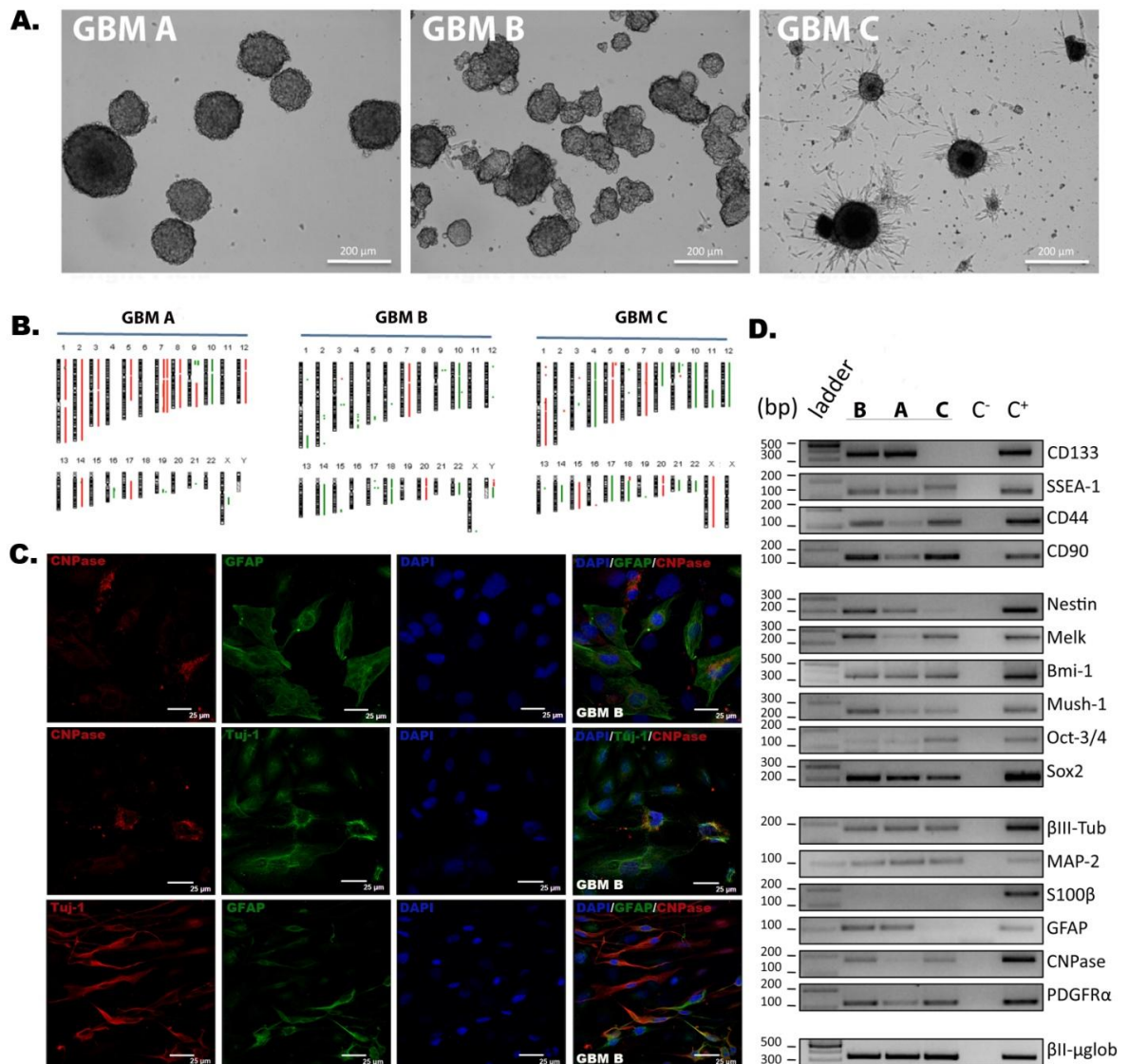
En primer lugar, tras el aislamiento de células mitóticamente activas a partir de varias muestras de GBM, se realizaron una serie de ensayos para comprobar que las células en cultivo cumplían las características necesarias para ser consideradas células iniciadoras de tumores; esto es: capacidad para crecer en cultivo en forma de esfera, formación de esferas secundarias, terciarias, etc., presencia de mutaciones, capacidad para diferenciarse en células que expresen marcadores de los diferentes tipos celulares del parénquima cerebral (normalmente con patrones anómalos) y por último, la capacidad de desarrollar tumores histopatológicamente similares a los tumores de los que fueron aisladas cuando son trasplantadas en número reducido en cerebro de ratón. En este sentido, las células derivadas de muestras quirúrgicas de GBM incluidas en el presente estudio y crecidas en condiciones apropiadas para enriquecer el cultivo de células iniciadoras de tumores, eran capaces de crecer en forma de esferas hasta un número elevado de pases, presentaban alteraciones cromosómicas consistentes con GBM (estudiadas mediante CGH), generaban células que expresaban marcadores de los diferentes tipos celulares del parénquima cerebral cuando crecían en medio de diferenciación y eran capaces de generar tumores en cerebro de ratón inmunodeprimido con patrones de expansión similares a los encontrados en los pacientes (**Figuras 16 y 17**).

A

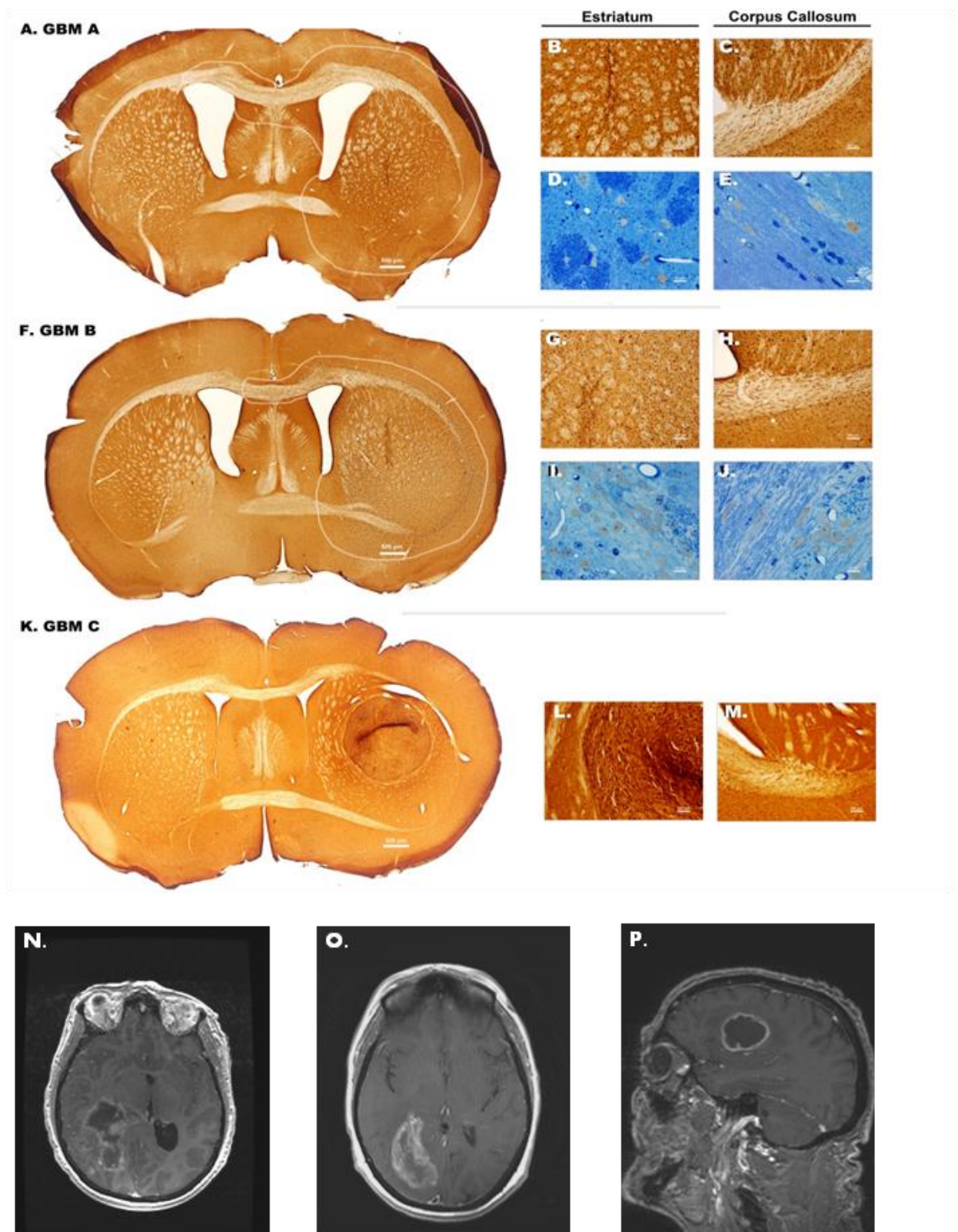
A

A





**Figura 16.** Caracterización *in vitro* de CMT de GBM de las muestras 11 (A), 7 (B) y otro tumor no analizado con RT-PCR previamente (C). A. Las CMT crecen formando esferas en suspensión o bien adheridas a la superficie que finalmente se separan y permanecen en suspensión. B. El cariotipo obtenido mediante CGH muestra anomalías cromosómicas compatibles con GBM. C. Cuando se induce diferenciación espontánea en presencia de suero y por un periodo de 10 días, aparecen células que expresan GFAP (astrocitos), Tuj1 (neuronas) y CNPasa (oligodendrocitos) (muestra de CMT del GBM B). D. Perfil de expresión de genes de indiferenciación y diferenciación en CMT de los GBM A, B, C.



**Figura 17.** Xenotrasplantes de CMT de las muestras de GBM A, B y C en cerebro de ratón inmunodeprimido. La detección de células humanas se ha realizado mediante

inmunohistoquímica contra *human nuclei* y revelado con DAB (color marrón oscuro). Tres meses tras el trasplante, las células inyectadas fueron capaces de generar tumores con patrones de migración similares a los GBM de origen. A. CMT procedentes del GBM A muestran una amplia migración por los haces de mielina, alcanzando el hemisferio contralateral. B y C. Ampliación de la zona correspondiente al estriado y el cuerpo caloso. D y E. Sección semifina correspondientes al estriado y el cuerpo caloso contrateñido con azul de toluidina. F. CMT procedentes del GBM B muestran una amplia migración por los haces de mielina, aunque más reducida que las células procedentes de la muestra GBM A. G y H. Ampliación de la zona correspondiente al estriado y el cuerpo caloso. I y J. Sección semifina correspondientes al estriado y el cuerpo caloso contrateñido con azul de toluidina. K. CMT procedentes del GBM C, se muestra una formación tumoral nodular con baja migración. L y M. Ampliación de la zona correspondiente al estriado y el cuerpo caloso. N. O. P. RM de los pacientes a los que corresponden las CMT que se inyectaron en ratón, N (GBM A), O (GBM B), P (GBM C), obsérvese que los patrones de migración se corresponden, en el GBM A, el tumor se disemina a través de cuerpo caloso, en el tumor B, se disemina en menor medida, en el tumor C, crece en forma nodular.

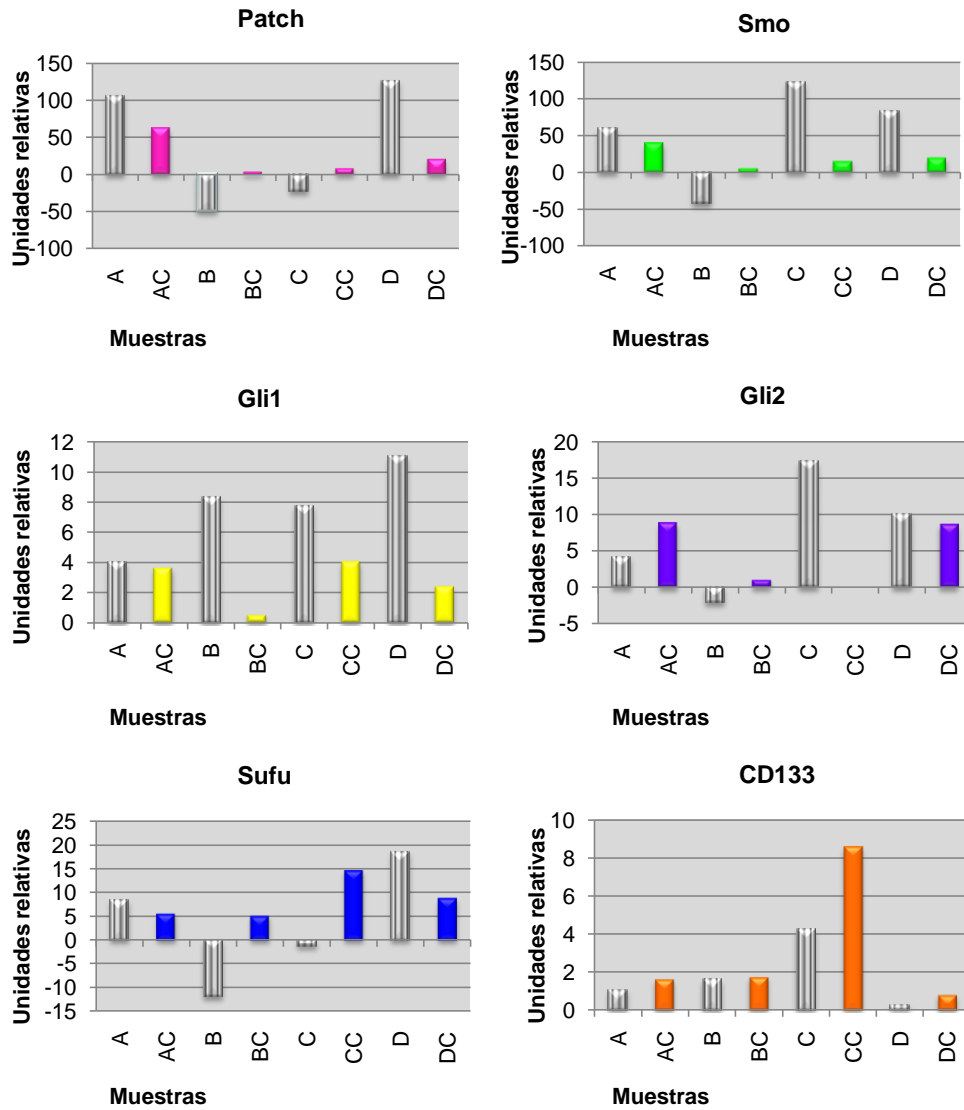
### ***Análisis comparativo de expresión de intermediarios de la ruta Hh-Gli entre la masa tumoral y las CMT durante el primer pase en cultivo***

Las células mitóticamente activas aisladas a partir de muestras frescas de GBM, demostraron responder a todas las características necesarias para ser catalogadas como líneas enriquecidas de células madre tumorales o células iniciadoras de tumores de GBM. Así pues, utilizamos dichas líneas para analizar los niveles de expresión de los diferentes intermediarios de la ruta de Hh-Gli y cotejar dichos resultados con los obtenidos para el total de la masa tumoral. Esta aproximación nos permite evaluar si dichas células son responsables de los niveles obtenidos mediante el análisis de la masa tumoral y, más importante, si el papel que desempeñan las alteraciones observadas en la expresión de intermediarios de la ruta de Hh-Gli en el total de la masa tumoral es similar en las CMT aisladas a partir de estas muestras y crecidas *in vitro*.

