

BASES MOLECULARES DEL CÁNCER:
EXOSOMAS EN GLIOBLASTOMA

MOLECULAR BASES OF CANCER:
EXOSOMES IN GLIOBLASTOMA

María Atteneri Chico Campos

Tutores: Dr. Pablo Martín Vasallo y

Dra. Rebeca González Fernández

Grado en Biología

Mayo de 2020

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutor Pablo Martín Vasallo por acogerme en su laboratorio, por su esfuerzo y dedicación, por todas esas horas de teléfono y correos que tuvimos que intercambiar para poder llevar a cabo este trabajo debido a las circunstancias que se dieron. Además de mostrarme su pasión por la Ciencia y por compartir conmigo sus amplios conocimientos.

Al Dr. Manuel Morales, miembro del HUNSC, por su amabilidad y completa disponibilidad a la hora de cedernos las muestras necesarias para abordar este trabajo.

Por otra parte, agradecer a Julio Ávila por darme esta oportunidad, por permitirme formar parte del departamento y establecer contacto con Pablo. Asimismo, quiero dar las gracias a Deborah Rotoli y a Rebeca González por todos esos días de trabajo en el laboratorio y por su apoyo, confianza y paciencia conmigo.

A mis padres, Gabriel y Candelaria, por la educación y valores que me dieron, por apoyarme siempre en todas mis decisiones y por ayudarme a conseguir todo lo que me propongo. Igualmente, dar las gracias al resto de familiares y amigos por ayudarme siempre a ver el lado positivo de las cosas y a todos esos luchadores por darme la fuerza necesaria para poder continuar con mi objetivo de poder ayudarles a tener una vida mejor.

RESUMEN

El glioblastoma (GBM) es el tipo de tumor cerebral más agresivo, de progresión rápida y, a pesar de su tratamiento mixto (quirúrgico, radioterápico y quimioterápico), la esperanza de vida está entre los 15 meses y los dos años.

Los exosomas, son vesículas importantes en la comunicación celular a distancia, transportan DNA, RNA y proteínas que pueden modificar la función de las células y tejidos que los reciben.

En este estudio analizamos el patrón electroforético de proteínas en exosomas y suero de pacientes con GBM, antes y después de la cirugía, previo a la quimioterapia, y lo comparamos con el de controles sanos. Los proteinogramas se llevaron a cabo en geles de poliacrilamida con duodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), escaneados y las gráficas de escaneado comparadas.

Hemos encontrado proteínas con Pm aparentes de 250, 125, 60, 37, 20, 18 y 10 kDa que están en los exosomas de pacientes con GBM antes de la cirugía y desaparecen tras ella, proteínas de en torno a 250, 125, 60 , 50, 28, 27, 20 y 10 kDa que están en los exosomas de pacientes con GBM antes de la cirugía pero no en el control sano y proteínas de 250, 150, 75, 50 y 25 kDa aproximadamente que están en los exosomas del paciente con GBM tras la exéresis del tumor y en los controles sanos. La posterior identificación y estudio de estas proteínas nos permitirá un mejor y más temprano diagnóstico y seguimiento de los pacientes y un conocimiento más profundo del GBM.

Palabras clave: glioblastoma, exosomas, proteinograma, SDS-PAGE.

SUMMARY

Glioblastoma (GBM) is a very aggressive type of brain tumour, very rapid progression and, despite of treatment (surgery, radiotherapy and chemotherapy), life expectancy is below two years.

Exosomes are important vesicles in remote cellular communication and carry DNA, RNA and proteins that can modify the function of the cell and tissue where they arrive.

In this study, we analysed the electrophoretic protein pattern in exosomes and serum of patients with GBM, before and after surgery, but prior to chemotherapy, compared to that of healthy controls. Proteinograms were carried out by SDS-PAGE, gels were scanned and scan charts compared.

We have found proteins with apparent Pm of 250, 125, 60, 37, 20, 18 and 10 kDa that are in the exosomes of patients with GBM before surgery and disappear after it, which proteins of around 250, 125, 60, 50, 28, 27, 20 and 10 kDa that are in the exosomes of patients with GBM before surgery but not in the healthy control and proteins of approximately 250, 150, 75, 50 and 25 kDa that are in the exosomes of the GBM patient after tumour excision and in healthy controls. Further identification and study of this proteins will allow a better and earlier diagnosis and follow up of patients and a deeper knowledge about GBM.

Keywords: glioblastoma, exosomes, proteinogram, SDS-PAGE.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Exosomas	1
1.2	Cáncer	2
1.3	Glioblastoma	4
2	PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL.....	5
2.1	Hipótesis.....	5
2.2	Objetivos	6
3	MATERIAL Y MÉTODOS	6
3.1	Muestras	6
3.2	Purificación de exosomas.....	6
3.3	Lisis de exosomas.....	7
3.4	Preparación de las muestras	7
3.5	Electroforesis SDS-PAGE.....	8
3.6	Escaneado de las bandas	8
4	RESULTADOS.....	9
4.1	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.....	9
4.2	SDS-PAGE, gráficas de escaneado y comparación de picos	9
4.2.1	Geles y gráficas de escaneado de las muestras de exosomas, suero y sobrenadante.....	9
4.2.2	Comparación de picos en las gráficas de escaneado de las muestras de exosomas, suero y sobrenadante	13
4.2.3	Geles y gráficas de escaneado de las muestras de suero con los Pm.....	14
4.2.4	Comparación de picos en las gráficas de escaneado de las muestras de suero con los Pm	17
4.2.5	Geles y gráficas de escaneado de las muestras de exosomas de pacientes y controles	18
4.2.6	Comparación de picos en las gráficas de escaneado de las muestras de exosomas de pacientes y controles.....	21

5	DISCUSIÓN	21
5.1	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.....	22
5.2	SDS-PAGE, gráficas de escaneado y comparación de bandas.....	22
5.2.1	Comparación de picos en las gráficas de escaneado de las muestras de exosomas, suero y sobrenadante	22
5.2.2	Comparación de picos en las gráficas de escaneado de las muestras de suero con los Pm 23	23
5.2.3	Comparación de picos en las gráficas de escaneado de las muestras de exosomas de pacientes y controles.....	23
6	CONCLUSIONES	25
7	CONCLUSIONS.....	26
8	BIBLIOGRAFÍA.....	27

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Exosomas

Los exosomas son vesículas que se liberan al espacio extracelular tras la fusión de los cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática en un proceso de brotación inversa, miden entre 40 y 100 nm y se componen de proteínas citosólicas o de la membrana plasmática, balsas lipídicas, DNA y RNA. Los exosomas son activados para que secreten dichas sustancias por varias vías, como la expresión de Rab3D, Wnt o ambientes ácidos [1, 2].

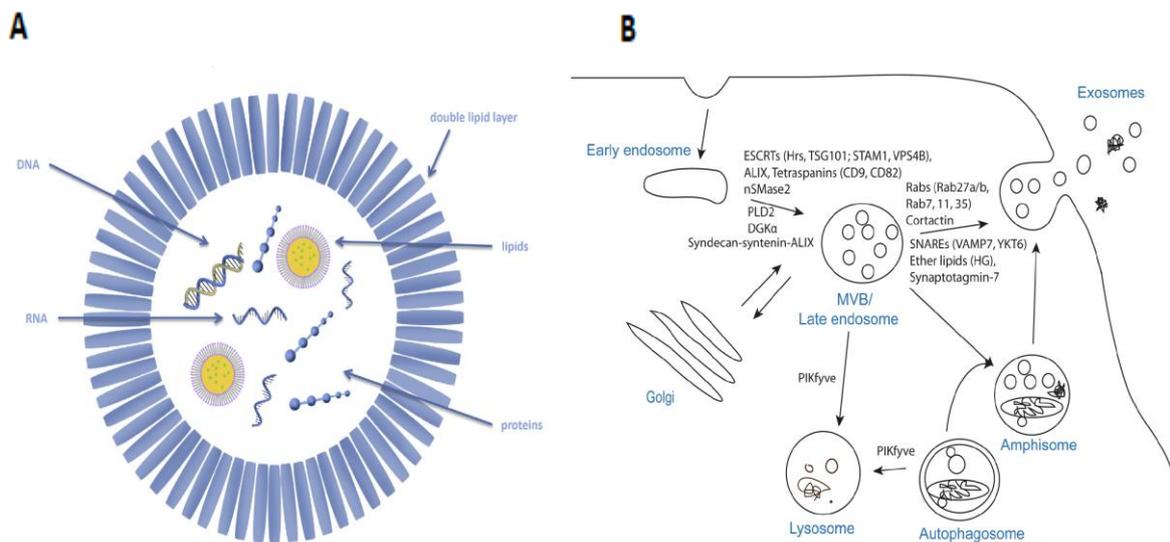


Figura 1: Contenido exosomal y proceso de formación de exosomas. Panel A, los exosomas están envueltos por una doble membrana lipídica y contienen en su interior proteínas citosólicas o de membrana, balsas lipídicas, además de DNA y RNA [1]. **Panel B,** el proceso se encuentra dividido en tres etapas: génesis de exosomas, transporte de endosomas tardíos hacia la membrana y fusión de estos con la misma [3].

Hasta hace relativamente poco tiempo, los exosomas se tenían como basureros puesto que se pensaba que su función se limitaba a la eliminación de desechos que no eran de utilidad para las células [4]. En la actualidad, se sabe que tienen un papel muy importante, ya que su función principal se desarrolla en la comunicación celular a distancia, encontrándose involucrados en procesos fisiológicos y patológicos tales como la migración, la resistencia o la metástasis, que permiten la comunicación sin necesidad de que exista contacto célula-célula [1, 2].

La sangre normal contiene alrededor de 1500 millones de exosomas por mililitro y en el caso de pacientes con cáncer esta cifra es más de dos veces superior dado que los órganos enfermos generan más exosomas que los tejidos sanos. Además, los generados por estas tienen propiedades únicas que permiten que sean detectados de forma temprana [1].