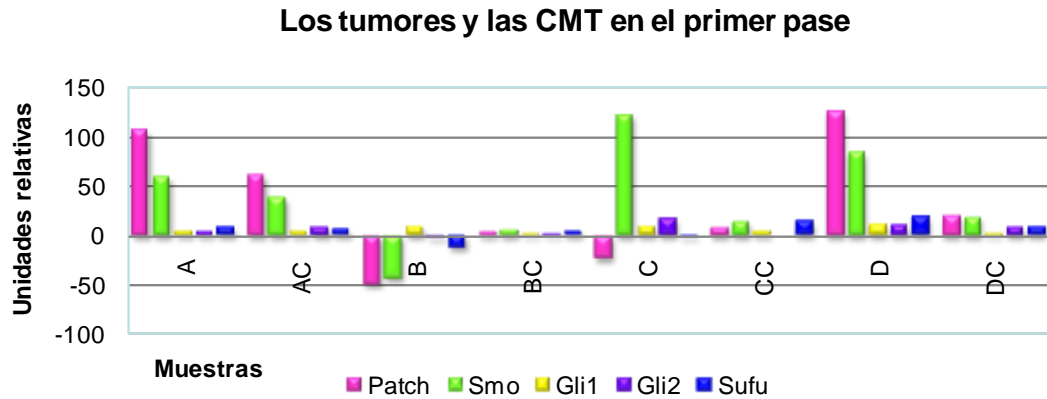
No podemos establecer un patrón de concordancia de los niveles hallados con el primer pase celular, aunque como se ha visto anteriormente, estos niveles aumentan con el tiempo en cultivo y es posible que el pase 0 no sea el más representativo. De este análisis concluimos que:

- CD 133 es mayor en células aisladas que en la masa tumoral.
- Gli1 es menor en el primer pase celular.

- Patch y Gli2 son mayores en CMT en 2 de los 4 tumores estudiados (**Tabla 6, Figuras 18 y 19**).



**Figura 18.** Los intermediarios de Hh-Gli estudiados en la masa tumoral (tras restar la media de los controles de SB) representados en gris (tumores A,B,C,D) y en el primer pase de CMT de estos mismos tumores (AC,BC,CC,DC).



**Figura 19.** Visión general de los tumores (A,B,C,D) y sus respectivos primeros pases 0 (AC, BC, CC, DC)

	Patch,c	Smo,c	Gli1,c	Gli2,c	Sufu,c	CD133,c
A	↓	↓	↓	↑	↓	↑
B	↑	↑	↓	↑	↑	↑
C	↑	↓	↓	↓	↑	↑
D	↓	↓	↓	↓	↓	↑

**Tabla 6.** Los intermediarios de Hh-Gli en la masa tumoral (A, B, C, D) en relación con el primer pase de CMT (c), aumento ↑ disminución ↓

***Análisis de expresión de intermediarios de la ruta de Hh-Gli en CMT durante los primeros pases en cultivo***

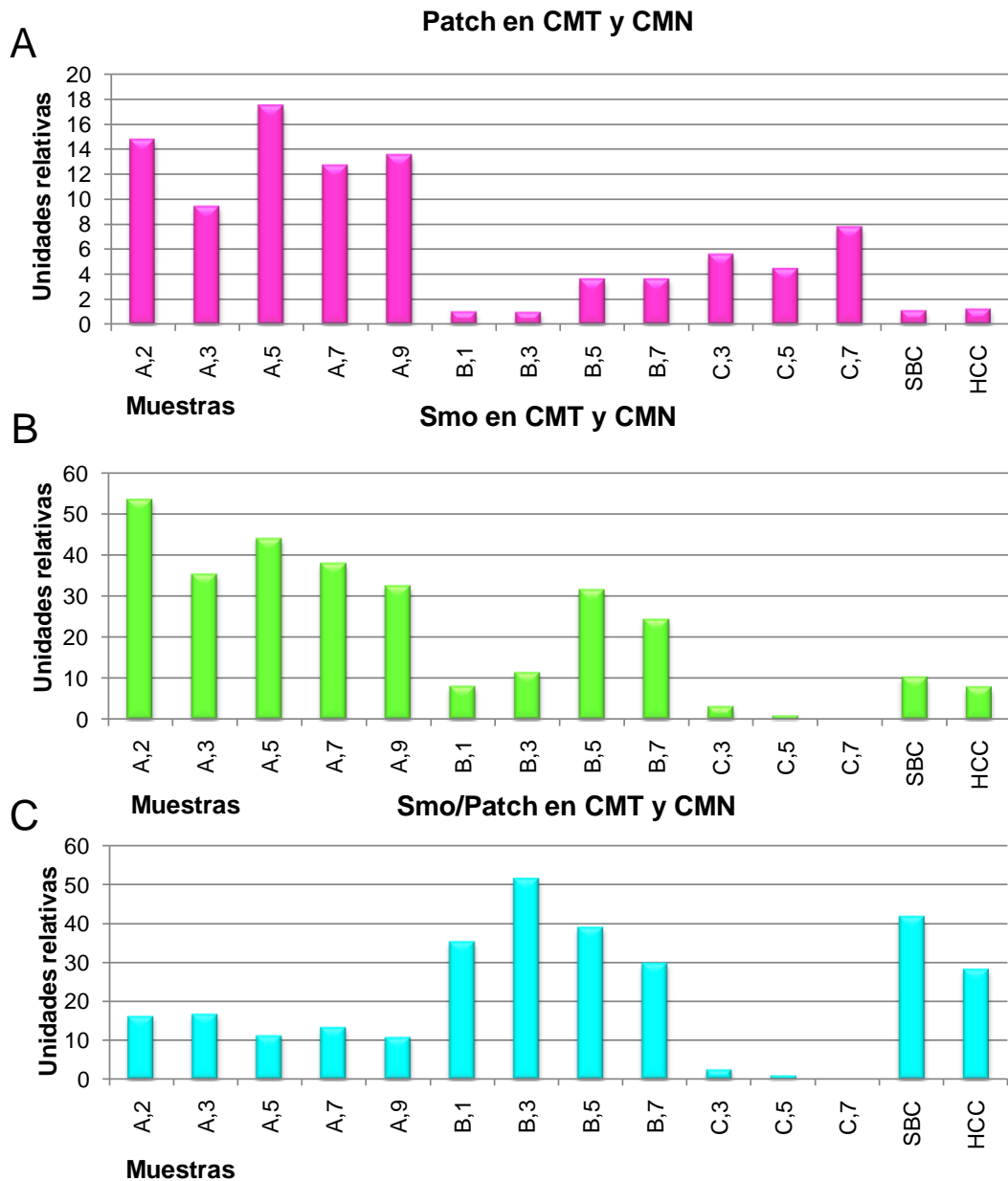
Con objeto de poder utilizar las líneas enriquecidas con CMT como modelo para estudiar el papel de la ruta de Hh-Gli en GBM estábamos interesados en evaluar si los niveles de expresión de los diferentes intermediarios de la ruta de Hh-Gli permanecían más o menos constantes a lo largo de los pases en cultivo o si por el contrario las condiciones de cultivo influían en dicha expresión. Así pues estudiamos la expresión de los diferentes intermediarios de la ruta de Hh-Gli, a lo largo de los primeros pases en cultivo. El tamaño de la muestra inicial condiciona en gran medida el número total de CMT de partida, por lo que no en todas las

líneas pudimos estudiar los mismos pases. Sin embargo, sí pudimos incluir en el estudio al menos 3 pases puntuales dentro de los 7 primeros pases para cada una de las 3 líneas obtenidas: GBMA, GBMB y GBMC . Como controles para determinar los niveles de expresión basales en células no tumorales, utilizamos líneas de células mitóticamente activas aisladas a partir de muestras quirúrgicas de parénquima subcortical humano (SB) e hipocampo (HC) de pacientes con epilepsia.

#### *Análisis de expresión de Patch y Smo*

En primer lugar, observamos que todas las líneas expresan mayor cantidad de Patch y Smo que los controles. La línea A en todos sus pases presenta una media de 5 veces más expresión de Patch que la línea B y 2 veces más que la línea C. Con respecto a Smo, las diferencias entre la línea A y el resto son aún más significativas, siendo 2,4 veces mayor que la línea B y 40 veces mayor que la línea C. La relación Smo/Patch que es prácticamente 1/1 en el caso de los controles se desequilibra a favor de Patch sobre todo en la línea A, aunque sigue habiendo mucha mayor cantidad de Smo que en los controles (**Figura 20**).

En cuanto a la evolución en los diferentes pases celulares, parece que hay fluctuaciones claras a lo largo de los pases, sin que se aprecie una tendencia clara de aumento o disminución de Patch y Smo común a las 3 líneas.



**Figura 20.** Gráfico A. Patch y su evolución en los distintos pases de tres líneas de CMT (A, B, C), el número de pase se indica con el número adyacente a la letra que designa al tumor. SBC es un cultivo de CMN de sustancia blanca, HCC cultivo de CMN de hipocampo. Gráfico B. Smo y su evolución en los distintos pases de tres líneas de CMT (A, B, C), y CMN. Gráfico C. Relación entre Smo y Patch y su evolución temporal en CMN y CMT.

#### *Análisis de expresión de los efectores Gli1 y Gli2*

Los niveles de expresión de los efectores de la ruta, Gli1 y Gli2, presentan fluctuaciones a lo largo de los pases en torno a valores más o menos constantes,



del mismo modo que sucedía con los valores de Patch y Smo. Sólo se observa un aumento en la expresión de Gli1 y Gli2, de aproximadamente 2,5 veces, entre los pases 2 y 3. En términos generales los valores de expresión de Gli1 se encuentran al mismo nivel que en los controles (línea A) o por debajo de los mismo (líneas B, 14 veces menos; línea C, 2,8 veces menos). Por el contrario, cuando analizamos los valores de expresión de Gli2 observamos que presenta niveles muy por encima de los controles en las líneas A y B , y ligeramente por debajo en la línea C.

Comparando con los controles, la relación de Gli1y Gli2, es claramente a favor de Gli1 en controles, mientras que se evidencia un claro desequilibrio a favor de Gli2 en la línea A y B, no así en C (**Figura 21**).

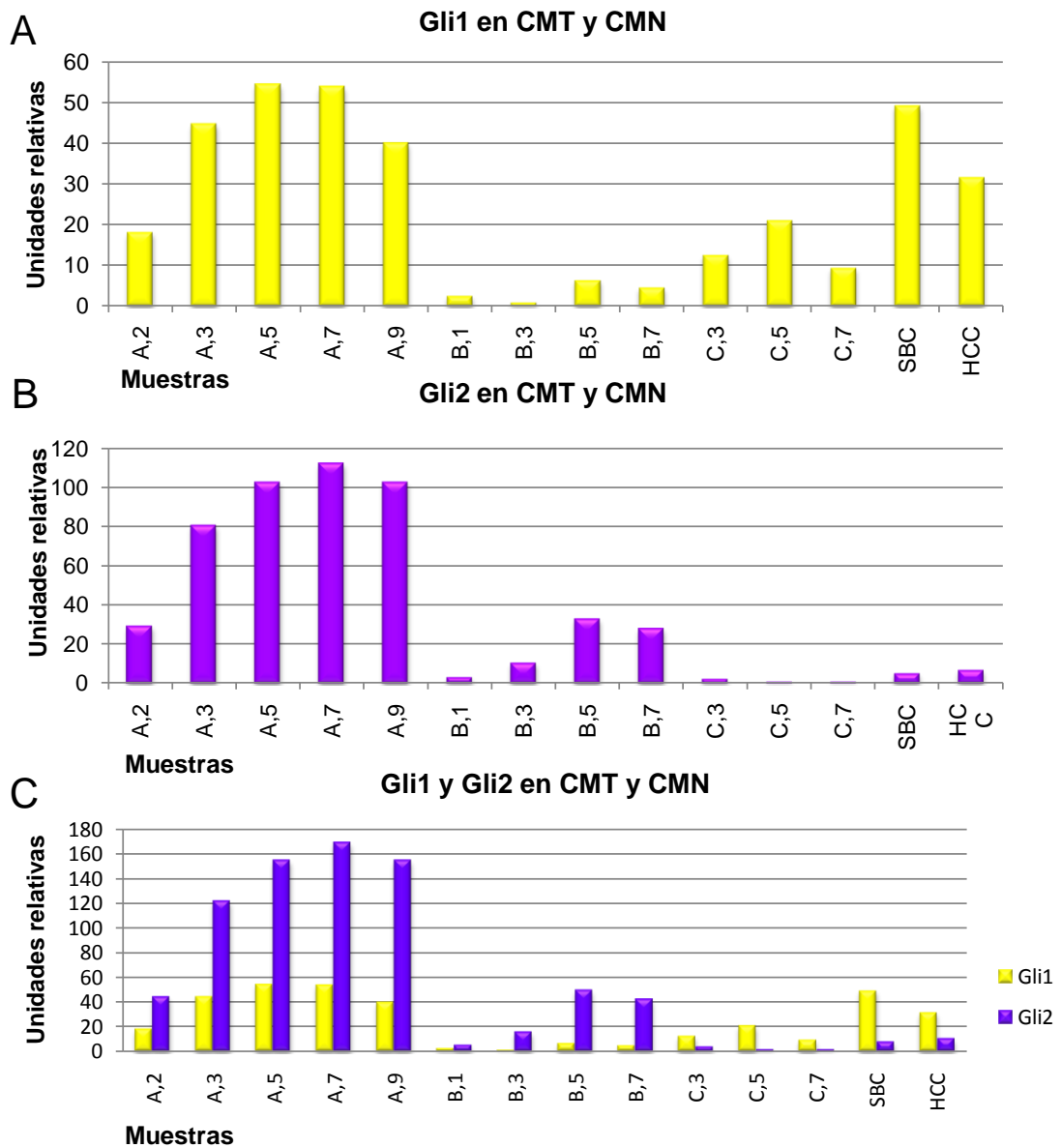
#### *Análisis de expresión del regulador Sufu*

Al igual que sucede con los valores de expresión del resto de intermediarios de la ruta Hh-Gli analizados, los valores de expresión de Sufu fluctúan ligeramente entre los diferentes pases. Sin embargo, estas fluctuaciones son mucho menos significativas. Todas las líneas presentan un valor promedio de expresión de Sufu a lo largo de los pases por debajo del valor promedio de los controles. (**Figura 22**).