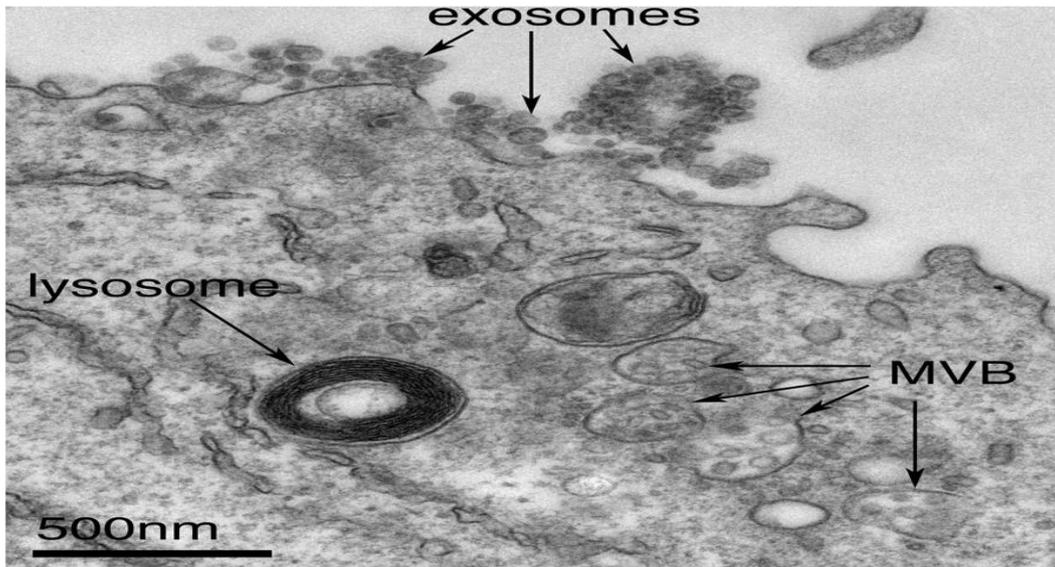


Figura 2: Micrografía electrónica de transmisión de una célula B transformada por el virus Epstein-Barr que muestra exosomas recién expulsados en la membrana plasmática. Se pueden ver cuerpos multivesiculares (MVB) que pueden entregar contenido a los lisosomas para su degradación o pueden fusionarse con la superficie celular para liberar exosomas. Barra de escala: 500 nm [5].

En el caso del GBM, las células tumorales pueden mandar bolsas con proteínas encargadas de modificar la funcionalidad de tejidos a distancia, lo que les permite avanzar y les facilita la metástasis. Esas bolsas contienen también factores para estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), y así poder captar nutrientes y factores necesarios para el crecimiento tumoral [4].

1.2 Cáncer

En general, el cáncer se puede definir como un conjunto de células que se dividen de forma anormal y que generan agregados celulares que se nutren del organismo, alteran su fisiología, tienen una gran capacidad de proliferación y son capaces de dañar tanto a los tejidos cercanos como a otros más lejanos, ya que sus células tienen la capacidad de liberarse de su lugar, migrar y encontrar nuevos nichos donde continuar su crecimiento, pudiendo en muchos casos originar una metástasis y, en último término, provocar la muerte [6].

El cáncer representa la segunda causa de muerte en España, tras las enfermedades relacionadas con el sistema circulatorio [7]. De este modo, podemos destacar que en el número de casos diagnosticados en 2019 fue de 275.562, siendo 116.239 correspondientes con hombres y 159.323 con mujeres, asimismo, el número de muertes ese año se correspondió con 110.350 individuos, siendo nuevamente 43.115 hombres y 67.235 mujeres [8].

Las células normales de un organismo sufren un proceso de transformación a células tumorales denominado carcinogénesis. En él, las células adquieren una serie de capacidades que las vuelve distintas, además, en dicho proceso tienen un papel importante las células del estroma asociado mediante relaciones heterotípicas. Las denominadas “señas de identidad” [9] son seis: resistencia a la muerte, inducción de angiogénesis, permitir la inmortalidad replicativa, invasión y metástasis, evasión de supresores de crecimiento y mantenimiento de la proliferación.

Recientemente se han definido dos nuevas capacidades distintivas: la reprogramación del metabolismo celular y la evasión de la destrucción inmunológica. Por otro lado, también se cree que existen dos características consecuentes de la neoplasia que facilitan la adquisición de las diferentes capacidades: la inestabilidad genómica, es decir, la mutabilidad que facilita la progresión tumoral y la inflamación por las células inmunes [9].

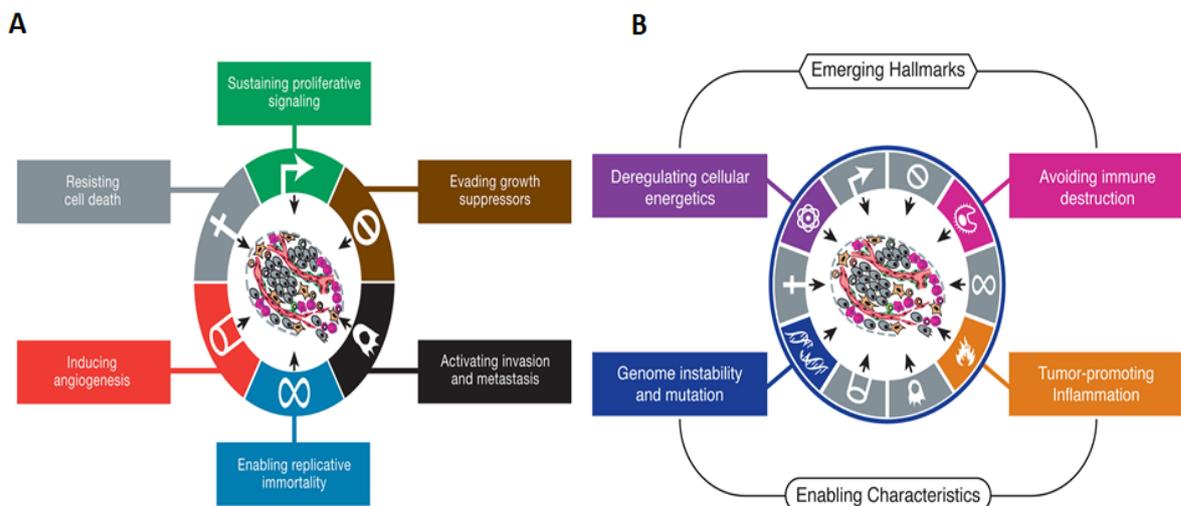


Figura 3: Esquema de las señas de identidad. Panel A, representa las 6 capacidades distintivas principales. **Panel B,** muestra las dos nuevas capacidades distintivas descubiertas recientemente, además de dos características que facilitan la adquisición de estas [9].

1.3 Glioblastoma

El glioblastoma (GBM), anteriormente denominado glioblastoma multiforme, es un tipo de tumor maligno que surge de la glía o de sus precursores en el sistema nervioso central (SNC). Los gliomas se clasifican en diferentes grados según la OMS, siendo el glioblastoma perteneciente al grado IV que se corresponde con el más agresivo y el más común en humanos [10].

Se localiza normalmente en alguno de los dos hemisferios cerebrales, pero se puede localizar en cualquier otra parte del mismo. El GBM puede presentarse a cualquier edad, pero en el 70% de los casos es en el rango de los 45-70 años, con una frecuencia de 3/100.000 personas anualmente. La enfermedad progresa muy rápidamente y la esperanza de vida de los pacientes es de unos 15 meses [11]. Su tratamiento es mixto, quirúrgico, radioterápico y con quimioterapia adyuvante con temozolomida, aunque en la mayoría de los casos, ninguno de ellos puede erradicar del todo las células tumorales debido a la naturaleza difusa de la enfermedad, lo cual hace que la cirugía sea insuficiente y que la quimioterapia también tenga limitaciones al no poder atravesar muchos medicamentos la barrera hematoencefálica [12].

Las células que constituyen al GBM son pleomórficas, lo que anteriormente lo llevó a ser llamado glioblastoma multiforme. La población de células cancerosas que lo componen consiste principalmente en células de astrocitoma y células madre de glioma (GSC), las cuales generan poblaciones de células hijas más diferenciadas y con propiedades ilimitadas de proliferación, mientras que el microambiente tumoral (TME) celular consiste en astrocitos, pericitos, telocitos, células endoteliales, neuronas (principalmente axones) y células microgliales como las células mieloides infiltrantes de glioma (GIM) o macrófagos asociados a tumores (TAM) que comprenden entre un 30-50% del tumor y son de gran importancia para el desarrollo del mismo. La conversación cruzada entre estos tipos de células es fundamental en la biología de del tumor [13, 14].

La histopatología de este tumor cerebral se caracteriza por la presencia de células en empalizada alrededor del área de necrosis, el aumento de la permeabilidad vascular o la proliferación marginal de las células endoteliales. Estas características histológicas son distintivas ya que permiten separar al GBM del resto de tumores gliales de menor grado [15].

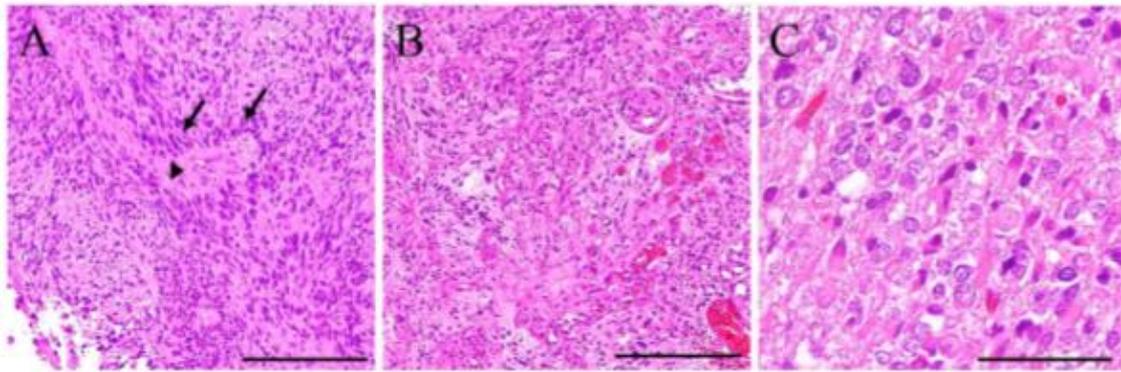


Figura 4: Tinción hematoxilina/eosina de GBM. Panel A, se observan células en empalizada alrededor del área necrótica señaladas con flechas. **Panel B**, se trata de un área de proliferación de vasos sanguíneos. **Panel C**, células tumorales con alto grado de pleomorfismo. Barra de escala: 200 μm (A y B), 60 μm (C) [15].

El GBM se caracteriza por presentar heterogeneidad celular, lo cual es clave para la tumorigénesis. Este presenta subpoblaciones de células diferentes epigenéticamente y genéticamente dentro de un solo tumor que contribuye al crecimiento, progresión y fracaso del tratamiento [16]. Esta heterogeneidad puede ser de dos tipos: intertumoral si la diferencia radica entre las células de los tumores localizados en un mismo órgano o la intratumoral en la que las diferencias están entre las células dentro de un mismo tumor. Igualmente, la heterogeneidad también se ve influenciada por el microambiente del tumor y la plasticidad celular [13].

2 PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

2.1 Hipótesis

El patrón proteico de los exosomas de pacientes con glioblastoma podría diferir del de sujetos sanos. Por ello, pretendemos estudiar los patrones de proteínas que integran los exosomas circulantes de pacientes con GBM, y establecer diferencias con el patrón proteico de las muestras de suero y exosomas de pacientes con GBM y de sujetos sanos.

Para establecer los patrones específicos del tumor GBM, tomaremos muestras antes del tratamiento quirúrgico y después de él, pero previo al tratamiento quimioterápico.

2.2 Objetivos

Los objetivos del presente estudio son los siguientes:

1. Determinar el patrón de proteinograma en exosomas y suero de pacientes con GBM antes y después del tratamiento quirúrgico, tratando de establecer las diferencias de ambos patrones.
2. Compararlo con el patrón del proteinograma de exosomas y suero de individuos sanos.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Muestras

Este trabajo fue aprobado por los Comités de Ética del Hospital Universitario Nuestra Señora de la Candelaria (HUNSC) y por el de la Universidad de La Laguna (ULL). La identificación de pacientes y controles fue codificada de nuevo para mantener en todo momento el anonimato. Las muestras de suero para este estudio se obtuvieron de dos pacientes con GBM, procedentes del HUNSC, que no tenían otra patología concurrente y que no estaban sometidos a ninguna medicación, en dos momentos: 1, antes de ser sometidos a cirugía (preoperatorio); 2, transcurrido un tiempo tras la misma, pero previo a recibir tratamiento quimioterápico (postoperatorio). El primero de los pacientes denominado GBM1 se trataba de un varón de 59 años y, el segundo paciente denominado GBM2, se trataba de una mujer de 37 años de edad.

Se usaron muestras de dos controles sanos denominados CTRL1 y CTRL2, tratándose ambos de mujeres de 22 y 27 años de edad. Pacientes y controles firmaron un consentimiento informado para la extracción y uso de la muestra.

3.2 Purificación de exosomas

Para la purificación de exosomas se empleó el kit Total Exosome Isolation, from serum (Invitrogen). Siguiendo las instrucciones del fabricante, las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 2000 g para obtener un suero purificado sin células ni residuos. Se tomaron 20 μ L para llevar a cabo la electroforesis del suero sin procesar (muestra S), y el resto de la muestra se conservó a -80°C para experimentos posteriores. Para el aislamiento de exosomas, a 150 μ L de suero se le añadieron 0,2 volúmenes de

reactivo de precipitación y se incubaron en baño de 2-8°C durante 30 minutos. Pasado este tiempo, la muestra se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 g a temperatura ambiente, recuperándose el sobrenadante, del que 20 µL se usaron para la electroforesis (muestra SN) y el resto se guardó para posteriores experimentos, y el pellet seco con los exosomas.

3.3 Lisis de exosomas

Para lisar los exosomas se añadieron 150 µL de RIPA (50 mM TRIS pH 8, 150 mM NaCl, 1% nonidet, 0,5% deoxicolato sódico, 0,1% SDS, complete 1X), y se resuspendieron con pipeta. La muestra se incubó en hielo durante 20 minutos, resuspendiendo de nuevo cada 5 minutos para asegurar que la lisis fuera completa. Finalmente, se centrifugó a 12.000 g durante 2 minutos recuperando el sobrenadante correspondiente a las proteínas contenidas en los exosomas aislados de las muestras de suero que se guardó para posteriores experimentos conservando 20 µL para llevar a cabo la electroforesis (Muestra E).

La concentración de proteínas totales presentes en las muestras de los pacientes y controles se midió en el Nanodrop 2000. Se conservaron a unas concentraciones finales de aproximadamente 5-10 µg/µL para exosomas, 50-55 µg/µL para suero y 35-40 µg/µL para sobrenadante.

3.4 Preparación de las muestras

Para las muestras del paciente GBM1 se usaron dos concentraciones diferentes, en la primera de ellas se utilizaron 5 µg de cada una de las muestras. Para la segunda concentración se tomaron 10 µg para las proteínas del suero y del sobrenadante y 15 µg para los exosomas. Para las tres muestras del paciente GBM2 se utilizaron 5 µg de proteínas.

Para el control CTRL1 se emplearon dos concentraciones, la primera de 2,5 µg de proteínas de suero y sobrenadante y 5 µg en el caso de los exosomas, y la segunda concentración se tomaron 5 y 15 µg respectivamente. Para las tres muestras del control CTRL2 se usaron 2,5 µg de proteínas del suero y el sobrenadante y 5 µg en los exosomas.

La cantidad correspondiente de cada muestra se preparó en un total de 15 μL con buffer de carga LSB 3x (63mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 2% SDS, 1.5% β -mercaptoetanol y 0.0025% de azul de bromofenol). Una vez preparadas las muestras, se les dio un pulso en la centrífuga y se calentaron a 100°C en una placa térmica durante aproximadamente 7 minutos, luego, se les volvió a dar un pulso antes de cargarlas en el gel.

3.5 Electroforesis SDS-PAGE

Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida discontinuos al 10% preparados de la siguiente manera:

1º) Gel de separación:

Agua	30%	1,5M tris, pH	10% SDS	Persulfato	TEMED
	Acrilamida/Bis	8,8		amónico	
2,03 ml	1,67 ml	1,25 ml	0,05 ml	25 μl	2,5 μl

2º) Gel de compactación al 4% de acrilamida:

Agua	30%	0,5M tris, pH	10% SDS	Persulfato	TEMED
	Acrilamida/Bis	6,8		amónico	
1,82 ml	0,4 ml	0,75 ml	0,03 ml	15 μl	3 μl

La separación se llevó a cabo en tampón de electroforesis 1X (0,2M glicina, TRIS 0,025M, SDS $3,5 \times 10^{-3}$ M, pH 8,3) a 200 V hasta que el azul de bromofenol salió del gel.

Finalmente, los geles se tiñeron con azul de Coomassie (105 ml solución Stock Coomassie, 105 ml metanol, 42 ml ácido acético) durante 20 minutos y, luego, se trataron con la solución de desteñido (40% metanol, 10% ácido acético, 50% agua).

3.6 Escaneado de las bandas

Una vez llevada a cabo la electroforesis, los geles de poliacrilamida se escanearon con el sistema Quantity One del Quemidoc (BioRad), con el que se

obtuvieron gráficas de cuantificación de las bandas de proteínas detectadas en el gel junto con los pesos moleculares (Pm).

4 RESULTADOS

4.1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

La figura 5 muestra, como ejemplo, dos electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% de muestras del paciente de GBM1 antes (panel A) y después (panel B) de la exéresis del tumor, teñidos con azul de Coomassie.

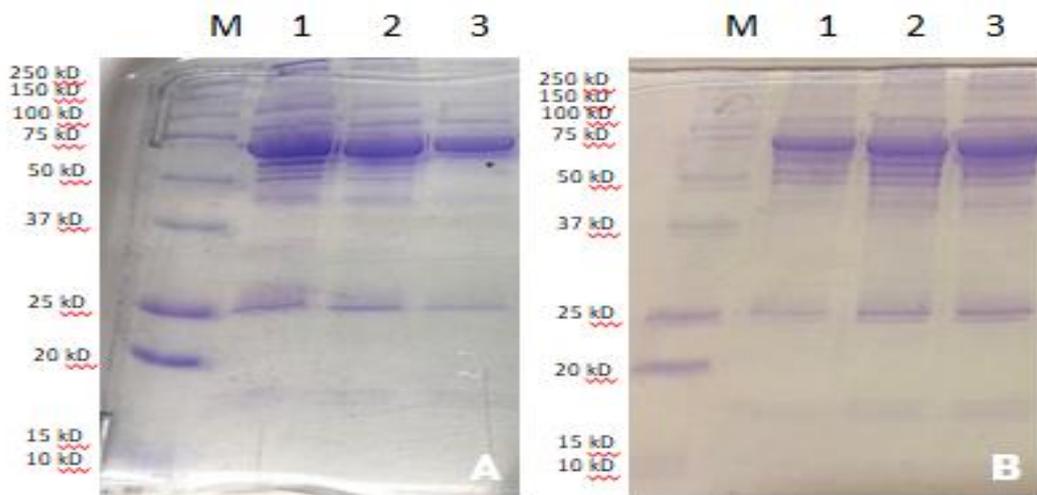


Figura 5: Electroforesis de muestras del paciente GBM1 en geles de poliacrilamida. Panel A, estado preoperatorio. Panel B, estado postoperatorio. Los geles se cargaron con 5 µg/muestra de GBM. M, marcadores de Pm; 1, exosomas GBM; 2, suero GBM; 3, sobrenadante GBM.

4.2 SDS-PAGE, gráficas de escaneado y comparación de picos

4.2.1 Geles y gráficas de escaneado de las muestras de exosomas, suero y sobrenadante

La figura 6 muestra la imagen de un SDS-PAGE al 10% (panel A) y las gráficas del escaneado (panel B) de las bandas de las líneas de exosomas (E), suero (S) y sobrenadante (SN) del paciente GBM1 en estadio preoperatorio. La comparación realizada en la gráfica del panel B identificó proteínas diferenciales de exosomas y suero, pero no de sobrenadante, señaladas en el panel A con flechas y en el B con elipses, correspondiéndose con unos Pm aparentes de 60, 50 y 37 kD.

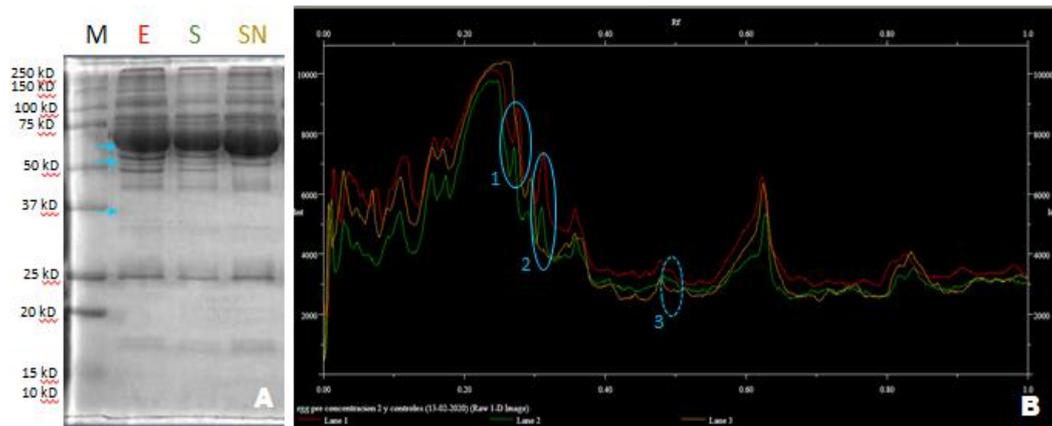


Figura 6: Electroforesis de exomas, suero y sobrenadante del paciente GBM1 en estado preoperatorio y gráfica de su escaneado. Panel A, SDS-PAGE. Panel B, gráfica de escaneado. La cantidad cargada fue de 5 µg/muestra. Las elipses y flechas señalan proteínas diferenciales. M, marcadores de Pm; E, exomas; S, suero; SN, sobrenadante.

La figura 7 muestra la imagen de un SDS-PAGE al 10% (panel A) y las gráficas del escaneado (panel B) de las bandas de las líneas de exomas (E), suero (S) y sobrenadante (SN) del paciente GBM1 en estadio postoperatorio. La comparación realizada en la gráfica del panel B identificó proteínas diferenciales de exomas y suero, pero no de sobrenadante, señaladas en el panel A con flechas y en el B con elipses, correspondiéndose con unos Pm en torno a 60, 50, 28 y 27 kD.