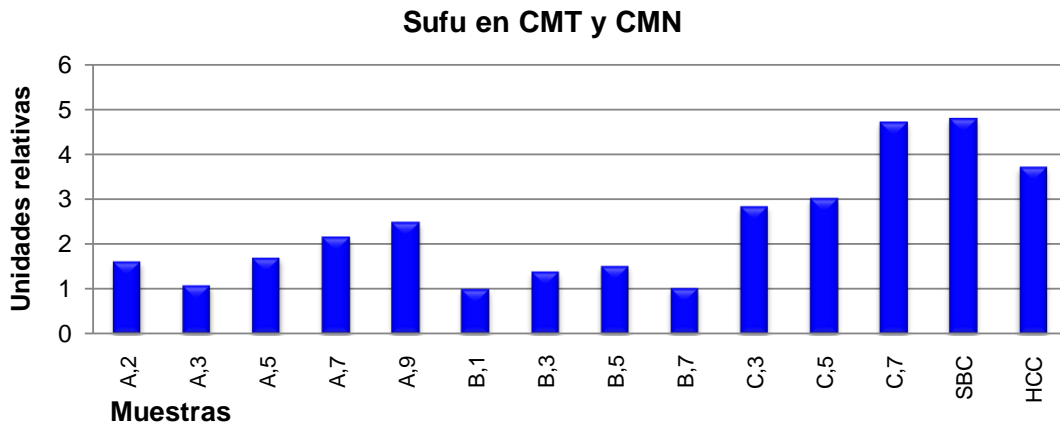
#### *Análisis de expresión de CD 133*

Como observamos previamente mediante RT-PCR, las líneas A y B presentan altos niveles de expresión de CD133 en pase 1 mientras que la línea C presenta niveles indetectables mediante RT-PCR y muy bajos mediante QRT-PCR. A partir del pase 1, los niveles de expresión caen dramáticamente en todas las líneas. (**Figura 23**).

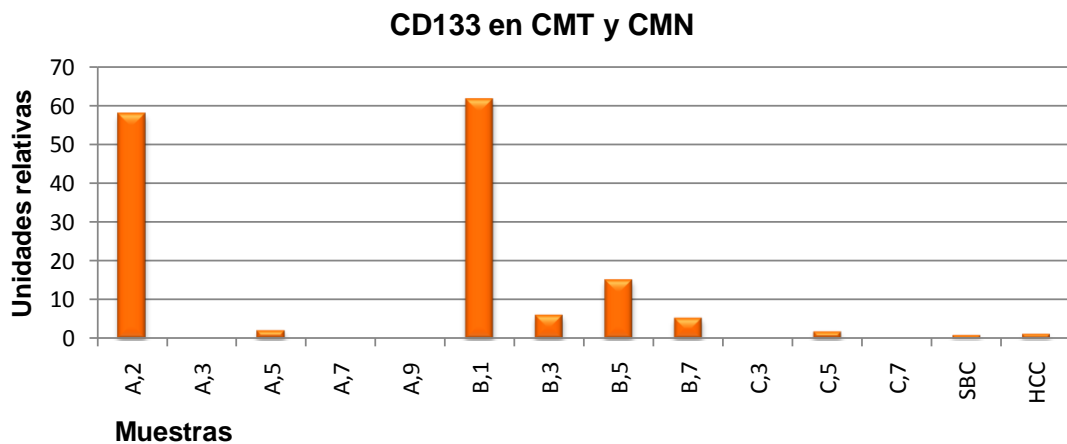




**Figura 21.** Gráfico A: Gli1 y su evolución en los distintos pases de tres líneas de CMT (A, B, C), el número de pase se indica con el número adyacente a la letra que designa al tumor. SBC es un cultivo de CMN de sustancia blanca, HCC cultivo de CMN de hipocampo. Gráfico B: Gli2 y su evolución en los distintos pases de tres líneas de CMT (A, B, C), y CMN. Gráfico C: Relación entre Gli1 y Gli2 y su evolución temporal en CMN y CMT.



**Figura 22.** Sufu y su evolución en los distintos pases de tres líneas de CMT (A, B, C), el número de pase se indica con el número adyacente a la letra que designa al tumor. SBC es un cultivo de CMN de sustancia blanca, HCC cultivo de CMN de hipocampo.



**Figura 23.** CD133 y su evolución en los distintos pases de tres líneas de CMT (A, B, C), y CMN. SBC es un cultivo de CMN de sustancia blanca, HCC cultivo de CMN de hipocampo.

## 7.7 Estudio estadístico clínico-biológico de la ruta Hh-Gli en los tumores gliales

### *Variables estudiadas*

Con objeto de estudiar la relevancia clínica de las alteraciones en los niveles de expresión de intermediarios de la ruta de Hh-Gli, llevamos a cabo estudios comparativos entre los resultados de expresión y parámetros clínicos. En este sentido, realizamos un primer análisis selectivo de los parámetros clínicos que se incorporarían en el estudio así como los criterios de obtención de dichos parámetros.

Se estudiaron 43 muestras correspondientes a 41 pacientes que participaron voluntariamente en el estudio que comenzó en agosto de 2007. No se incluyeron muestras a partir de octubre de 2009 para tener al menos 3 meses de seguimiento de cada paciente.

Se analizaron datos demográficos, clínicos, características del tumor mediante resonancia magnética (RM) y datos de seguimiento revisados por la autora en tres ocasiones diferentes para evitar errores de transcripción. Dichos datos se trataron con estricta confidencialidad garantizando el derecho a la intimidad del paciente y guardando el secreto médico durante todo el proceso. Se utilizó la información proporcionada por la aplicación informática Mizar y Luna del Hospital La Fe para la recogida de datos y en aquellos dudosos o que no constaban se solicitaron las historias clínicas documentales de los pacientes. Para el análisis de las variables clínicas y biológicas en el caso de recidivas se tuvieron en cuenta sólo las primeras muestras obtenidas de dichos pacientes.

En la **tabla 7** se pueden visualizar las diferentes variables clínicas y demográficas recogidas para el análisis.

VARIABLES DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS	CODIFICACIÓN
Edad al diagnóstico	edad en años al ingreso
Sexo	masculino/femenino
Clínica de debut	crisis/focalidad/hipertensión endocraneal
Tiempo de evolución de la clínica previo al diagnóstico	en meses
Karnofsky previo a la cirugía	≥80/<80
Karnofsky tras la cirugía	empeora/igual o mejor

**Tabla 7.** Variables demográficas y clínicas recogidas y su respectiva codificación para el análisis descriptivo y analítico.

Las variables referidas a la tumoración (por imagen y anatomía patológica) de los pacientes y su respectiva codificación se incluyen en la **tabla 8**.

VARIABLES TUMORALES	CODIFICACIÓN
Área elocuente	sí/no
Diámetro máximo	≥5cm/<5 cm
Presencia de nódulos satélites	sí/no
Diseminación por haces de sustancia blanca al diagnóstico	sí/no
Diseminación por haces durante la evolución	sí/no
Distancia al ventrículo	en mm
Radicalidad de la resección	parcial/total
Terapias complementarias	radio y quimioterapia/nada/otras
Anatomía patológica	GBM/AA/glioma de bajo grado
Origen del tumor	primario/secundario

**Tabla 8.** Variables tumorales recogidas y su respectiva codificación para el análisis descriptivo y analítico.

Las variables referentes a la evolución clínica de los pacientes se representan de forma esquemática en la **tabla 9**.

VARIABLES EVOLUTIVAS	CODIFICACIÓN
Supervivencia o seguimiento	Meses tras la cirugía
Meses libre de enfermedad	En casos de resección total
Causa del fallecimiento	Tumoral/no tumoral

**Tabla 9.** Variables evolutivas y su respectiva codificación para el análisis descriptivo y analítico.

### ***Estudio descriptivo***

#### **Variables demográficas**

##### *Sexo*

En cuanto al sexo, 23 pacientes son varones, 18 mujeres. Las 2 recidivas analizadas correspondieron a varones.

##### *Edad al diagnóstico*

Codificada como edad al ingreso en el departamento de Neurocirugía del Hospital Universitario La Fe en el pabellón de adultos (mayores de 14 años), la edad media de los pacientes fue de 59,75 años, rango (16-81 años).

#### **Variables clínicas**

##### *Clínica de debut*

9 pacientes debutaron con signos de hipertensión endocraneal, 23 con focalidad neurológica, 8 con crisis comiciales lo que condujo al diagnóstico por imagen mediante tomografía computarizada (TAC) y posterior RM.

##### *Tiempo de evolución de la clínica hasta el diagnóstico*

Los pacientes acudieron al hospital con clínica de 0,64 meses de evolución de media, rango (0-4 meses).

##### *Índice de Karnofsky (KPS) previo y posterior a la cirugía*

Se ha demostrado que el índice de Karnofsky pre y postquirúrgico es un factor pronóstico en el GBM.

En nuestro estudio, 37 pacientes presentaban un KPS  $\geq 80$  lo que indica un elevado nivel de autonomía y factor de buen pronóstico para la cirugía, posibilidad de administración de terapias complementarias y por tanto, mayor supervivencia.

El KPS posquirúrgico fue  $\geq 80$  en 34 pacientes, es decir 3 pacientes vieron empeorada su calidad de vida tras la cirugía.

### **Variables evolutivas**

#### *Mortalidad*

18 pacientes han fallecido en el momento de corte del presente estudio (enero 2010) de los cuales no se han podido obtener fechas de fallecimiento ni causa en 4 de ellos. En 11 de ellos está documentado el fallecimiento como consecuencia de la progresión tumoral. El intervalo de tiempo medio entre el diagnóstico de los pacientes fallecidos y la fecha del fallecimiento fue de 6,32 meses incluyendo los fallecimientos por causa no tumoral.

#### *Seguimiento*

Según la fecha de la cirugía oscila entre 3 y 24 meses.

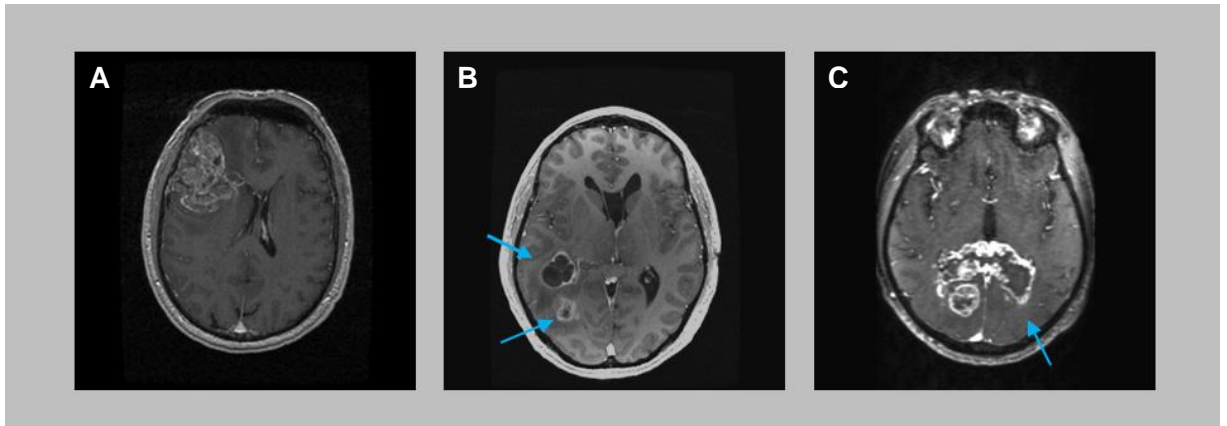
### **Variables relacionadas con la imagen (RM)**

#### *Área elocuente*

19 tumores asentaban en áreas elocuentes consideradas las siguientes: sensorio-motora, del lenguaje, visual, ganglios basales, tálamo e hipotálamo, cápsula interna, tronco cerebral, pedúnculos cerebelosos.

#### *Diámetro máximo*

Dado que los tumores mayores de 5 cm de diámetro máximo al diagnóstico constituyen un subgrupo de mal pronóstico, se codificaron como tales según su diámetro mayor en RM T1 con contraste 19 de ellos.