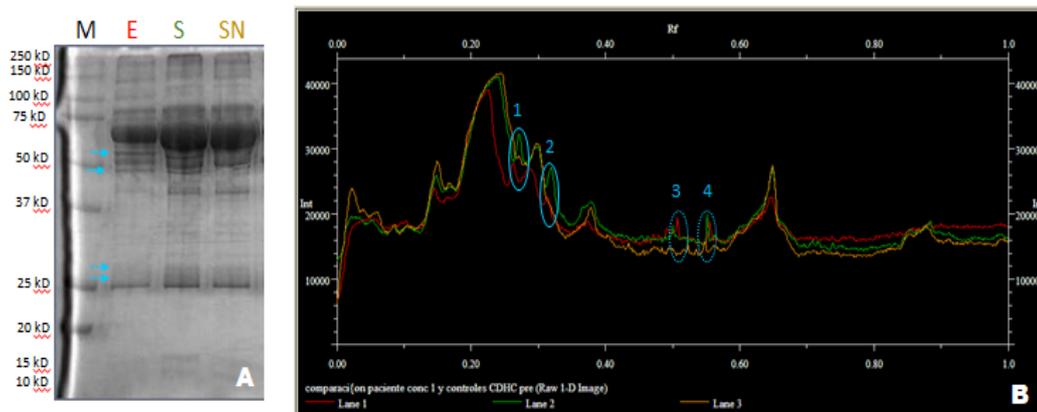


Figura 7: Electroforesis de exomas, suero y sobrenadante del paciente GBM1 en estado postoperatorio y gráfica de su escaneado. Panel A, SDS-PAGE. Panel B, gráfica de escaneado. Se cargaron 5 µg/muestra. Las elipses y flechas señalan proteínas diferenciales. M, marcadores de Pm; E, exomas; S, suero; SN, sobrenadante.

La figura 8 muestra la imagen de un SDS-PAGE al 10% (panel A) y las gráficas del escaneado (panel B) de las bandas de las líneas de exomas (E), suero (S) y sobrenadante (SN) del paciente GBM2 en estadio preoperatorio. La comparación realizada en la gráfica del panel B identificó proteínas diferenciales de exomas y suero, pero no de sobrenadante, señaladas en el panel A con flechas y en el B con elipses, correspondiéndose con unos Pm de 125, 75, 20 y 10 kDa aproximadamente.

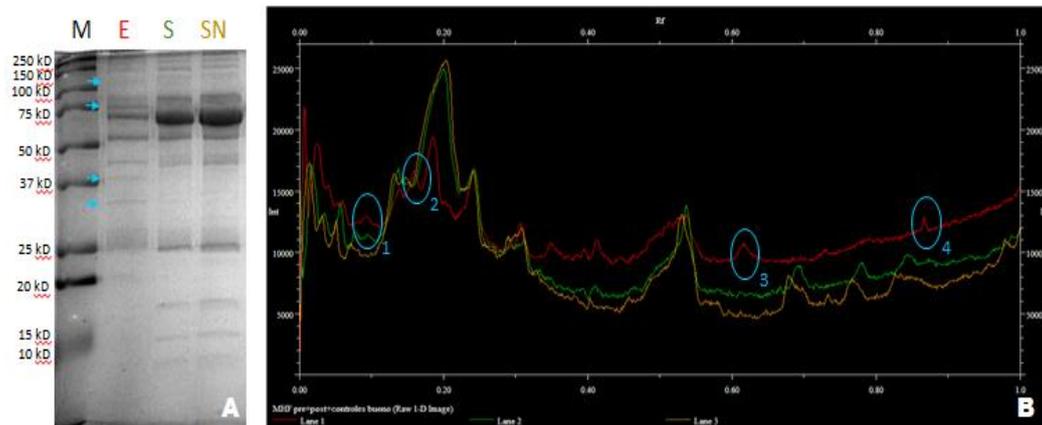


Figura 8: Electroforesis de exosomas, suero y sobrenadante del paciente GBM2 en estado preoperatorio y gráfica de su escaneado. Panel A, SDS-PAGE. Panel B, gráfica de escaneado. La cantidad cargada fue de 5 μg /muestra. Las elipses y flechas señalan proteínas diferenciales. M, marcadores de Pm; E, exosomas; S, suero; SN, sobrenadante.

La figura 9 muestra la imagen de un SDS-PAGE al 10% (panel A) y las gráficas del escaneado (panel B) de las bandas de las líneas de exosomas (E) y suero (S) del paciente GBM2 en estadio postoperatorio. La comparación realizada en la gráfica del panel B identificó proteínas diferenciales de exosomas y suero, pero no de sobrenadante, señaladas en el panel A con flechas y en el B con elipses, correspondiéndose con unos Pm aparentes de 75 y 60 kD.

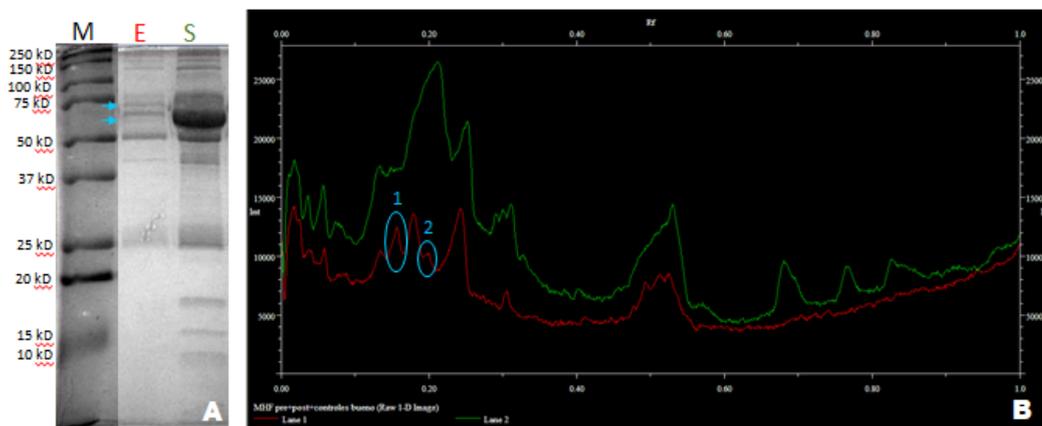


Figura 9: Electroforesis de exosomas, suero y sobrenadante del paciente GBM2 en estado postoperatorio y gráfica de su escaneado. Panel A, SDS-PAGE. Panel B, gráfica de escaneado. La cantidad cargada fue de 5 μg /muestra. Las elipses y flechas señalan proteínas diferenciales. M, marcadores de Pm; E, exosomas; S, suero.

La figura 10 muestra la imagen de un SDS-PAGE al 10% (panel A) y las gráficas del escaneado (panel B) de las bandas de las líneas de exosomas (E), suero (S) y sobrenadante (SN) del control CTRL1. La comparación realizada en la gráfica del panel B identificó proteínas diferenciales de exosomas y suero, pero no de

sobrenadante, señaladas en el panel A con flechas y en el B con elipses, correspondiéndose con un Pm alrededor de 75 kD.

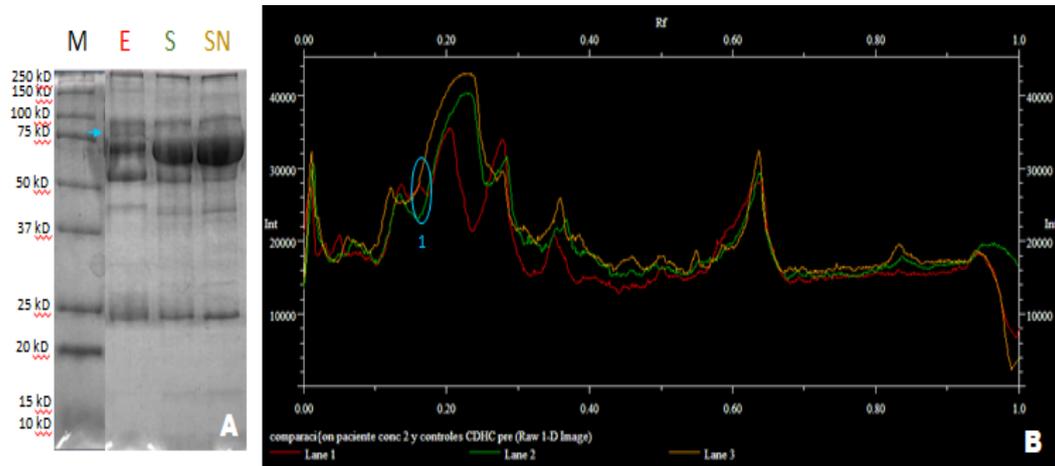


Figura 10: Electroforesis de exosomas, suero y sobrenadante del control CTRL1 y gráfica de su escaneado. Panel A, SDS-PAGE. Panel B, gráfica de escaneado. La cantidad cargada fue de 5 μ g de proteína en exosomas y 2,5 en suero y sobrenadante. Las elipses y flechas en azul señalan proteínas diferenciales. M, marcadores de Pm; E, exosomas; S, suero; SN, sobrenadante.

La figura 11 muestra la imagen de un SDS-PAGE al 10% (panel A) y las gráficas del escaneado (panel B) de las bandas de las líneas de exosomas (E), suero (S) y sobrenadante (SN) del control CTRL2. La comparación realizada en la gráfica del panel B identificó proteínas diferenciales de exosomas y suero, pero no de sobrenadante, señaladas en el panel A con flechas y en el B con elipses, correspondiéndose con unos Pm de 75 y 30 kDa aproximadamente.

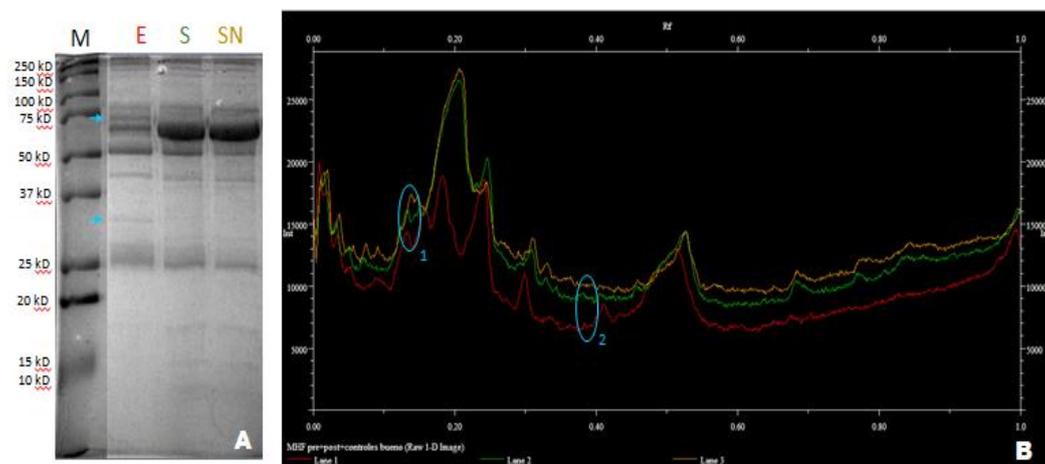


Figura 11: Electroforesis de exosomas, suero y sobrenadante del control CTRL2 y gráfica de su escaneado. Panel A, SDS-PAGE. Panel B, gráfica de escaneado. La cantidad cargada fue de 5 μ g de proteína en exosomas y 2,5 en suero y sobrenadante. Las elipses y flechas en azul señalan proteínas diferenciales. M, marcadores de Pm; E, exosomas; S, suero; SN, sobrenadante.

4.2.2 Comparación de picos en las gráficas de escaneado de las muestras de exosomas, suero y sobrenadante

-Paciente GBM1 preoperatorio y postoperatorio: los picos señalados por las elipses 1 y 2 en la gráfica de la figura 5 (paciente GBM1 preoperatorio) con unos Pm en torno a 60 y 50 kD, se corresponden con los marcados por las elipses 1 y 2 en la gráfica de la figura 6 (paciente GBM1 postoperatorio). La elipse 3 señala un pico de 37 kDa en el preoperatorio y desaparece en el postoperatorio, apareciendo en este los picos incluidos en las elipses 3 y 4 con Pm aparentes de 28 y 27 kDa respectivamente.

-Paciente GBM1 preoperatorio y control CTRL1: los picos señalados por las elipses 1, 2 y 3 de 60, 50 y 37 kDa aproximadamente en la gráfica de la figura 5 (paciente GBM1 preoperatorio) no se corresponden con ningún pico del control CTRL1 (figura 9), ya que el único que aparece en este es el marcado por la elipse 1 y posee un Pm en torno a 75 kD.

-Paciente GBM1 postoperatorio y control CTRL1: los picos señalados por las elipses 1, 2, 3 y 4 con Pm aparentes de 60, 50, 28 y 27 kDa respectivamente en la gráfica de la figura 6 (paciente GBM1 postoperatorio) no se corresponden con ningún pico del control CTRL1 (figura 9), ya que el único que aparece en este es el marcado con la elipse 1 y posee un Pm alrededor de 75 kD.

-Paciente GBM2 preoperatorio y postoperatorio: el pico señalado por la elipse 2 en la gráfica de la figura 7 (paciente GBM3 preoperatorio) señalando un Pm de en torno a 75 kDa se corresponde con el marcado por la elipse 1 en la gráfica de la figura 8 (paciente GBM1 postoperatorio). Los picos marcados por las elipses 1, 3 y 4 del preoperatorio poseen unos Pm de 125, 20 y 10 kDa que desaparecen en el postoperatorio, apareciendo el pico incluido en la elipse 2 con Pm de 60 kDa aproximadamente.

-Paciente GBM2 preoperatorio y control CTRL2: el pico señalado por la elipse 2 de en torno a 75 kDa en la gráfica de la figura 7 (paciente GBM2 preoperatorio) se corresponde con el marcado por la elipse 1 del control CTRL2 (figura 10). Los picos marcados por las elipses 1, 3 y 4 de en torno a 125, 20 y 10 kDa respectivamente del preoperatorio no se corresponden con ninguno de los del

control CTRL2, ya que el único que hay en este es el pico incluido en la elipse 2 con Pm aparente de 30 kD.

-*Paciente GBM2 postoperatorio y control CTRL2*: el pico señalado por la elipse 1 de alrededor de 75 kDa en la gráfica 8 (paciente GBM2 postoperatorio) se corresponde con el marcado por la elipse 1 del control CTRL2 (figura 10). El pico incluido en la elipse 2 del postoperatorio de 60 kDa no se corresponde con ninguno del control, ya que el único que hay en este es el marcado por la elipse 2 con Pm en torno a 30 kD.

4.2.3 Geles y gráficas de escaneado de las muestras de suero con los Pm

La figura 12 muestra la imagen de un SDS-PAGE al 10% (panel A) y las gráficas del escaneado (panel B) de las bandas de la línea de suero (S) del paciente GBM1 en estadio preoperatorio. Con la gráfica del panel B se han llevado a cabo las comparaciones entre las proteínas presentes en suero con respecto al Pm. Las flechas del panel A señalan proteínas coincidentes con unos Pm aparentes de 250, 50 y 25 kDa que aparecen en el panel B señaladas por medio de elipses.

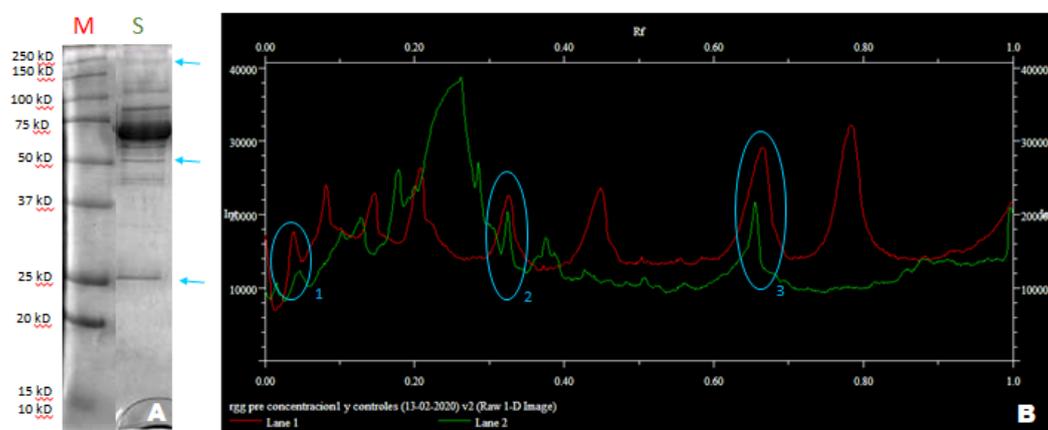


Figura 12: Electroforesis y gráfica de su escaneado del suero del paciente GBM1 en estado preoperatorio. Panel A, SDS-PAGE. Panel B, gráfica de escaneado. La cantidad cargada de muestra fue de 10 µg de proteínas. Las elipses y flechas señalan proteínas coincidentes. M, marcadores de Pm; S, suero.

La figura 13 muestra la imagen de un SDS-PAGE al 10% (panel A) y las gráficas del escaneado (panel B) de las bandas de la línea de suero (S) del paciente GBM1 en estadio postoperatorio. Con la gráfica del panel B se llevaron a cabo las comparaciones entre las proteínas presentes en suero con respecto al Pm. Las flechas del panel A señalan proteínas coincidentes con unos Pm aproximados de 150, 75, 50 y 25 kDa que aparecen en el panel B señaladas por medio de elipses.

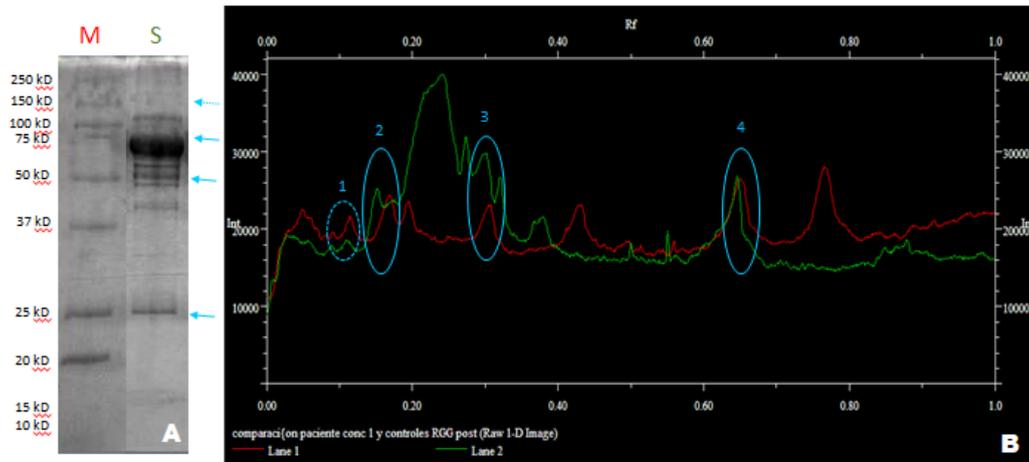


Figura 13: Electroforesis y gráfica de su escaneado del suero del paciente GBM1 en estado postoperatorio. Panel A, SDS-PAGE. Panel B, gráfica de escaneado. La cantidad cargada de muestra fue de 10 μ g de proteínas. Las elipses y flechas señalan proteínas coincidentes. M, marcadores de Pm; S, suero.

La figura 14 muestra la imagen de un SDS-PAGE al 10% (panel A) y las gráficas del escaneado (panel B) de las bandas de la línea de suero (S) del paciente GBM2 en estadio preoperatorio. Con la gráfica del panel B se llevaron a cabo las comparaciones entre las proteínas presentes en suero con respecto al Pm. Las flechas del panel A señalan proteínas coincidentes con unos Pm de en torno a 250, 150, 75, 50 y 25 kDa que aparecen en el panel B señaladas por medio de elipses.

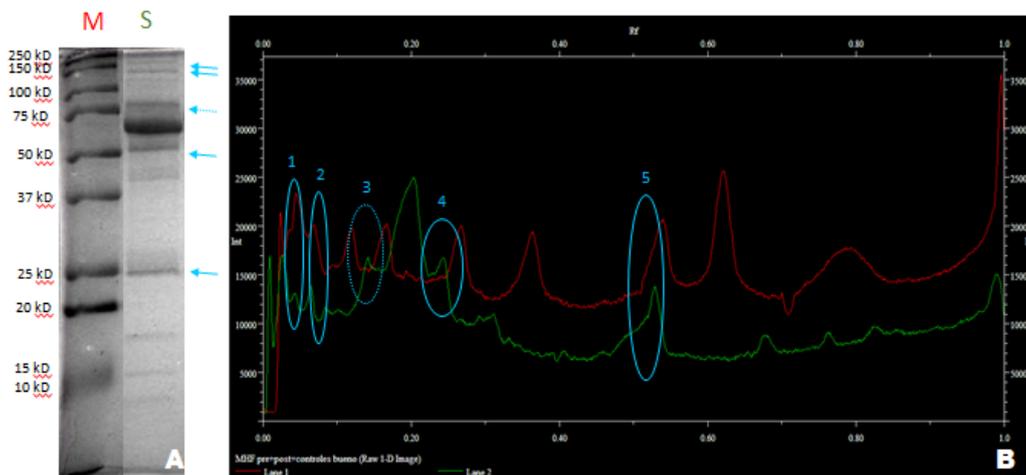


Figura 14: Electroforesis y gráfica de su escaneado del suero del paciente GBM2 en estado preoperatorio. Panel A, SDS-PAGE. Panel B, gráfica de escaneado. La cantidad cargada de muestra fue de 5 μ g de proteínas. Las elipses y flechas señalan proteínas coincidentes. M, marcadores de Pm; S, suero.

La figura 15 muestra la imagen de un SDS-PAGE al 10% (panel A) y las gráficas del escaneado (panel B) de las bandas de la línea de suero (S) del paciente GBM2 en estadio postoperatorio. Con la gráfica del panel B se llevaron a cabo las comparaciones entre las proteínas presentes en suero con respecto al Pm. Las flechas del

panel A señalan proteínas coincidentes con unos Pm alrededor de 250, 150, 75, 50 y 25 kDa que aparecen en el panel B señaladas por medio de elipses.