**Figura 24.** Imágenes de resonancia con contraste (Gadolinio) con distintos patrones de GBM.

- A. GBM, patrón de una sola masa abigarrada captante de contraste
- B. GBM, patrón con dos nódulos satélites (flechas).
- C. GBM, patrón con infiltración de haces de sustancia blanca (cuerpo calloso, flecha)

#### *Nódulos satélites*

11 pacientes presentan una o varias lesiones adyacentes a la principal y en todos ellos se establece por tanto el diagnóstico diferencial entre tumor primario y metástasis (**Figura 24**).

#### *Diseminación por los haces de sustancia blanca*

Se ha considerado como diseminación, la clara invasión de grandes haces de sustancia blanca (cuerpo calloso, vía piramidal, etc...) en la RM en secuencia T1 con contraste informada por un radiólogo perteneciente al Servicio de RM del Hospital La Fe con más de 5 años de experiencia y posteriormente comprobada de forma individual. No se han considerado diseminación la edematización en secuencia T2 ni brillos en la secuencia de difusión (**Figura 24**).

#### *Distancia al ventrículo*

Se ha estudiado este parámetro por su posible relación con la ruta Hh-Gli dada la implicación de la misma en la fisiología de las células endimarias, se ha realizado una medición en mm en cortes axiales desde la zona más próxima al ventrículo.

#### *Resección total*

Depende de la elocuencia del área en la que se asiente el tumor, la diseminación contralateral a través del cuerpo caloso y factores intraoperatorios y se ha demostrado que es un factor que aumenta la supervivencia. La radicalidad de resección se pudo documentar en todos los casos gracias a la realización de RM posquirúrgicas en las primeras 72 horas tras la cirugía como parte del protocolo intrahospitalario aprobado por el Comité de Neurooncología del Hospital la Fe.

### ***Estudio analítico***

Previamente al análisis se comprobó que ninguna de las variables biológicas Patch, Smo, Gli1, Gli2, Sufu, CD133 podían considerarse como normales ya que alcanzaron la significación estadística en la prueba de Kolmogorov-Smirnov. La única variable cuantitativa en la que se puede asumir normalidad es la edad al diagnóstico. Por tanto el análisis se realizó aplicando pruebas no paramétricas, menos potentes para detectar diferencias que las paramétricas.

### **Correlaciones entre los intermediarios en tejido tumoral y controles**

Se han estudiado las posibles correlaciones entre cantidades de transcritos de los intermediarios de Hh-Gli en tejido tumoral y CMT con el objetivo de compararlos con las correlaciones halladas en el tejido no tumoral.

En cuanto a los controles, dado que para el análisis de correlaciones no se consideran cantidades sino relaciones ya sean lineales o no, se han incluido en el análisis las muestras de hipocampo, ya que se consideran tejido no tumoral y no hay evidencia de alteración de la ruta en pacientes epilépticos.

En la **tabla 10** se pueden visualizar las diferentes correlaciones significativas, las cuales son todas positivas en tumores. Los supresores de la ruta estudiados, Patch y Sufu presentan una fuerte correlación que se mantiene aunque en menor medida en los controles situándose en ellos al límite de la significación. Podemos afirmar que cuando aumenta o disminuye un supresor, en tumores esto se relaciona con una variación en el mismo sentido del otro. Patch y Smo se correlacionan positivamente en tumores y CMT pero no en controles en los que tiende a ser una correlación negativa, aunque no es significativa (**Tablas 11 y 12**).

En cuanto a la parte efectora de la ruta, Smo que comienza la cascada de Hh-Gli tras la unión de Hh, se ha podido correlacionar positivamente con Gli1 Gli2 en tumores y CMT, sin embargo, no somos capaces de detectar dicha relación en tejido no tumoral. Hay una correlación interesante en tumores de Smo con Sufu, un



activador y supresor, que no encontramos en tejido sano. Las ratios activador/inhibidor se muestran como relacionadas en tumores, no así en controles.

Los controles presentan una relación de efectores entre sí, Gli1 y Gli2, que también encontramos en CMT, no en tejido tumoral (**tabla 10**). En cuanto a CD133 y efectores, el coeficiente de correlación es positivo en controles y de signo negativo en CMT en cuanto a Gli1 (**Tabla 11 y 12**).

COMPONENTES RUTA	SIGNIFICACIÓN	CORRELACIÓN
Patch y Sufu	,000	,735
Patch y Smo	,000	,520
Smo y Gli1	,001	,490
Smo y Gli2	,011	,360
Smo y Sufu	,001	,481
Gli1 y Smo/Patch	,021	,365
Smo/Patch y Gli1/Sufu	,000	,557

**Tabla 10.** Resultados de las distintas correlaciones significativas de los distintos intermediarios de la ruta Hh-Gli en tumores (test Rho de Spearman).

#### Estudio de los controles entre sí (SB, SG, HC)

COMPONENTES RUTA	SIGNIFICACIÓN	CORRELACIÓN
Patch y Sufu	,048	,580
Gli1 y Gli2	,002	,804
Gli1 y CD133	,004	,762
Gli2 y CD133	,003	,782

**Tabla 11.** Resultados de las distintas correlaciones significativas en controles (SB, SG e HC) (test Rho de Spearman).

### Estudio en las CMT

COMPONENTES RUTA CÉLULAS	SIGNIFICACIÓN	CORRELACIÓN
Patch y Smo	,003	,688
Patch y Gli1	,000	,838
Patch y Gli2	,006	,653
Patch y CD133	,022	-,566
Smo y Gli1	,008	,638
Smo y Gli2	,000	,862
Gli1 y Gli2	,024	,562
Gli1 y CD133	,046	-,506
Smo/Patch y Sufu	,015	-,594
Smo/Patch y CD133	,014	-,599
Gli1/Sufu y Patch	,000	,791
Gli1/Sufu y Smo	,000	,788
Gli1/Sufu y Gli2	,006	,659
Gli2/Sufu y Patch	,013	,603
Gli2/Sufu y Smo	,000	,821
Gli2/Sufu y Gli1	,035	,529

**Tabla 12.** Resultados de las distintas correlaciones significativas en CMT (test Rho de Spearman).

### Variables clínico-biológicas

En cuanto a las variables clínicas analizadas y su relación con los diferentes componentes de la ruta, obtenemos algunos resultados muy interesantes que pueden marcar nuevas líneas de investigación en gliomas de alto grado.

Se utilizaron de nuevo test no paramétricos para analizar las diferentes variables, todas las que están representadas en la **tabla 13** corresponden a variables de agrupación dicotómicas, tras la aplicación de la U de Mann Whitney. Se muestran las correlaciones estadísticamente significativas  $p < 0,05$ .

Los tumores de mayor tamaño, codificado como  $\geq 5\text{cm}$  en alguno de sus diámetros, se relacionaron con niveles elevados de Smo. Curiosamente, Sufu, supresor de tumor, se encuentra más elevado en tumores diseminados al diagnóstico considerando tal diseminación como claramente visible, informada por el radiólogo y posteriormente comprobada en las secuencias T1 con contraste,

$p=0,010$ . Durante la evolución a lo largo de meses, determinados tumores siguen creciendo en forma de nódulos y otros crecen y se diseminan, si aplicamos de nuevo el test, no se observa tal significación  $p=0,077$ . Si calculamos el ratio de efector/supresor, en este caso Gli2/Sufu, un ratio más bajo, es decir, a expensas de Sufu elevado o bien Gli2 disminuido, se relaciona con mayor diseminación con menor posibilidad de error  $\alpha$ ,  $p=0,003$ . A falta de ajustar con otros factores pronósticos, el fallecimiento en menos de 6 meses se relaciona con Gli2/Sufu bajo. No se realiza dicho ajuste ya que no se ha podido determinar la causa del fallecimiento en 4 pacientes y lo consideramos una pérdida de datos excesiva, por tanto exponemos los datos de mortalidad a nivel informativo a la espera de un estudio más exhaustivo con una serie clínica mayor.

Tenemos tan sólo 4 tumores considerados de bajo grado, por tanto las significaciones obtenidas deben analizarse con cautela, parece que los tumores de bajo grado presentan niveles más elevados de Gli1, Smo/Patch y Gli1/Sufu.

VARIABLE	SIGNIFICACIÓN	SIGNIFICADO
Smo y tamaño tumoral	0,034	Niveles mayores tumores de mayor tamaño
Sufu y diseminación al diagnóstico	0,010	Niveles mayores mayor diseminación
Gli2/Sufu y diseminación al diagnóstico	0,003	Los diseminados ratio más bajo
Bajo/alto grado con Gli1	0,016	Los de bajo grado más alto Gli1
Bajo/alto grado con Gli1/Sufu	0,041	Los de bajo grado más alto Gli1/Sufu
Bajo/alto grado con Smo/Patch	0,038	Los de bajo grado más alto Smo/Patch
Fallecimiento por tumor en <6m con el resto y Gli2/Sufu	0,011	Los fallecidos ratio más bajo

**Tabla 13.** Resultados significativos tras el análisis de variables clínico-biológicas en tumores. (test U de Mann-Whitney).

### Estudio de controles y tumores por separado

Estudiamos las diferencias entre controles y tumores en cuanto a niveles de Hh-Gli mediante la U de Mann-Whitney. Observamos unos niveles mayores de forma significativa de los tumores con respecto a los controles de SB, tanto para

Gli1 como para Gli2. También predomina Gli1 con respecto a Sufu y Smo con respecto a Patch.

Cuando consideramos todos los controles de cerebro sano, tanto sustancia blanca como gris, obtenemos que Smo es también mayor en tumores de forma significativa. No se han considerado HC en este análisis por considerar que sus niveles de transcrito podrían estar infravalorados por la esclerosis (**Tabla 14**).

VARIABLE	SIGNIFICACIÓN	SIGNIFICADO
Tumores con SB y Gli1	,002	Gli1 mayor en tumores
Tumores con SB y Gli 2	,028	Gli2 mayor en tumores
Tumores con SB y Gli1/Sufu	,012	Gli1/Sufu mayor en tumores
Tumores con SB y Smo/Patch	,010	Smo/Patch mayor en tumores
Tumores con SG y Smo/Patch	,003	Smo/Patch mayor en tumores
Tumores con SB y SG y Smo	,020	Smo mayor en tumores
Tumores con SB y SG y Smo/Patch	,000	Smo/Patch mayor en tumores

**Tabla 14.** Resultados significativos tras el análisis de los niveles de transcrito de intermediarios de la ruta Hh-Gli en tumores en comparación con controles de SB y/o SG (test U de Mann-Whitney).

### VARIABLES DICOTÓMICAS ENTRE SÍ

En nuestra serie encontramos también diversas relaciones entre variables clínicas entre sí que son consistentes con series publicadas puramente clínicas con un mayor número de pacientes como una mayor mortalidad a 6 meses con radicalidad de la resección (ver discusión). También encontramos que los tumores de mayor tamaño se relacionan con una menor distancia a la pared ventricular (**Tabla 15**).

Con respecto a la diseminación por haces, parece relacionarse con una mayor mortalidad y menor resección tumoral posible, lo cual concuerda con la impresión clínica en estos pacientes.

VARIABLE	SIGNIFICACIÓN	SIGNIFICADO
Tamaño tumoral con distancia al ventrículo <0>5mm	,007	Mayor tamaño menor distancia
Mortalidad a 6m con resección	,009	Mayor mortalidad si menor resección
Diseminación haces previa con resección	,007	Menor resección si diseminación
Mortalidad a 6 m con distancia a ventrículo 0 o >0	,040	Mayor mortalidad con menor distancia
Mortalidad a 6 meses con diseminación haces	,039	Mayor mortalidad si diseminación

**Tabla 15.** Resultados significativos tras el análisis de variables dicotómicas (test Chi-cuadrado o test exacto de Fisher).

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo, hemos estudiado en detalle la expresión de intermediarios de la ruta de Hh-Gli en una serie de 43 gliomas. Los resultados nos han permitido obtener una visión general del papel de dicha ruta en la biología de los gliomas, así como un probable modelo de disregulación en estos tumores. El estudio de variables clínicas nos ha conducido a poder establecer relaciones estadísticamente significativas entre niveles de expresión altos de Sufu con mayor diseminación del tumor, mayor tamaño de la masa tumoral con niveles elevados de Smo y, a falta de confirmación tras el ajuste de distintas variables en una serie mayor, los análisis preliminares apuntan a que alteraciones de Hh-Gli podrían relacionarse con un fallecimiento precoz.

### 8.1 Influencia en los resultados de una adecuada elección de controles

Estudios publicados previamente concluyeron que la ruta de Hh-Gli no tenía un papel relevante en la biología del GBM<sup>109</sup>. Estos estudios utilizaban como controles muestras de tejido de cerebelo humano, los cuales pueden alterar el resultado final por un doble motivo: en esta región la ruta de Hh-Gli presenta una actividad importante y además, casi todos los GBM se originan en parénquima cerebral y no cerebeloso. Otros autores, sin embargo, han considerado como controles parénquima cerebral de pacientes con meningiomas angiomatosos, neuroepiteliomas e incluso oligoastrocitomas lo que puede representar un problema, ya que una histología normal no descarta por completo infiltración tumoral en pacientes con tumores cerebrales<sup>133</sup>. La edad es otro factor a tener en cuenta con respecto a la elección de controles, ya que pacientes muy jóvenes pueden mantener las rutas de desarrollo activas y, por tanto, presentar valores de expresión de los intermediarios de la ruta de Hh-Gli diferentes a los de un tejido normal adulto y dar como resultado una infravaloración de la expresión en GBM<sup>133</sup>.

En nuestro estudio, utilizamos como controles de cerebro normal adulto 8 muestras de parénquima cerebral, tanto sustancia gris como blanca. Estas muestras proceden del lóbulo temporal de pacientes con esclerosis mesial documentada que fueron intervenidos para la realización de amigdalohipocampectomía como control de epilepsia fármacorresistente. No hay evidencia de que el lóbulo temporal en la parte lateral presente alteraciones, sino que su extirpación es consecuencia del abordaje para conseguir la resección de las estructuras mesiales<sup>134</sup>. Son pacientes adultos sin evidencia de enfermedad tumoral y las muestras fueron extraídas de zonas alejadas de hipocampo y de zona ventricular. Además, no se han documentado en la bibliografía alteraciones de la ruta Hh-Gli en los pacientes epilépticos ni en modelos animales de epilepsia.

Como controles positivos utilizamos hipocampos de pacientes a los que se les realizó este mismo procedimiento por esclerosis mesial del lóbulo temporal que condicionaba crisis epilépticas, por tanto pensamos que los niveles de expresión de la ruta de Hh-Gli pueden estar infravalorados en estos controles ya que presentan por su patología un elevado componente gliótico, pérdida neuronal y por tanto baja actividad de los precursores neurales. De hecho, en cultivo han mostrado lenta capacidad proliferativa, más baja incluso que la documentada (datos no



mostrados)<sup>135</sup>. Los controles de hipocampo se han tenido en cuenta sólo a modo de comparación visual y como controles positivos de la ruta considerando una elevada activación en personas sanas por la presencia de mayor número de CMN. Sin embargo, estos hipocampos escleróticos han sido empleados para analizar las correlaciones de los distintos componentes de la ruta Hh-Gli ya que una supuesta disminución de la actividad con respecto a hipocampos sanos, no necesariamente implicaría la pérdida de relaciones entre los transcritos en este tejido no tumoral.

Con respecto a los estudios realizados sobre células iniciadoras de tumores, de forma consistente con el análisis realizado con las muestras de tejido tumoral, hemos utilizado como controles células mitóticamente activas aisladas del parénquima subcortical de pacientes con esclerosis mesial, por tanto no tumoral, así como células procedentes de la zona hipocampal.

Entendemos que el tejido más apropiado para ser utilizado como control correspondería a muestras frescas de tejido cerebral sano adulto. Sin embargo, dado que se trata de tejido cerebral, no es posible disponer de tales muestras, por lo que la utilización de muestras quirúrgicas de pacientes con esclerosis mesial, supone una alternativa inmejorable para poder comparar niveles de expresión de diferentes intermediarios de la ruta de Hh-Gli con valores correspondientes a tejidos adultos no tumorales.

## 8.2 La ruta de Hh-Gli en el tejido tumoral

En base a los resultados obtenidos, podemos afirmar que la ruta Hh-Gli en nuestra serie de tumores cerebrales gliales, principalmente GBM, presenta importantes alteraciones en cuanto a la expresión de diferentes intermediarios cuando se comparan con muestras equivalentes no tumorales. De las 43 muestras de tumores analizadas, hemos encontrado niveles de expresión de intermediarios de la ruta de Hh-Gli por encima de los obtenidos en las muestras control en un total de 26, lo que supone más del 60%. El análisis de expresión, sin embargo, tiene importantes limitaciones, dado que sólo medimos cantidades de mRNA, lo que no siempre es equiparable a cantidad de proteína funcional. Por otro lado, la regulación de la ruta de Hh-Gli se lleva a cabo en múltiples niveles que implican además la interacción con otras rutas, como ya se describió en el apartado de introducción. Sin embargo, a pesar de las mencionadas limitaciones, el análisis pormenorizado de los niveles de expresión de intermediarios de la ruta de Hh-Gli en

relación con parámetros clínicos de los pacientes, nos ha permitido definir subgrupos de tumores e identificar nuevos marcadores con valor diagnóstico y pronóstico.

### ***Patch y Smo***

Un 72% de los tumores, presentan niveles de expresión de Patch inferiores a los de los controles, mientras que Smo presenta niveles superiores a los controles en el 62% de los tumores. En conjunto, el 95,3% de los tumores presentan una combinación de niveles bajos de Patch y altos de Smo en relación a la media de los controles de SB y SG. Esta relación Smo/Patch elevada comparada con los controles podría indicar un nivel de activación de la ruta en tumores gliales superior a los tejidos equivalentes no tumorales. Como control positivo, uno de los hipocampos (HC4) presenta una relación elevada. Niveles elevados de Smo se han podido relacionar en esta serie con un tamaño tumoral mayor ( $\geq 5$  cm), variable clínica que además se ha relacionado en estudios anteriores con mal pronóstico<sup>136</sup>. Del estudio analítico concluimos que los niveles de Smo son mayores de forma estadísticamente significativa en tumores con respecto a SB y SG. Aunque no somos capaces de demostrar significación con Patch, sin embargo, es importante destacar que la relación Smo/Patch se encuentra elevada en tumores con una  $p=0,000$ . Es cierto que ambos intermediarios se correlacionan entre sí de forma positiva en tumores, lo cual podría significar que Patch aumenta junto con Smo pero de forma insuficiente en cada tumor. Por tanto, estamos ante un componente de Hh-Gli con una probable implicación notable en la fisiopatología de los tumores gliales y que abre las puertas a la investigación con nuevos fármacos antagonistas de Smo con resultados preliminares prometedores como por ejemplo en un caso documentado en MB<sup>115</sup>.

### ***Gli1 y Gli2***

A la vista de los resultados, no compartimos la idea de algunos autores que afirman que el único componente fiable en cuanto a niveles de expresión de la ruta es Gli1<sup>109</sup>, en cuanto a efectores, Gli2 presenta niveles elevados en más de la mitad de los tumores con respecto a los controles. Lo cierto es que la implicación de Gli2 es difícil de interpretar ya que ha sido implicado tanto en activación como en

inhibición y no estudiado en tumores gliales<sup>137-138</sup>. Serán necesarios más estudios para establecer la implicación de Gli2 en la biología de los tumores gliales.

Con respecto a los efectores de la ruta, Gli1 está elevado de forma estadísticamente significativa en el grupo de tumores con respecto a los controles de SB, pero no así de SG, al igual que Gli2. Este resultado es interesante, dado que la sustancia blanca supratentorial se supone el origen de los tumores gliales<sup>2</sup>. No se ha podido demostrar estadísticamente qué diferencias existen en cuanto a los diferentes componentes de Hh-Gli entre SB y SG, ya que al pertenecer a 4 pacientes, de los que se extraen 8 muestras (4 SB y 4 SG) utilizamos un test para datos apareados (Wilcoxon) que precisa mayor  $n$  para detectar diferencias. Sin embargo, encontramos una clara tendencia si analizamos los mismos datos como no apareados (U de Mann-Whitney) y obtenemos diferencias significativas  $p=0,029$  para Gli1, Gli2 y Sufu siendo los niveles de transcritos mayores en SG que en SB. En este estudio se pretende ser lo más restrictivo posible en las afirmaciones, por ello se han tenido en cuenta para los análisis gráficos y la mayor parte de estadísticos el conjunto de controles de SB y SG a pesar de que podríamos estar infravalorando diferencias.

Los datos de nuestra serie permiten establecer diferencias significativas en el grupo de tumores de bajo grado con respecto al total de los de alto grado en cuanto a que estos últimos presentan niveles elevados de Gli1, mayor ratio Smo/Patch y Gli1/Sufu. Sin embargo, la pequeña  $n=4$  en el grupo de bajo grado deja para posteriores estudios la comprobación y consistencia de dichos datos. Más interesante será el estudio de la recidiva de dichos tumores en su evolución a alto grado para saber si pertenecen al subgrupo de GBM que expresan elevados niveles de intermediarios de la ruta o no.

### ***Sufu***

Sufu ha sido un intermediario menos estudiado previamente de la ruta Hh-Gli, en relación con tumores gliales. Sin embargo, su función como supresor de tumor y la regulación de los efectores por mecanismos no bien establecidos, lo convierten en uno de los componentes más relevantes en la ruta. En *Drosophila*, mutaciones que implican pérdida de función de Sufu suprimen la falta del fenotipo Fu, sin embargo también se ha demostrado la restricción de la actividad de Ci cuando la proteólisis está bloqueada por la unión directa de Sufu a Ci, por tanto

Sufu también podría actuar como regulador último para prevenir la traslocación de Ci cuando otros mecanismos inhibidores son deficientes<sup>26, 139-140</sup>. No hay un patrón de aumento o disminución clara en cuanto al tejido tumoral y los controles, un subgrupo presenta elevados niveles mientras que otro presenta bajos niveles de Sufu. De hecho, no se detectan diferencias significativas en cuanto a los niveles de Sufu y los controles. Sin embargo, los tumores diseminados claramente en las secuencias T1 con contraste, presentan unos niveles mayores de Sufu  $p=0,010$  que los aparentemente no diseminados. Es interesante destacar que un ratio Gli2/Sufu bajo se relaciona con mayor diseminación  $p=0,003$  por lo que tanto el efector Gli2, como Sufu son parámetros interesantes para el estudio de la diseminación.

Asumimos que hay células y microinfiltración tumoral a través de los haces de sustancia blanca tumoral en todos los tumores por su misma naturaleza infiltrativa y agresiva, sin embargo, clínicamente la diseminación macroscópica es un dato muy característico e importante. Otras secuencias de RM, por ejemplo difusión, serían más sensibles para detectar infiltración sutil, sin embargo, nuestro interés se centra en aquellas características que implican una actitud clínica determinada en el paciente. La infiltración extensa contralateral a través de cuerpo caloso o a través de cápsula interna, tiene un significado clínico inmediato de limitación de la resección tumoral, cuya radicalidad influye en el pronóstico<sup>141</sup>. La secuencia de tensor de difusión, que se proponía como una herramienta importante para detectar e incluso cuantificar la destrucción, infiltración o desplazamiento de los tractos ha demostrado limitaciones importantes en cuanto a su fiabilidad. De hecho, en un estudio reciente, la secuencia de tensor de difusión no fue capaz de diferenciar entre edema debido a tumores extraaxiales y por tanto no infiltrantes como meningiomas, de la infiltración por GBM<sup>142</sup>. Tan sólo un parámetro propuesto en un estudio, el Fiber Density Index, parece ser válido para cuantificar destrucción de tractos sin estar validado por el momento por otros estudios<sup>143-144</sup>.

El dato no observado previamente de Sufu, Gli2/Sufu y diseminación macroscópica, da lugar a múltiples cuestiones sin resolver. El locus de Sufu se ha visto deletado en GBM, cáncer de próstata, melanoma, y endometrio. Es un supresor de tumor, regulador negativo de Gli, se une a él, lo inactiva y aumenta su degradación; además, también es inhibidor de la ruta de Wnt. Se ha visto su pérdida en meduloblastomas y rhabdomyosarcomas y es indetectable en cáncer de próstata cuando es altamente maligno<sup>145-146</sup>. Todo ello, en principio, contradice los hallazgos de este estudio. Nos planteamos varias opciones para explicarlo: que

corresponda a un fenómeno de retroalimentación negativa, que represente una sobreexpresión como intento de inhibir la activación de las rutas que controla como Hh y Wnt ( podría haber un aumento de la activación además de un aumento de la transcripción que es lo que hemos determinado en el estudio) o bien Sufu podría tener un doble papel como inhibición de la proliferación y, en determinados casos, permitir una mayor migración a través de los haces de mielina. A favor de esta hipótesis está el hecho de que se ha demostrado en células de cáncer colorrectal que la sobreexpresión de Sufu conduce a un aumento de la  $\beta$ -catenina citoplasmática, reduciendo los niveles de  $\beta$ -catenina nuclear<sup>147</sup> y por tanto la expresión de moléculas como N-cadeninas. Este efecto se relaciona con una mayor migración celular al menos en células epiteliales<sup>148</sup>. Así pues, pensamos que Sufu podría tener una doble función dependiendo del tejido; como supresor de tumores en relación con su inhibición de Gli y como potenciador de la migración bloqueando  $\beta$ -catenina en el citoplasma. Esta doble función de Sufu será objeto de estudios en futuros trabajos.

### ***Estudio comparativo de expresión de intermediarios de Hh-Gli y CD133***

Si bien recientemente se han identificado un número de marcadores presentes en subpoblaciones con características de CMT a partir de muestras de GBM humano como SSEA-1, ALDH1, A2B5, o ABCG2<sup>149-154</sup>, lo cierto es que no existe hasta el momento ningún marcador que permita identificar de forma inequívoca a las células iniciadoras de glioblastoma. No obstante, CD133 fue el primer marcador utilizado que permite marcar la subpoblación enriquecida de CMT en un número importante de MB y GBM, por lo que decidimos utilizarlo al comienzo del presente trabajo con objeto de observar algún tipo de relación entre la sobreexpresión de intermediarios de la ruta de Hh-Gli y el contenido de células CD133+.

En este sentido, ningún componente de la ruta se relacionó de forma estadísticamente significativa con los niveles de CD133, como tampoco características clínicas. No se ha podido demostrar que los niveles de CD133 en los tumores sean mayores que en controles, quizá por limitaciones debidas al fragmento de tumor estudiado, que podría no ser representativo del resto del tumor o porque efectivamente, el contenido de CD133 no es un buen indicador para cuantificar el contenido en CMT. Hay numerosas evidencias de que en GBM se pueden aislar CMT CD133- a pesar de lo que se creía inicialmente, lo que limita la

utilidad de la citometría de flujo con CD133 para aislar y cuantificar una muestra representativa de las CMT a partir de muestras quirúrgicas de tumores gliales<sup>155</sup>. La proporción de células CD133+ se relacionó con un peor pronóstico en una serie de pacientes<sup>156</sup>, además parecen relacionarse con una mayor resistencia a quimio y radioterapia<sup>157-158</sup>. Sin embargo, en nuestra serie, no pudimos confirmar esta relación. En este sentido, habrá que hacer un mayor esfuerzo para poder indentificar la heterogeneidad de CMT presentes en un mismo tumor y entre diferentes tumores y su papel real en el inicio y desarrollo del tumor si queremos trasladar con éxito dichos conocimientos a la práctica clínica.

### 8.3 El comportamiento de las células en cultivo y Hh-Gli

Uno de los objetivos de este estudio es la comparación entre la masa tumoral y la subpoblación de CMT que se pueden aislar en cultivo, así como las diferencias con el tiempo en cultivo en cuanto a la expresión de los intermediarios de la ruta Hh-Gli.