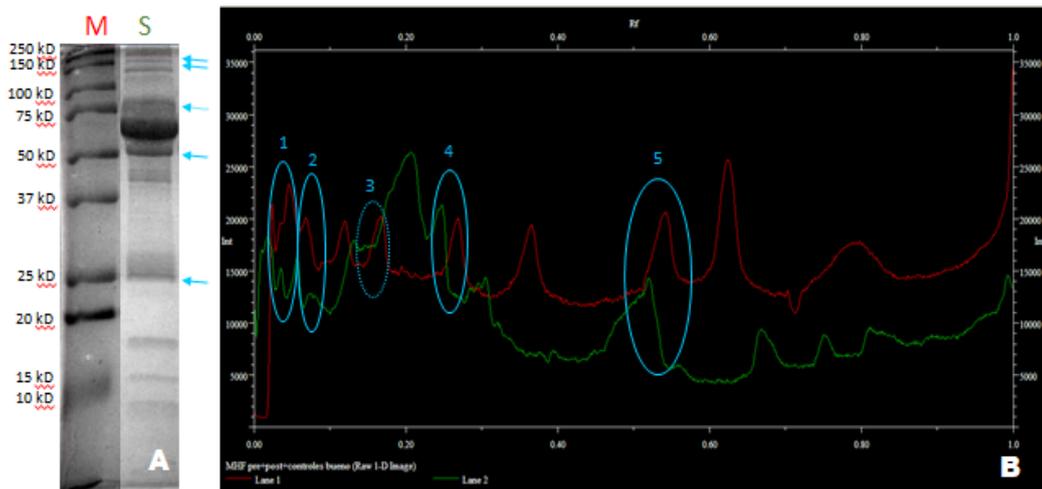


Figura 15: Electroforesis y gráfica de su escaneado del suero paciente GBM2 en estado postoperatorio. Panel A, SDS-PAGE. Panel B, gráfica de escaneado. La cantidad cargada de muestra fue de 5 μ g de proteínas. Las elipses y flechas señalan proteínas coincidentes. M, marcadores de Pm; S, suero.

La figura 16 muestra la imagen de un SDS-PAGE al 10% (panel A) y las gráficas del escaneado (panel B) de las bandas de la línea de suero (S) del control CTRL1. Con la gráfica del panel B se llevaron a cabo las comparaciones entre las proteínas presentes en suero con respecto al Pm. Las flechas del panel A señalan proteínas coincidentes con unos Pm aparentes de 150, 100, 50 y 25 kDa que aparecen en el panel B señaladas por medio de elipses.

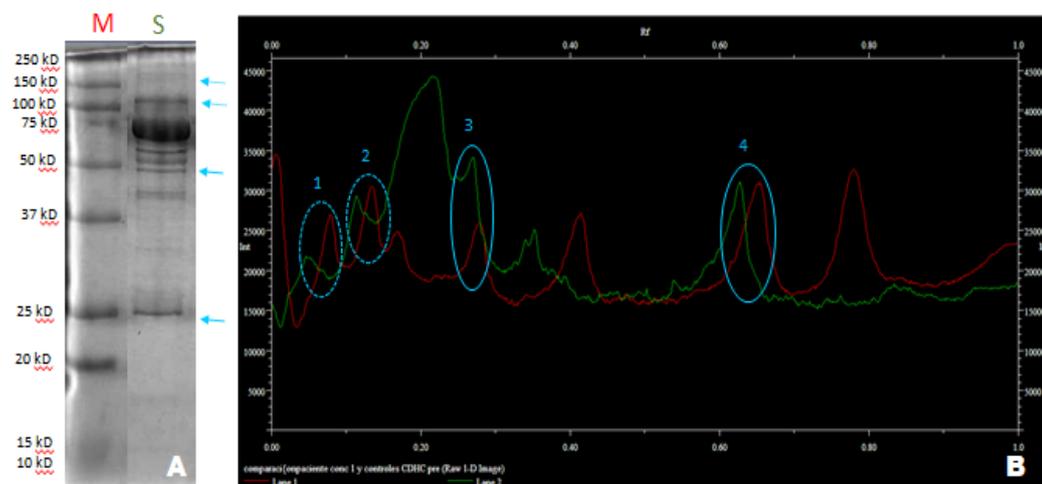


Figura 16: Electroforesis y gráfica de su escaneado del suero del control CTRL1. Panel A, SDS-PAGE. Panel B, gráfica de escaneado. La cantidad de muestra cargada fue de 2,5 μ g de proteínas. Las elipses y flechas señalan proteínas coincidentes. M, marcadores de Pm; S, suero.

La figura 17 muestra la imagen de un SDS-PAGE al 10% (panel A) y las gráficas del escaneado (panel B) de las bandas de la línea de suero (S) del control CTRL2. Con la gráfica del panel B se llevaron a cabo las comparaciones entre las proteínas presentes en suero con respecto al Pm. Las flechas del panel A señalan proteínas coincidentes con unos Pm en torno a 250, 150, 75, 50 y 25 kDa que aparecen en el panel B señaladas por medio de elipses.

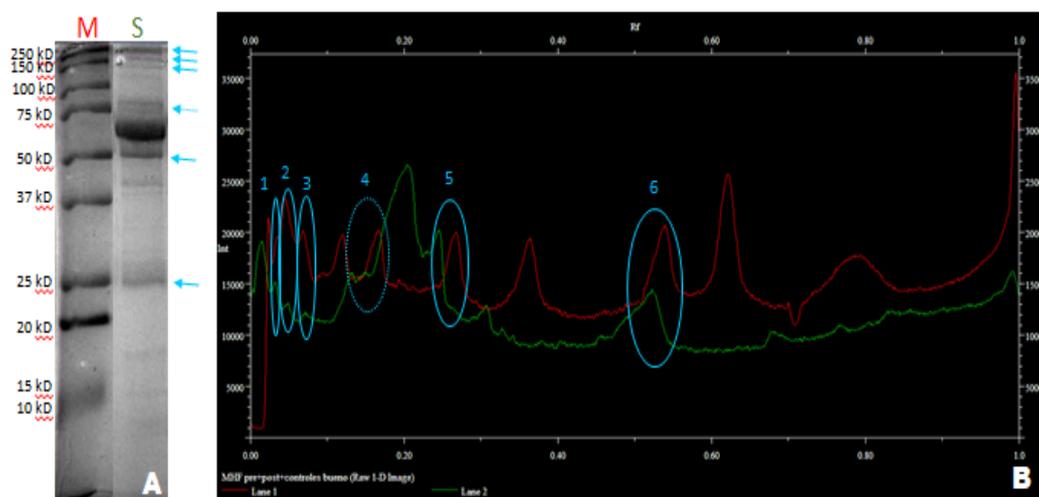


Figura 17: Electroforesis y gráfica de su escaneado del suero del control CTRL2. Panel A, SDS-PAGE. Panel B, gráfica de escaneado. La cantidad de muestra cargada fue de 2,5 μ g de proteínas. Las elipses y flechas señalan proteínas coincidentes. M, marcadores de Pm; S, suero.

4.2.4 Comparación de picos en las gráficas de escaneado de las muestras de suero con los Pm

-Paciente GBM1 preoperatorio y postoperatorio: los picos señalados por las elipses 2 y 3 de en torno a 50 y 25 kDa respectivamente en la gráfica de la figura 11 (paciente GBM1 preoperatorio) se corresponden con los marcados por las elipses 3 y 4 de la gráfica de la figura 12 (paciente GBM1 postoperatorio). El pico marcado por la elipse 1 de alrededor de 250 kDa del preoperatorio desaparece en el postoperatorio, donde aparecen los incluidos en las elipses 1 y 2 con Pm aparente de 150 y 75 kD.

-Paciente GBM1 preoperatorio y control CTRL1: los picos señalados por las elipses 2 y 3 de 50 y 25 kDa aproximadamente en la gráfica de la figura 11 (paciente GBM2 preoperatorio) se corresponden con los marcados por las elipses 3 y 4 del control CTRL1 (figura 15). El pico incluido en la elipse 1 del preoperatorio de 250 kDa desaparece en el control, donde aparecen los marcados por las elipses 1 y 2 con Pm aparente de 150 y 100 kD.

-Paciente GBM1 postoperatorio y control CTRL1: los picos señalados por las elipses 1, 3 y 4 de alrededor de 150, 50 y 25 kDa en la gráfica de la figura 12 (paciente GBM2 postoperatorio) se corresponden con los marcados por las elipses 1, 3 y 4 del control CTRL1 (figura 15). El pico incluido en la elipse 2 de 75 kDa en el postoperatorio desaparece en el control, donde aparece el marcado por la elipse 2 con Pm en torno a 100 Kd.

-Paciente GBM2 preoperatorio y postoperatorio: los picos señalados por las elipses 1, 2, 3, 4 y 5 con Pm aparente de 250, 150, 75, 50 y 25 kDa en la gráfica de la figura 13 (paciente GBM2 preoperatorio) se corresponden perfectamente con los marcados por las elipses 1, 2, 3, 4 y 5 de la gráfica de la figura 14 (paciente GBM2 postoperatorio).

-Paciente GBM2 preoperatorio y control CTRL2: los picos señalados por las elipses 1, 2, 3, 4 y 5 de alrededor de 250, 150, 75, 50 y 25 kDa en la gráfica de la figura 13 (paciente GBM2 preoperatorio) se corresponden perfectamente con los marcados por las elipses 1, 2, 4, 5 y 6 del control CTRL2 (figura 16). En el caso del control aparece además el pico incluido en la elipse 3 con Pm en torno a 125 kD.

-Paciente GBM2 postoperatorio y control CTRL2: los picos señalados por las elipses 1, 2, 3, 4 y 5 de aproximadamente 250, 150, 75, 50 y 25 kDa en la gráfica de la figura 14 (paciente GBM2 postoperatorio) se corresponden perfectamente con los marcados por las elipses 1, 2, 4, 5 y 6 del control CTRL2 (figura 16). En el caso del control aparece además el pico marcado por la elipse 3 con Pm alrededor de 125 kD.

4.2.5 Geles y gráficas de escaneado de las muestras de exosomas de pacientes y controles

La figura 18 muestra la imagen de un SDS-PAGE al 10% (panel A) y las gráficas del escaneado (panel B) de las bandas de la línea de exosomas del paciente (EP) GBM1 en estadio preoperatorio y del control (Ec) CTRL1. Con las gráficas del panel B se llevaron a cabo las comparaciones entre las proteínas presentes en exosomas del paciente y del control. Las flechas del panel A señalan proteínas diferenciales entre ambas muestras de exosomas que aparecen en el panel B señaladas por medio de elipses, con Pm aparentes de 60, 50 y 18 kD.