Hemos obtenido tres líneas celulares en cultivo con características de células madre tumorales o células iniciadoras de GBM, y las hemos analizado al menos hasta pase 7. Es muy llamativo que la morfología que adoptan los tumores durante el crecimiento en ratón, tanto nodular como infiltrante a través de los haces de sustancia blanca es muy similar a la imagen por RM de los pacientes a los que pertenece la muestra en cada una de las tres series. Este hecho indica que, al menos en lo referente al comportamiento *in vivo*, recuerdan al tumor de origen y pueden por tanto, ser consideradas como buenos modelos de cada tipo de GBM.

Al igual que observamos para el caso de los estudios realizados sobre la masa tumoral, los niveles de expresión de los diferentes intermediarios de la ruta de Hh-Gli varían considerablemente entre muestras de líneas celulares de CMT. Esto significa que no se pueden obtener conclusiones generales a partir del estudio de una o pocas líneas de CMT. Estudios futuros deberán incluir un número importante de muestras para evaluar la posibilidad de diferenciar subgrupos de CMT de GBM en base, entre otras características, a las alteraciones en la ruta Hh-Gli.

En las líneas estudiadas observamos una serie de características generales de interés. Las condiciones de cultivo no parecen influir significativamente en los niveles de expresión de Patch y Smo, apreciándose únicamente fluctuaciones en

los niveles de expresión sin una clara tendencia neta en todas las líneas. La relación Smo/Patch en los controles se mantiene en torno a uno. Sin embargo esta ratio aparece alterada en las líneas de CMT de GBM, con un claro aumento de Patch con relación a Smo. Trabajos anteriores muestran que una ratio Patch:Smo de 1:45 es suficiente para reducir la actividad de Smo en un 80%<sup>133</sup>, se necesitan un mayor número de líneas para poder concluir y realizar el mismo análisis estadístico en CMT y CMN.

Con respecto a los efectores de la ruta, observamos que los niveles de expresión de Gli2 aparecen muy por encima de los niveles control en dos de las tres líneas estudiadas, siendo además la relación Gli1/Gli2 claramente favorable a Gli2. Por el contrario en CMN la ratio Gli1/Gli2 está invertida a favor de Gli1. Estos datos, unidos a los hallazgos relacionados con Gli2 en tejido tumoral así como la probable implicación de una ratio baja Gli2/Sufu en tumores diseminados, convierte a Gli2 en un interesante objeto de estudio con posibles implicaciones clínicas ya que todo apunta a que puede tener un papel importante en la biología tumoral.

Los niveles de expresión de Sufu en el contexto de las líneas de CMT son inferiores a los de los controles en las tres líneas estudiadas, no sabemos si podría deberse a una menor inhibición en CMT y mayor control de la ruta en CMN. Relacionando los hallazgos con Sufu en tejido tumoral, no se han hallado diferencias en los tumores como grupo con respecto a los controles, aunque sí diferencias entre los tumores diseminados/no diseminados.

Lo interesante sería obtener datos inmediatos del tumor para correlacionarlos con actividad de la ruta y así tratar sólo a los pacientes con Hh-Gli activa. Para ello deberíamos obtener un modelo de estudio de CMT que nos permitiera estudiar un tumor a partir de estas CMT lo más similar posible al tumor originario. Sabemos positivamente que las células en cultivo, al igual que el GBM *in vivo* presentan inestabilidades genéticas y constantes mutaciones. En este estudio no hemos podido establecer en cuanto a transcripción de la ruta, que el análisis de las CMT que obtenemos en fase 0-1 tenga niveles similares de transcrito que el tejido tumoral extraído en la cirugía. Se mantiene que en cultivo hay un nivel mayor de CD 133 en las 4 líneas en fase 0, por tanto podríamos pensar a priori que quizá estamos seleccionando un mayor componente de CMT CD133+ que se pierde posteriormente. Desconocemos si es más fiable el análisis en pases sucesivos o si son otras células más diferenciadas las causantes de la sobreexpresión de Hh-Gli

en tumores. Ciertamente es que los tumores de los que hemos obtenido células no eran los más activos en cuanto a Hh-Gli y los resultados pueden estar sesgados.

En cuanto a las recidivas tumorales, se estudian muestras de grandísimo valor desde el punto de vista biológico, ya que representan una evolución temporal *in vivo*. No se pueden establecer patrones, aunque la posibilidad en un futuro de cultivar las células de las recidivas permitirá comparar la evolución de las CMT en cultivo y compararlas con las extraídas de la recidiva, lo que sería un control de la fiabilidad en el tiempo del propio cultivo.

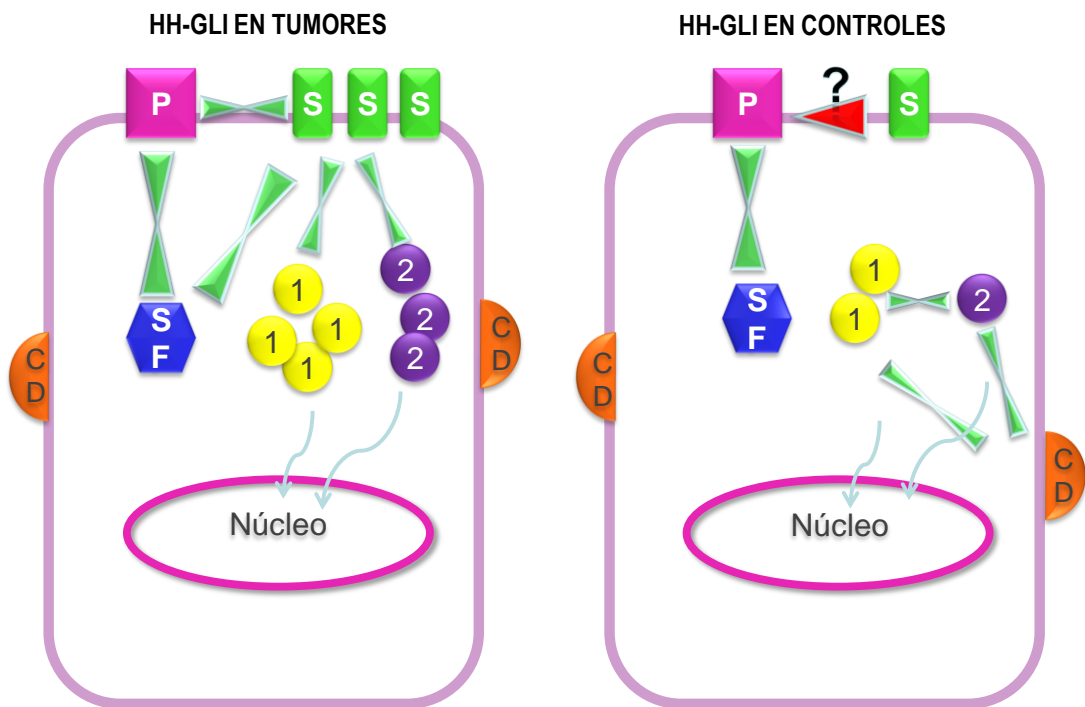
#### 8.4 Hipótesis de un modelo de disregulación de Hh-Gli en tumores gliales



En base al análisis estadístico realizado en el presente trabajo, Smo se encuentra sobreexpresado en el tejido tumoral. A su vez, un aumento en la expresión de Smo se correlaciona con niveles mayores de expresión de Patch, que sin embargo, no llegan a ser significativamente mayores que en los controles. Dicha correlación positiva es consistente con los datos publicados previamente por el grupo de Katayam en 2002<sup>133</sup>. Una posibilidad que puede explicar este aumento de Patch es la presencia de mecanismos de compensación o retroalimentación negativa, que compense el aumento de Smo. Los niveles de expresión de Patch y Smo en las muestras control no se correlacionan de forma estadísticamente significativa, sin embargo el coeficiente de correlación es negativo, es decir el aumento de expresión de uno de ellos podría comportar la disminución del otro. Así pues, en condiciones normales de funcionamiento de la ruta Hh-Gli, un aumento en la expresión de Patch podría conllevar una disminución en la expresión de Smo. En cualquier caso, el aumento en los niveles de transcrito de Patch en las muestras tumorales no es suficiente como para que el cociente Smo/Patch sea similar al de las muestras control. En conjunto, nuestros datos apuntan a una disregulación en la relación entre Patch y Smo en GBM.

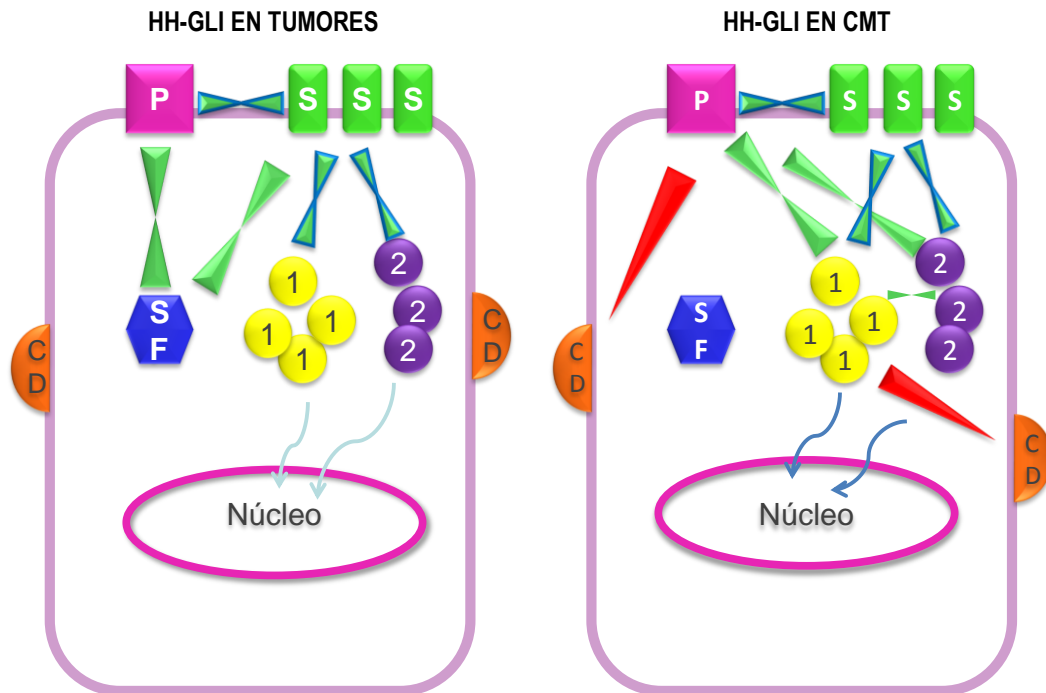
A diferencia de lo que ocurre entre Smo y Patch, Smo y Sufu se relacionan positivamente en GBM, un aumento en la expresión de Smo, conlleva aumento en la expresión de Sufu. Esta correlación positiva sin embargo, no se ha encontrado en las muestras control. Este hecho permite especular sobre la existencia de mecanismos que regulan de forma conjunta la expresión de Smo y Sufu en GBM. (Figuras 25 y 26).



En el subgrupo de tumores diseminados que tienen aumentado los niveles de expresión de Sufu, en principio cabría esperar una elevación en los niveles de expresión de Smo, aunque con la muestra analizada no hemos podido demostrar un aumento de Smo en este subgrupo.



**Figura 25.** El esquema representa el modelo propuesto de disregulación de Hh-Gli según los datos obtenidos. P, Patch; S, Smo; SF, Sufu; 1, Gli1; 2, Gli2; CD, CD133; , correlación positiva; , correlación negativa. En tumores aumenta Smo, Gli1 y Gli2, Patch y Smo se correlacionan de forma positiva, así como Smo y Gli1 y Gli2. En controles no se encuentra una correlación clara de Smo y Patch, su coeficiente es negativo aunque sin alcanzar la significación estadística. Estudios con un mayor número de controles corroborarán si existe dicha correlación negativa.



**Figura 26.** El esquema representa la alteración de Hh-Gli según los datos obtenidos en CMT en comparación con el tejido tumoral. P, Patch; S, Smo; SF, SuFu; 1, Gli1; 2, Gli2, CD, CD133; correlación positiva; correlación negativa; correlación positiva no encontrada en la masa tumoral, correlación negativa no encontrada en tejido tumoral. En CMT es posible que aumenten Smo, Gli1 y Gli2 (no comprobado a falta de más controles de CMN), Patch y Smo se correlacionan de forma positiva, así como Smo, Gli1 y Gli2. En CMT, Patch aumenta si están aumentados los efectores, probablemente por un mecanismo de feed-back negativo, no hallado en tejido tumoral. En la CMT encontramos que un aumento de Patch y Gli1 conllevan una disminución de CD133, es decir, en las CMT CD133+ podría estar la ruta menos expresada.

Sin embargo, considerando el total de las muestras tumorales analizadas, hemos visto que Smo aumenta, dicho aumento se correlaciona positivamente con los niveles de expresión de Gli1 y también Gli2. La existencia de esta correlación no es sin embargo, estadísticamente significativa en las muestras control, es decir, no sólo la expresión de los genes que codifican para la proteína de membrana Smo aumenta en tumores sino también la expresión de los genes que codifican para las proteínas efectoras de la ruta. El grupo de Katayam también observó la existencia de correlación positiva entre Smo y Gli2 y entre Smo y Gli3 en su serie de astrocitomas analizados, sin embargo, no pudieron demostrar dicha correlación entre Smo y Gli1. En conjunto los datos sugieren que la sobreexpresión de Smo

activa la expresión de los efectores finales de la ruta, o bien, la existencia de un mecanismo que activa de forma conjunta la expresión tanto de Smo como de la familia de proteínas Gli<sup>133</sup>. Es interesante destacar, sin embargo, que la expresión de los dos reguladores negativos de la ruta, Patch y Sufu se correlacionan estrechamente en el mismo sentido tanto en tumores, como en las muestras control.

Tanto Gli1 como Gli2 aparecen sobreexpresados en tumores con respecto a las muestras control de SB. En las muestras control observamos la existencia de correlación positiva en la expresión de ambos efectores, sin embargo no pudimos demostrar dicha correlación en las muestras de tumores. Esta observación es consistente con estudios previos<sup>133</sup> en que Gli2 puede ser tanto activador como inhibidor<sup>20-21</sup>. Una posibilidad que explique esta pérdida de correlación es la existencia de un mecanismo regulador de Gli2 que se pierde en el contexto del GBM. Sin embargo, esta relación se recupera en CMT aisladas de GBM. Este hecho sugiere que EGF o FGF, factores de crecimiento utilizados en el cultivo de dichas células, pueden participar en la regulación de la expresión de dichos efectores. Por otro lado, observamos que una disminución en la relación Gli2/Sufu, se relaciona fuertemente con la diseminación de células tumorales por haces de sustancia blanca. Sin embargo esta relación no se observa con Gli1. Este hecho sugiere que tanto Gli1 como Gli2 participan de forma diferente en la biología del tumor.

Una relación interesante es la que encontramos entre Gli1 y Gli2 y CD133 en controles que se pierde en el tejido tumoral. No encontramos un aumento de CD133 en tumores, en los que esta correlación positiva se pierde, por tanto nos encontramos ante un gran grupo de tumores en los que probablemente, las CMT CD133+ no representan un papel principal, algo que ya se ha demostrado en anteriores estudios<sup>156-158</sup>. En CMT es llamativo que un aumento de Gli1 se relacione con una disminución de CD133, lo que lleva a pensar que tal vez las CMT con Gli1 más activo sean las CD133-.

## **CONCLUSIONES**

Tras el análisis de la ruta Hh-Gli en nuestros pacientes, podemos concluir lo siguiente:

1. Hh-Gli se encuentra sobreexpresada en al menos un subgrupo de tumores gliales, especialmente tumores de alto grado.
2. Smo, Gli1 y Gli2 se encuentran elevados de forma significativa en tumores con respecto a los controles.
3. Hay diferencias entre las relaciones de los distintos intermediarios entre sí en tumores, controles y CMT, lo que podría significar disregulación en la ruta en cuanto a niveles de expresión.
4. Los tumores de mayor tamaño se relacionan con niveles elevados de Smo.
5. Los tumores diseminados al diagnóstico se relacionan con niveles elevados de Sufu y con un ratio Gli2/Sufu bajo. Se mantienen los patrones de diseminación en cuanto al crecimiento tumoral en ratón tras la inyección de CMT comparados con la RM del paciente
6. Los niveles de expresión de los distintos intermediarios de la ruta Hh-Gli cambian con el tiempo en cultivo con elevación de los niveles de efectores en los sucesivos pases.
7. Se puede establecer una hipótesis de funcionamiento de la ruta Hh-Gli en tumores.

## **FUTURAS LÍNEAS DE TRABAJO**

Las nuevas líneas de trabajo que se plantean tras este estudio son las siguientes:

- i. Estudio *in vitro* e *in vivo* de la influencia de Sufu y Gli2 en cuanto a migración, interacción con otras rutas
- ii. Estudio de las diferentes mutaciones en los componentes de la ruta con los sucesivos pases en cultivo de CMT
- iii. Estudio a largo plazo de las recidivas, cultivo de CMT y comparación con las líneas primitivas
- iv. Comparación de los niveles de transcrito en SB y SG
- v. Estudio de la ruta diferenciando tumores de alto y bajo grado y sus posteriores recidivas de alto grado

La biología tumoral del GBM es extremadamente compleja. Probablemente el futuro pase por analizar cada tumor de forma individual, extraer y cultivar las CMT y en virtud de análisis genéticos y de expresión administrar los fármacos más adecuados. Todo apunta a que los inhibidores de la ruta Hh-Gli tendrán un papel importante en las futuras terapias de los gliomas.

*Cada contribución a la comprensión de la biología de estos tumores, por pequeña que sea, representa para nuestros pacientes, principio y fin de nuestro esfuerzo, un poco de esperanza en la dolorosa realidad humana que sufren cada día.*

## **BIBLIOGRAFÍA**



1. Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64:479-89.
2. Louis D OH, Wiestler O, Cavenee W. WHO Classification of Tumors of the central nervous System. Lyon: WHO; 2007.
3. Purow BW, Schiff D. Glioblastoma genetics: in rapid flux. *Discov Med* 2010;9:125-31.
4. Purow B, Schiff D. Advances in the genetics of glioblastoma: are we reaching critical mass? *Nat Rev Neurol* 2009;5:419-26.
5. Soni D, King JA, Kaye AH, Hovens CM. Genetics of glioblastoma multiforme: mitogenic signaling and cell cycle pathways converge. *J Clin Neurosci* 2005;12:1-5.
6. Benjamin R, Capparella J, Brown A. Classification of glioblastoma multiforme in adults by molecular genetics. *Cancer J* 2003;9:82-90.
7. Nakano I, Dougherty JD, Kim K, Klement I, Geschwind DH, Kornblum HI. Phosphoserine phosphatase is expressed in the neural stem cell niche and regulates neural stem and progenitor cell proliferation. *Stem Cells* 2007;25:1975-84.
8. Palma V, Lim DA, Dahmane N, et al. Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 2005;132:335-44.
9. Alvarez-Buylla A, Lim DA. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 2004;41:683-6.
10. Dick JE. Breast cancer stem cells revealed. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3547-9.
11. Scadden DT. The stem cell niche in health and leukemic disease. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20:19-27.
12. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003;63:5821-8.
13. Yuan X, Curtin J, Xiong Y, et al. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 2004;23:9392-400.
14. Shiras A, Chettiar ST, Shepal V, Rajendran G, Prasad GR, Shastry P. Spontaneous transformation of human adult nontumorigenic stem cells to cancer stem cells is driven by genomic instability in a human model of glioblastoma. *Stem Cells* 2007;25:1478-89.
15. Zhang QB, Ji XY, Huang Q, Dong J, Zhu YD, Lan Q. Differentiation profile of brain tumor stem cells: a comparative study with neural stem cells. *Cell Res* 2006;16:909-15.
16. Ruel L, Gallet A, Raisin S, et al. Phosphorylation of the atypical kinesin Costal2 by the kinase Fused induces the partial disassembly of the Smoothed-Fused-Costal2-Cubitus interruptus complex in Hedgehog signalling. *Development* 2007;134:3677-89.
17. Porter JA, Young KE, Beachy PA. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* 1996;274:255-9.
18. Pepinsky RB, Zeng C, Wen D, et al. Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J Biol Chem* 1998;273:14037-45.
19. Varjosalo M, Li SP, Taipale J. Divergence of hedgehog signal transduction mechanism between *Drosophila* and mammals. *Dev Cell* 2006;10:177-86.
20. Bale AE. Hedgehog signaling and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002;3:47-65.
21. Dellovade T, Romer JT, Curran T, Rubin LL. The hedgehog pathway and neurological disorders. *Annu Rev Neurosci* 2006;29:539-63.
22. Katoh Y, Katoh M. WNT antagonist, SFRP1, is Hedgehog signaling target. *Int J Mol Med* 2006;17:171-5.
23. Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 2001;15:3059-87.

24. Lum L, Beachy PA. The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science* 2004;304:1755-9.
25. Rubin LL, de Sauvage FJ. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:1026-33.
26. Ruel L, Therond PP. Variations in Hedgehog signaling: divergence and perpetuation in Sufu regulation of Gli. *Genes Dev* 2009;23:1843-8.
27. Canettieri G, Di Marcotullio L, Greco A, et al. Histone deacetylase and Cullin3-REN(KCTD11) ubiquitin ligase interplay regulates Hedgehog signalling through Gli acetylation. *Nat Cell Biol* 2010;12:132-42.
28. Kim K, Kim KH, Cho HK, Kim HY, Kim HH, Cheong J. The small heterodimer partner suppresses the transcriptional activity and nuclear localization of hedgehog signaling protein Gli1. *Biochem J* 2010.
29. Chiang C, Litingtung Y, Lee E, et al. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 1996;383:407-13.
30. Lanske B, Karaplis AC, Lee K, et al. PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* 1996;273:663-6.
31. Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 1996;273:613-22.
32. Bitgood MJ, Shen L, McMahon AP. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol* 1996;6:298-304.
33. Mirsky R, Parmantier E, McMahon AP, Jessen KR. Schwann cell-derived desert hedgehog signals nerve sheath formation. *Ann N Y Acad Sci* 1999;883:196-202.
34. Parmantier E, Lynn B, Lawson D, et al. Schwann cell-derived Desert hedgehog controls the development of peripheral nerve sheaths. *Neuron* 1999;23:713-24.
35. Ericson J, Briscoe J, Rashbass P, van Heyningen V, Jessell TM. Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1997;62:451-66.
36. Hynes M, Poulsen K, Tessier-Lavigne M, Rosenthal A. Control of neuronal diversity by the floor plate: contact-mediated induction of midbrain dopaminergic neurons. *Cell* 1995;80:95-101.
37. Orentas DM, Hayes JE, Dyer KL, Miller RH. Sonic hedgehog signaling is required during the appearance of spinal cord oligodendrocyte precursors. *Development* 1999;126:2419-29.
38. Patten I, Placzek M. The role of Sonic hedgehog in neural tube patterning. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:1695-708.
39. Placzek M, Jessell TM, Dodd J. Induction of floor plate differentiation by contact-dependent, homeogenetic signals. *Development* 1993;117:205-18.
40. Yamada T, Pfaff SL, Edlund T, Jessell TM. Control of cell pattern in the neural tube: motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate. *Cell* 1993;73:673-86.
41. Yamada T, Placzek M, Tanaka H, Dodd J, Jessell TM. Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell* 1991;64:635-47.
42. Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, et al. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science* 1987;236:70-3.
43. Wechsler-Reya RJ. Analysis of gene expression in the normal and malignant cerebellum. *Recent Prog Horm Res* 2003;58:227-48.
44. Dahmane N, Ruiz i Altaba A. Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* 1999;126:3089-100.

45. Wallace VA. Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr Biol* 1999;9:445-8.
46. Wechsler-Reya RJ, Scott MP. Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 1999;22:103-14.
47. Dahmane N, Sanchez P, Gitton Y, et al. The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. *Development* 2001;128:5201-12.
48. Ruiz i Altaba A, Sanchez P, Dahmane N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nat Rev Cancer* 2002;2:361-72.
49. Ahn S, Joyner AL. In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* 2005;437:894-7.
50. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:287-93.
51. Corbit KC, Aanstad P, Singla V, Norman AR, Stainier DY, Reiter JF. Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* 2005;437:1018-21.
52. Han YG, Spassky N, Romaguera-Ros M, et al. Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat Neurosci* 2008;11:277-84.
53. Machold R, Hayashi S, Rutlin M, et al. Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* 2003;39:937-50.
54. Mullor JL, Sanchez P, Ruiz i Altaba A. Pathways and consequences: Hedgehog signaling in human disease. *Trends Cell Biol* 2002;12:562-9.
55. Roessler E, Belloni E, Gaudenz K, et al. Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet* 1996;14:357-60.
56. Belloni E, Muenke M, Roessler E, et al. Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nat Genet* 1996;14:353-6.
57. Kang S, Graham JM, Jr., Olney AH, Biesecker LG. GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome. *Nat Genet* 1997;15:266-8.
58. Radhakrishna U, Wild A, Grzeschik KH, Antonarakis SE. Mutation in GLI3 in postaxial polydactyly type A. *Nat Genet* 1997;17:269-71.
59. Wild A, Kalff-Suske M, Vortkamp A, Bornholdt D, Konig R, Grzeschik KH. Point mutations in human GLI3 cause Greig syndrome. *Hum Mol Genet* 1997;6:1979-84.
60. Rafuse VF, Soundararajan P, Leopold C, Robertson HA. Neuroprotective properties of cultured neural progenitor cells are associated with the production of sonic hedgehog. *Neuroscience* 2005;131:899-916.
61. Chidambaram A, Goldstein AM, Gailani MR, et al. Mutations in the human homologue of the Drosophila patched gene in Caucasian and African-American nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. *Cancer Res* 1996;56:4599-601.
62. Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, et al. Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 1996;85:841-51.
63. Wicking C, Shanley S, Smyth I, et al. Most germ-line mutations in the nevoid basal cell carcinoma syndrome lead to a premature termination of the PATCHED protein, and no genotype-phenotype correlations are evident. *Am J Hum Genet* 1997;60:21-6.
64. Huangfu D, Liu A, Rakeman AS, Murcia NS, Niswander L, Anderson KV. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* 2003;426:83-7.
65. Kyttila M, Tallila J, Salonen R, et al. MKS1, encoding a component of the flagellar apparatus basal body proteome, is mutated in Meckel syndrome. *Nat Genet* 2006;38:155-7.
66. Pan J, Wang Q, Snell WJ. Cilium-generated signaling and cilia-related disorders. *Lab Invest* 2005;85:452-63.
67. Hellemans J, Coucke PJ, Giedion A, et al. Homozygous mutations in IHH cause acrocapitofemoral dysplasia, an autosomal recessive disorder with cone-shaped epiphyses in hands and hips. *Am J Hum Genet* 2003;72:1040-6.