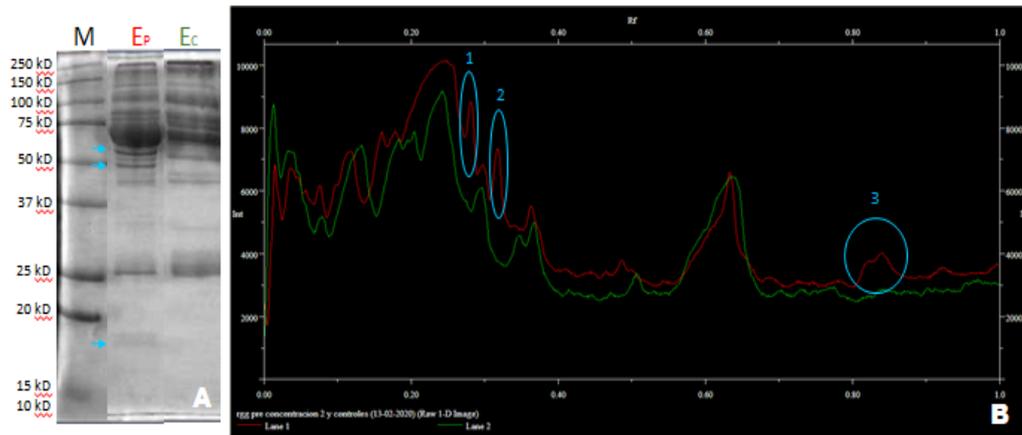


Figura 18: Electroforesis de exosomas del paciente GBM1 en estadio preoperatorio y del control CTRL1 y gráfica de su escaneado. Panel A, SDS-PAGE. Panel B, gráfica de escaneado. La cantidad cargada fue de 5 μ g/muestra en ambos casos. Las elipses y flechas señalan proteínas diferenciales. M, marcadores de Pm; EP, exosomas paciente; EC, exosomas control.

La figura 19 muestra la imagen de un SDS-PAGE al 10% (panel A) y las gráficas del escaneado (panel B) de las bandas de la línea de exosomas del paciente (EP) GBM1 en estadio postoperatorio y del control (Ec) CTRL1. Con las gráficas del panel B se llevaron a cabo las comparaciones entre las proteínas presentes en exosomas del paciente y del control. Las flechas del panel A señalan proteínas diferenciales entre ambas muestras de exosomas que aparecen en el panel B señaladas por medio de elipses, con Pm en torno a 85, 50 y 40 kD.

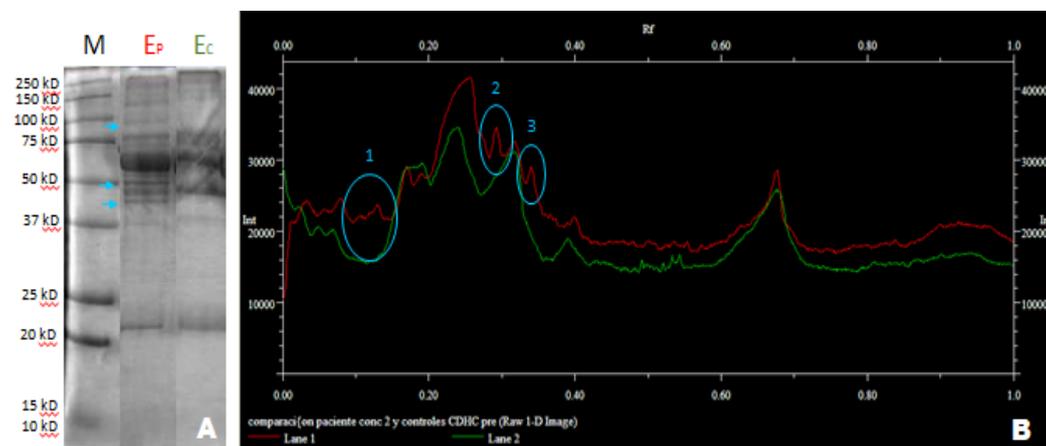


Figura 19: Electroforesis de exosomas del paciente GBM1 en estadio postoperatorio y el control CTRL1 y gráfica de su escaneado. Panel A, SDS-PAGE. Panel B, gráfica de escaneado. La cantidad cargada fue de 5 μ g/muestra en ambos casos. Las elipses y flechas señalan proteínas diferenciales. M, marcadores de Pm; EP, exosomas paciente; EC, exosomas control.

La figura 20 muestra la imagen de un SDS-PAGE al 10% (panel A) y las gráficas del escaneado (panel B) de las bandas de la línea de exosomas del paciente (EP) GBM2 en estadio preoperatorio y del control (Ec) CTRL1. Con las gráficas del panel B se llevaron a cabo las comparaciones entre las proteínas presentes en exosomas del

paciente y del control. Las flechas del panel A señalan proteínas diferenciales entre ambas muestras de exosomas que aparecen en el panel B señaladas por medio de elipses, con Pm de 60, 20 y 10 kDa aproximadamente.

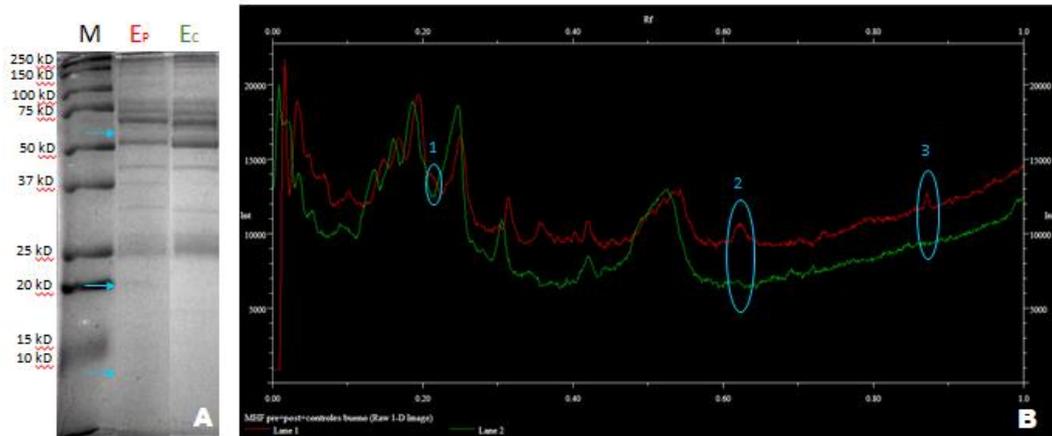


Figura 20: Electroforesis de exosomas del paciente GBM2 en estadio preoperatorio y el control CTRL2 y gráfica de su escaneado. Panel A, SDS-PAGE. Panel B, gráfica de escaneado. La cantidad cargada fue de 5 μ g/muestra en ambos casos. Las elipses y flechas señalan proteínas diferenciales. M, marcadores de Pm; EP, exosomas paciente; EC, exosomas control.

La figura 21 muestra la imagen de un SDS-PAGE al 10% (panel A) y las gráficas del escaneado (panel B) de las bandas de la línea de exosomas del paciente (EP) GBM2 en estadio postoperatorio y del control (EC) CTRL1. Con las gráficas del panel B se llevaron a cabo las comparaciones entre las proteínas presentes en exosomas del paciente y del control. Las flechas del panel A señalan proteínas diferenciales entre ambas muestras de exosomas que aparecen en el panel B señaladas por medio de elipses, con Pm alrededor de 60 kD.

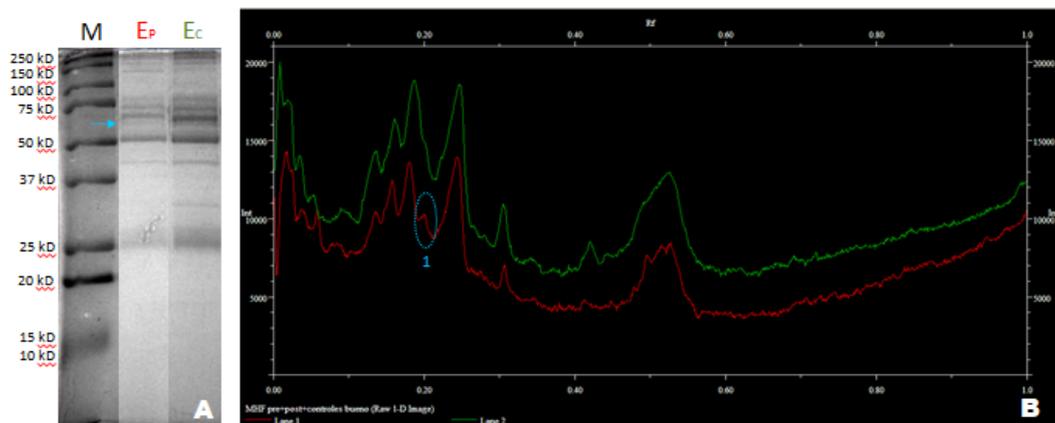


Figura 21: Electroforesis de exosomas del paciente GBM2 en estadio postoperatorio y el control CTRL2 y gráfica de su escaneado. Panel A, SDS-PAGE. Panel B, gráfica de escaneado. La cantidad cargada fue de 5 μ g/muestra en ambos casos. Las elipses y flechas señalan proteínas diferenciales. M, marcadores de Pm; EP, exosomas paciente; EC, exosomas control.

4.2.6 Comparación de picos en las gráficas de escaneado de las muestras de exosomas de pacientes y controles

-Paciente GBM1 preoperatorio y postoperatorio: el pico señalado por la elipse 2 con un Pm de en torno a 50 kDa en la gráfica de la figura 17 (paciente GBM1 preoperatorio) se corresponde con el marcado por la elipse 2 de la gráfica de la figura 18 (paciente GBM1 postoperatorio). En el preoperatorio las elipses 1 y 3 marcan picos de alrededor de 60 y 18 kDa respectivamente que desaparecen en el postoperatorio, donde se encuentran los picos incluidos en las elipses 1 y 3 con Pm aparente de 85 y 40 kD.

-Paciente GBM2 preoperatorio y postoperatorio: el pico señalado por la elipse 1 de 60 kDa aproximadamente en la gráfica de la figura 19 (paciente GBM2 preoperatorio) se corresponde con el marcado por la elipse 1 de la gráfica de la figura 20 (paciente GBM2 postoperatorio). En el preoperatorio aparecen los picos incluidos en las elipses 2 y 3 con Pm en torno a 20 y 10 kDa que desaparecen en el postoperatorio.

5 DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo era determinar el patrón del proteinograma de exosomas y suero de pacientes con GBM y compararlo con el de individuos sanos. Los resultados obtenidos nos permiten concluir que hay proteínas diferenciales entre los pacientes y los controles, y en pacientes antes y después de haber sido operados, lo que nos lleva a deducir que esas proteínas de exosomas y, consecuentemente, esos exosomas son específicos del GBM.

Las muestras que fueron empleadas procedían del HUNSC y cumplían con los requisitos necesarios para poder llevar a cabo este estudio, es decir, suero de pacientes con GBM antes y después de haber sido operados, que no padecían enfermedad concurrente y no estaban sometidos a quimioterapia o a cualquier otro tratamiento. Los controles fueron individuos aparentemente sanos y que no estaban sometidos a ningún tratamiento desde, al menos, dos años antes.

La concentración aplicada en el caso de las muestras de exosomas es mayor que la aplicada para el suero y el sobrenadante dado que las proteínas presentes en estas dos

últimas se corresponden mayoritariamente con albúmina y en el caso de la muestra de exosomas, entre las bandas de proteínas no hay ninguna tan predominante.

Se emplearon dos controles diferentes, el CTRL1 que fue estudiado junto a las muestras del paciente GBM1 y el control CTRL2 que fue estudiado junto con las muestras del paciente GBM2. Ambos son similares, con las pequeñas diferencias existentes entre individuos con la variabilidad genética de los humanos.

Las elipses y las flechas con las que se señalan los elementos de las gráficas están constituidas por líneas continuas, si se tiene certeza de que lo que ocurre es totalmente cierto, o por líneas discontinuas si presentaba alguna duda, precisando, por tanto, de posteriores experimentos.

5.1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Escogimos los geles pertenecientes al paciente GBM1 como muestra para la Figura 5 por ser la electroforesis de su menor concentración la más representativa en bandas de proteínas de los exosomas, suero y sobrenadante.

5.2 SDS-PAGE, gráficas de escaneado y comparación de bandas

5.2.1 Comparación de picos en las gráficas de escaneado de las muestras de exosomas, suero y sobrenadante

Hemos tomado las muestras del paciente GBM1 y del control CTRL1 en la concentración más baja estudiada ya que pensamos que en dichos geles las bandas se representan mejor, por otro lado, en el paciente GBM2 y el control CTRL2 se tomó la única concentración a la que fueron estudiados.

Sabiendo que el suero se compone de exosomas y de otro tipo de proteínas libres y que hemos separado el sobrenadante que es el que contendría a estas últimas, podríamos llegar a la conclusión de que las proteínas restantes son específicas de exosomas al ser transportadas por ellos. Por este motivo, en las gráficas se ha señalado exclusivamente con las elipses y flechas a las proteínas diferenciales que solo están presentes en estas muestras y no en el sobrenadante.

Teniendo en cuenta que para que una proteína pueda ser específica del tumor es necesario que esta aparezca en las muestras del paciente en estado preoperatorio pero que no aparezca en el estado postoperatorio ni en el control sano podemos concluir que,

atendiendo a estos requisitos, el paciente GBM1 posee en las muestras de exosomas y suero una proteína de 37 kDa que podría ser específica del tumor y el paciente GBM2 posee tres proteínas de 125, 20 y 10 kD.

5.2.2 Comparación de picos en las gráficas de escaneado de las muestras de suero con los Pm

Las muestras de suero del paciente GBM1 y el control CTRL1 empleadas fueron las de la mayor concentración dentro de las estudiadas por ser la más representativa, asimismo, en el caso del paciente GBM2 y el control CTRL2 se utilizó la única estudiada.

El suero contiene tanto a las proteínas libres como a los exosomas, por ello, en las gráficas se ha tratado de señalar con las elipses y flechas a aquellas proteínas presentes en el suero con respecto al marcador molecular para así poder identificar con mayor certeza cuales son los Pm que poseen.

Teniendo en cuenta que para que una proteína pueda ser específica del tumor es necesario que esta aparezca en las muestras del paciente en estado preoperatorio pero que no aparezca en el estado postoperatorio ni en el control sano podemos concluir que, teniendo en cuenta estos requisitos, el paciente GBM1 posee una proteína de 250 kDa pero que el paciente GBM2 no posee proteínas que cumplan estos requisitos.

5.2.3 Comparación de picos en las gráficas de escaneado de las muestras de exosomas de pacientes y controles

Las muestras de exosomas tomadas del paciente GBM1 y del control CTRL1 fueron las de menor concentración estudiada en ambos casos por ser las más representativas, por otro lado, las del paciente GBM2 y el control CTRL2 se tomaron a la única concentración estudiada para ellos.

En el estudio se pretende evidenciar la existencia de proteínas diferenciales de los exosomas tumorales como punto de partida del estudio de su papel en el proceso de expansión del tumor. Por ello, en las gráficas se señalan con elipses y las flechas la presencia de proteínas que difieren entre las muestras de exosomas de pacientes y controles.

Consideramos que una proteína puede ser específica del tumor cuando está en las muestras de exosomas del paciente preoperatorio pero que no está en las muestras de

exosomas del estado postoperatorio (ya que, como habíamos comentado, las elipses y flechas indican que no están en el control), podemos concluir que, teniendo en cuenta estos requisitos el paciente GBM1 posee proteínas diferenciales de 60 y 18 kDa y el paciente GBM2 posee dos de 20 y 10 kD.

Una vez determinadas estas proteínas comenzamos nuevos experimentos para comprobar si se trataban de proteínas glicosiladas mediante la técnica de Schiff pero, tuvieron que ser interrumpidos debido a las medidas tomadas para la contención de la pandemia Covid-19, teniendo que ajustar este trabajo a los resultados obtenidos previamente al decreto del estado de alarma.

El remanente de muestras de todas las fracciones estudiadas, exosomas, suero y sobrenadante, tanto de los pacientes como de los controles se conservaron para posteriores experimentos. Es necesario continuar y matizar este estudio con un mayor número de pacientes para evidenciar las que realmente son proteínas tumorales, diferenciándolas no solo de los controles, sino también de las que pudieran ser circunstanciales en el proceso tumoral o en el momento de la extracción. Poseemos muestras de los tumores extraídos en los que debemos, bien por inmunohistoquímica o por otro medio, localizar estas proteínas diferenciales que, necesariamente, necesitan una identificación previa.

6 CONCLUSIONES

1. Dentro de las limitaciones de nuestra muestra, los exosomas circulantes de pacientes con glioblastoma presentan un proteinograma de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS cuantitativa y cualitativamente diferente entre antes y después de la exéresis quirúrgica del tumor. Proteínas con Pm aparentes de 250, 125, 60, 37, 20, 18 y 10 kDa están en los exosomas de pacientes con GBM antes de la cirugía y desaparecen tras ella.
2. El proteinograma de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de exosomas circulantes de pacientes con glioblastoma presenta un patrón diferencial respecto al de controles sanos. Proteínas con Pm aparentes de 250, 125, 60, 50, 28, 27, 20 y 10 kDa están en los exosomas de pacientes con GBM antes de la cirugía pero no en el control sano.
3. Comparando los proteinogramas de exosomas obtenidos de los pacientes tras la exéresis del tumor con los de los controles sanos, hemos encontrado que proteínas con Pm aparentes de 250, 150, 75, 50 y 25 kDa aparecen en ambas muestras y, por tanto, presentan patrón similares.

7 CONCLUSIONS

1. Within the limits of our sample, circulating exosomes of patients suffering from glioblastoma present a quantitatively and qualitatively differential SDS polyacrylamide-gel electrophoresis proteinogram pattern before and after the surgical excision of the tumour. Proteins with apparent Mr of 250, 125, 60, 37, 20, 18 and 10 kDa are in the exosomes of patients with GBM before surgery and disappear after the procedure.
2. The SDS polyacrylamide gel electrophoresis proteinogram of circulating exosomes from patients suffering from glioblastoma shows a differential pattern compared to healthy controls. Proteins with apparent Mr of 250, 125, 60, 50, 28, 27, 20 and 10 kDa appear in proteinograms from exosomes of GBM suffering patients with but not in the healthy control.
3. Comparing exosome proteinograms from patients after tumour excision with those of healthy controls, we found that proteins with apparent Mr of 250, 150, 75, 50 and 25 kDa appear in both samples and, therefore, they show similar patterns.

8 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Steinbichler, T. B., Dudás, J., Riechelmann, H., & Skvortsova, I. I. (2017). The role of exosomes in cancer metastasis. *Seminars in Cancer Biology*, *44*, 170–181. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.02.006>
- [2] Díaz-Flores, L., Gutiérrez, R., Alvarez-Argüelles, H., Díaz-Flores, L., González, R., Martín-Vasallo, P., & Carrasco, J. L. (2018). Extracellular multivesicular bodies in tissues affected by inflammation/repair and tumors. *Ultrastructural Pathology*, *42*(5), 448–457. <https://doi.org/10.1080/01913123.2018.1534915>
- [3] Hessvik, N. P., & Llorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*(2), 193–208. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2595-9>
- [4] Zhang, H. G., & Grizzle, W. E. (2014). Exosomes: A novel pathway of local and distant intercellular communication that facilitates the growth and metastasis of neoplastic lesions. *American Journal of Pathology*, *184*(1), 28–41. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.09.027>
- [5] Edgar, J. R. (2016). Q & A: What are exosomes, exactly? *BMC Biology*, *14*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0268-z>
- [6] Mitrus, I., Bryndza, E., Sochanik, A., & Szala, S. (2012). Evolving models of tumor origin and progression. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *33*(4), 911–917. <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0389-0>
- [7] Sociedad Española de Oncología Médica. (2020). *Cifras del cáncer en España / SEOM - Día Mundial del Cáncer 2020*. <https://seom.org/dmccancer/cifras-del-cancer/>
- [8] Asociación Española Contra el Cáncer. (2019). *Observatorio AECC | Observatorio AECC*. <http://observatorio.aecc.es/#datos-informes%0Ahttp://observatorio.aecc.es/%0Ahttp://observatorio.aecc.es/#datos-informes%0Ahttp://observatorio.aecc.es/%0Ahttp://observatorio.aecc.es/es/node/21#datos-informes>
- [9] Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- [10] Holland, E. C. (2000). Glioblastoma multiforme: The terminator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(12), 6242–6244. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.12.6242>
- [11] Brussels, S., & Hemiplegia, A. (n.d.). *Orphanet: Glioblastoma* (Vol. 53, pp. 16–19).

- [12] Weller, M., Cloughesy, T., Perry, J. R., & Wick, W. (2013). Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma-are we there yet? *Neuro-Oncology*, *15*(1), 4–27. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos273>
- [13] Ramos Navas, A. (2019). Expresión de isoformas α de la Na,K-ATPasa en glioblastoma. *Trabajo Fin de Grado, Sección de Biología, Universidad de La Laguna*.
- [14] Rotoli, D., Morales, M., Maeso, M. D. C., Ávila, J., Pérez-Rodríguez, N. D., Mobasher, A., van Noorden, C. J. F., & Martín-Vasallo, P. (2019). IQGAP1, AmotL2, and FKBP51 Scaffoldins in the Glioblastoma Microenvironment. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *67*(7), 481–494. <https://doi.org/10.1369/0022155419833334>
- [15] Cejas Jiménez, M. M. (2016). Expresión de isoformas de la Na,K-ATPasa en glioblastoma multiforme. *Trabajo Fin de Grado, Sección de Biología, Universidad de La Laguna*.
- [16] Rotoli, D., Cejas, M. M., Maeso, M. del C., Pérez-Rodríguez, N. D., Morales, M., Ávila, J., Mobasher, A., & Martín-Vasallo, P. (2017). The Na, K-ATPase β -subunit isoforms expression in glioblastoma multiforme: Moonlighting roles. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(11). <https://doi.org/10.3390/ijms18112369>