68. Gao B, Guo J, She C, et al. Mutations in IHH, encoding Indian hedgehog, cause brachydactyly type A-1. *Nat Genet* 2001;28:386-8.
69. Schimmenti LA, de la Cruz J, Lewis RA, et al. Novel mutation in sonic hedgehog in non-syndromic colobomatous microphthalmia. *Am J Med Genet A* 2003;116A:215-21.
70. Hopyan S, Gokgoz N, Poon R, et al. A mutant PTH/PTHrP type I receptor in enchondromatosis. *Nat Genet* 2002;30:306-10.
71. Umehara F, Tate G, Itoh K, et al. A novel mutation of desert hedgehog in a patient with 46,XY partial gonadal dysgenesis accompanied by minifascicular neuropathy. *Am J Hum Genet* 2000;67:1302-5.
72. Nanni L, Ming JE, Bocian M, et al. The mutational spectrum of the sonic hedgehog gene in holoprosencephaly: SHH mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprosencephaly. *Hum Mol Genet* 1999;8:2479-88.
73. IPorter JA, Young KE, Beachy PA. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* 1996;274:255-9.
74. Nanni L, Ming JE, Du Y, et al. SHH mutation is associated with solitary median maxillary central incisor: a study of 13 patients and review of the literature. *Am J Med Genet* 2001;102:1-10.
75. Kim J, Kim P, Hui CC. The VACTERL association: lessons from the Sonic hedgehog pathway. *Clin Genet* 2001;59:306-15.
76. Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling pathway and gastrointestinal stem cell signaling network (review). *Int J Mol Med* 2006;18:1019-23.
77. Xie J, Murone M, Luoh SM, et al. Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* 1998;391:90-2.
78. Johnson RL, Rothman AL, Xie J, et al. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 1996;272:1668-71.
79. Olsen CL, Hsu PP, Glienke J, Rubanyi GM, Brooks AR. Hedgehog-interacting protein is highly expressed in endothelial cells but down-regulated during angiogenesis and in several human tumors. *BMC Cancer* 2004;4:43.
80. Martin ST, Sato N, Dhara S, et al. Aberrant methylation of the Human Hedgehog interacting protein (HHIP) gene in pancreatic neoplasms. *Cancer Biol Ther* 2005;4:728-33.
81. Fukaya M, Isohata N, Ohta H, et al. Hedgehog signal activation in gastric pit cell and in diffuse-type gastric cancer. *Gastroenterology* 2006;131:14-29.
82. Yanai K, Nagai S, Wada J, et al. Hedgehog signaling pathway is a possible therapeutic target for gastric cancer. *J Surg Oncol* 2007;95:55-62.
83. Mori Y, Okumura T, Tsunoda S, Sakai Y, Shimada Y. Gli-1 expression is associated with lymph node metastasis and tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology* 2006;70:378-89.
84. Snijders AM, Schmidt BL, Fridlyand J, et al. Rare amplicons implicate frequent deregulation of cell fate specification pathways in oral squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2005;24:4232-42.
85. Gordon AT, Brinkschmidt C, Anderson J, et al. A novel and consistent amplicon at 13q31 associated with alveolar rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;28:220-6.
86. Bhattacharya R, Kwon J, Ali B, et al. Role of hedgehog signaling in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:7659-66.
87. Mimeault M, Moore E, Moniaux N, et al. Cytotoxic effects induced by a combination of cyclopamine and gefitinib, the selective hedgehog and epidermal growth factor receptor signaling inhibitors, in prostate cancer cells. *Int J Cancer* 2006;118:1022-31.
88. Kameda C, Tanaka H, Yamasaki A, et al. The Hedgehog pathway is a possible therapeutic target for patients with estrogen receptor-negative breast cancer. *Anticancer Res* 2009;29:871-9.

89. Ruiz i Altaba A, Stecca B, Sanchez P. Hedgehog--Gli signaling in brain tumors: stem cells and pardevelopmental programs in cancer. *Cancer Lett* 2004;204:145-57.
90. Buhren J, Christoph AH, Buslei R, Albrecht S, Wiestler OD, Pietsch T. Expression of the neurotrophin receptor p75NTR in medulloblastomas is correlated with distinct histological and clinical features: evidence for a medulloblastoma subtype derived from the external granule cell layer. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000;59:229-40.
91. Jozwiak J, Grajkowska W, Wlodarski P. Pathogenesis of medulloblastoma and current treatment outlook. *Med Res Rev* 2007;27:869-90.
92. Katsetos CD, Burger PC. Medulloblastoma. *Semin Diagn Pathol* 1994;11:85-97.
93. Lee A, Kessler JD, Read TA, et al. Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. *Nat Neurosci* 2005;8:723-9.
94. Pomeroy SL, Tamayo P, Gaasenbeek M, et al. Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature* 2002;415:436-42.
95. Thompson MC, Fuller C, Hogg TL, et al. Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J Clin Oncol* 2006;24:1924-31.
96. Marino S. Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control. *Trends Mol Med* 2005;11:17-22.
97. Weiner HL, Bakst R, Hurlbert MS, et al. Induction of medulloblastomas in mice by sonic hedgehog, independent of Gli1. *Cancer Res* 2002;62:6385-9.
98. Hatton BA, Knoepfler PS, Kenney AM, et al. N-myc is an essential downstream effector of Shh signaling during both normal and neoplastic cerebellar growth. *Cancer Res* 2006;66:8655-61.
99. Ehrbrecht A, Muller U, Wolter M, et al. Comprehensive genomic analysis of desmoplastic medulloblastomas: identification of novel amplified genes and separate evaluation of the different histological components. *J Pathol* 2006;208:554-63.
100. Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, et al. Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* 2002;297:1559-61.
101. De Smaele E, Di Marcotullio L, Ferretti E, Screpanti I, Alesse E, Gulino A. Chromosome 17p deletion in human medulloblastoma: a missing checkpoint in the Hedgehog pathway. *Cell Cycle* 2004;3:1263-6.
102. Wetmore C, Eberhart DE, Curran T. Loss of p53 but not ARF accelerates medulloblastoma in mice heterozygous for patched. *Cancer Res* 2001;61:513-6.
103. Han YG, Kim HJ, Dlugosz AA, Ellison DW, Gilbertson RJ, Alvarez-Buylla A. Dual and opposing roles of primary cilia in medulloblastoma development. *Nat Med* 2009;15:1062-5.
104. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, et al. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* 2006;9:391-403.
105. Assanah M, Lochhead R, Ogden A, Bruce J, Goldman J, Canoll P. Glial progenitors in adult white matter are driven to form malignant gliomas by platelet-derived growth factor-expressing retroviruses. *J Neurosci* 2006;26:6781-90.
106. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 2004;64:6892-9.
107. Xiao H, Goldthwait DA, Mapstone T. A search for gli expression in tumors of the central nervous system. *Pediatr Neurosurg* 1994;20:178-82.
108. Salgaller M, Pearl D, Stephens R. In situ hybridization with single-stranded RNA probes to demonstrate infrequently elevated gli mRNA and no increased ras mRNA levels in meningiomas and astrocytomas. *Cancer Lett* 1991;57:243-53.
109. Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, Radovanovic I, Ruiz i Altaba A. HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr Biol* 2007;17:165-72.

110. Lo HW, Zhu H, Cao X, Aldrich A, Ali-Osman F. A novel splice variant of GLI1 that promotes glioblastoma cell migration and invasion. *Cancer Res* 2009;69:6790-8.
111. Xu Q, Yuan X, Liu G, Black KL, Yu JS. Hedgehog signaling regulates brain tumor-initiating cell proliferation and portends shorter survival for patients with PTEN-coexpressing glioblastomas. *Stem Cells* 2008;26:3018-26.
112. Zbinden M, Duquet A, Lorente-Trigos A, Ngwabyt SN, Borges I, Ruiz i Altaba A. NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-functional network with GLI1 and p53. *EMBO J* 2010;29:2659-74.
113. Silber JH, Radcliffe J, Peckham V, et al. Whole-brain irradiation and decline in intelligence: the influence of dose and age on IQ score. *J Clin Oncol* 1992;10:1390-6.
114. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:987-96.
115. Rudin CM, Hann CL, Laterra J, et al. Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N Engl J Med* 2009;361:1173-8.
116. Williams JA, Guicherit OM, Zaharian BI, et al. Identification of a small molecule inhibitor of the hedgehog signaling pathway: effects on basal cell carcinoma-like lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:4616-21.
117. Frank-Kamenetsky M, Zhang XM, Bottega S, et al. Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothened agonists and antagonists. *J Biol* 2002;1:10.
118. Romer JT, Kimura H, Magdaleno S, et al. Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in Ptc1(+/-)p53(-/-) mice. *Cancer Cell* 2004;6:229-40.
119. Bar EE, Chaudhry A, Lin A, et al. Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. *Stem Cells* 2007;25:2524-33.
120. Sanchez P, Ruiz i Altaba A. In vivo inhibition of endogenous brain tumors through systemic interference of Hedgehog signaling in mice. *Mech Dev* 2005;122:223-30.
121. Sasai K, Romer JT, Kimura H, Eberhart DE, Rice DS, Curran T. Medulloblastomas derived from Cxcr6 mutant mice respond to treatment with a smoothened inhibitor. *Cancer Res* 2007;67:3871-7.
122. Sanchez P, Clement V, Ruiz i Altaba A. Therapeutic targeting of the Hedgehog-GLI pathway in prostate cancer. *Cancer Res* 2005;65:2990-2.
123. Sanchez P, Hernandez AM, Stecca B, et al. Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:12561-6.
124. Lauth M, Bergstrom A, Shimokawa T, Toftgard R. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:8455-60.
125. Mukherjee S, Frolova N, Sadlonova A, et al. Hedgehog signaling and response to cyclopamine differ in epithelial and stromal cells in benign breast and breast cancer. *Cancer Biol Ther* 2006;5:674-83.
126. Qualtrough D, Buda A, Gaffield W, Williams AC, Paraskeva C. Hedgehog signalling in colorectal tumour cells: induction of apoptosis with cyclopamine treatment. *Int J Cancer* 2004;110:831-7.
127. Yauch RL, Dijkgraaf GJ, Alicke B, et al. Smoothened mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma. *Science* 2009;326:572-4.
128. Von Hoff DD, LoRusso PM, Rudin CM, et al. Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2009;361:1164-72.
129. Daggrell SA. The hedgehog pathway inhibitor GDC-0449 shows potential in skin and other cancers. *Expert Opin Investig Drugs* 2010;19:451-4.
130. <http://clinicaltrials.gov/>.

131. Pola R, Ling LE, Silver M, et al. The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat Med* 2001;7:706-11.
132. Ayuso-Sacido A, Roy NS, Schwartz TH, Greenfield JP, Boockvar JA. Long-term expansion of adult human brain subventricular zone precursors. *Neurosurgery* 2008;62:223-9; discussion 9-31.
133. Katayam M, Yoshida K, Ishimori H, et al. Patched and smoothed mRNA expression in human astrocytic tumors inversely correlates with histological malignancy. *J Neurooncol* 2002;59:107-15.
134. Renganchary S WR, ed. *Neurosurgical Operative Atlas: American Association of Neurological Surgeons*; 1991.
135. Greenfield JP, Ayuso-Sacido A, Schwartz TH, et al. Use of human neural tissue for the generation of progenitors. *Neurosurgery* 2008;62:21-37; discussion 27-30.
136. Li SW, Qiu XG, Chen BS, et al. Prognostic factors influencing clinical outcomes of glioblastoma multiforme. *Chin Med J (Engl)* 2009;122:1245-9.
137. Hooper JE, Scott MP. Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:306-17.
138. Nguyen V, Chokas AL, Stecca B, Ruiz i Altaba A. Cooperative requirement of the Gli proteins in neurogenesis. *Development* 2005;132:3267-79.
139. Preat T. Characterization of Suppressor of fused, a complete suppressor of the fused segment polarity gene of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1992;132:725-36.
140. Smelkinson MG, Zhou Q, Kalderon D. Regulation of Ci-SCFSlimb binding, Ci proteolysis, and hedgehog pathway activity by Ci phosphorylation. *Dev Cell* 2007;13:481-95.
141. Stummer W, Reulen HJ, Meinel T, et al. Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery* 2008;62:564-76; discussion -76.
142. Lu S, Ahn D, Johnson G, Cha S. Peritumoral diffusion tensor imaging of high-grade gliomas and metastatic brain tumors. *AJNR Am J Neuroradiol* 2003;24:937-41.
143. Lu S, Ahn D, Johnson G, Law M, Zagzag D, Grossman RI. Diffusion-tensor MR imaging of intracranial neoplasia and associated peritumoral edema: introduction of the tumor infiltration index. *Radiology* 2004;232:221-8.
144. Roberts TP, Liu F, Kassner A, Mori S, Guha A. Fiber density index correlates with reduced fractional anisotropy in white matter of patients with glioblastoma. *AJNR Am J Neuroradiol* 2005;26:2183-6.
145. Osterlund T, Everman DB, Betz RC, et al. The FU gene and its possible protein isoforms. *BMC Genomics* 2004;5:49.
146. Stone DM, Murone M, Luoh S, et al. Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. *J Cell Sci* 1999;112 ( Pt 23):4437-48.
147. Meng X, Poon R, Zhang X, et al. Suppressor of fused negatively regulates beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 2001;276:40113-9.
148. Muller T, Choidas A, Reichmann E, Ullrich A. Phosphorylation and free pool of beta-catenin are regulated by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases during epithelial cell migration. *J Biol Chem* 1999;274:10173-83.
149. Son MJ, Woolard K, Nam DH, Lee J, Fine HA. SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell Stem Cell* 2009;4:440-52.
150. Douville J, Beaulieu R, Balicki D. ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev* 2009;18:17-25.

151. Knott JC, Edwards AJ, Gullan RW, Clarke TM, Pilkington GJ. A human glioma cell line retaining expression of GFAP and gangliosides, recognized by A2B5 and LB1 antibodies, after prolonged passage. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1990;16:489-500.
152. Knott JC, Pilkington GJ. A2B5 surface ganglioside binding distinguishes between two GFAP-positive clones from a human glioma-derived cell line. *Neurosci Lett* 1990;118:52-6.
153. Jin Y, Bin ZQ, Qiang H, et al. ABCG2 is related with the grade of glioma and resistance to mitoxantone, a chemotherapeutic drug for glioma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009;135:1369-76.
154. Bleau AM, Hambardzumyan D, Ozawa T, et al. PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. *Cell Stem Cell* 2009;4:226-35.
155. Wan F, Zhang S, Xie R, et al. The utility and limitations of neurosphere assay, CD133 immunophenotyping and side population assay in glioma stem cell research. *Brain Pathol* 2010;20:877-89.
156. Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, et al. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res* 2008;14:123-9.
157. Angelastro JM, Lame MW. Overexpression of CD133 promotes drug resistance in C6 glioma cells. *Mol Cancer Res* 2010;8:1105-15.
158. Tamura K, Aoyagi M, Wakimoto H, et al. Accumulation of CD133-positive glioma cells after high-dose irradiation by Gamma Knife surgery plus external beam radiation. *J Neurosurg* 2010;113:310-8.