

Caracterización celular y estudio de la expresión de FKBP51 en cultivos primarios de glioblastoma

Elena Sánchez Pérez

Tutores: Dr. Pablo Martín Vasallo y Dr. Julio Plata Bello

Grupo de Investigación: Biología del Desarrollo

Trabajo Final de Máster - Máster en Biomedicina 2021-2022

El Dr. Pablo Martín Vasallo, coordinador del Grupo de Investigación “Biología del Desarrollo” y el Dr. Julio Plata Bello, adscritos a la Titulación Máster en Biomedicina por la ULL

CERTIFICAN

- Que el Trabajo Fin de Máster (TFM) titulado “*Caracterización celular y estudio de la expresión de FKBP51 en cultivos primarios de glioblastoma*” ha sido realizado bajo nuestra supervisión por D^a Elena Sánchez Pérez, matriculada en el Máster en Biomedicina, durante el curso académico 2021-2022.
- Que una vez revisada la memoria final del TFM, damos nuestro consentimiento para ser presentado a la evaluación (lectura y defensa) por el Tribunal designado por la Comisión Académica de la Titulación.
- Que se ha indicado expresamente, a través del mecanismo de entrega de la memoria TFM por sede electrónica ULL, el deseo de hacer público o no los resultados del TFM.

Para que conste, se firma el presente certificado en La Laguna a 23 de junio de 2022

Dr. Pablo Martín Vasallo

Dr. Julio Plata Bello



**PLATA BELLO
JULIO MANUEL
- 78564471J**

Firmado digitalmente por PLATA BELLO JULIO MANUEL - 78564471J
Nombre de reconocimiento (DN):
c=ES,
serialNumber=IDCES-78564471J,
givenName=JULIO MANUEL,
sn=PLATA BELLO, cn=PLATA BELLO JULIO MANUEL - 78564471J
Fecha: 2022.06.26 17:33:57 +01'00'

Escuela de Doctorado y Estudios de Posgrado. Edificio Central. Campus Central. 38071 La Laguna.
C/ Delgado Barreto S/N. Tfno. (00 34) 922 31 9000
<http://www.escuelas.ull.es/view/centros/escueladoctorado/Inicio>: master@ull.es

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 4593179 Código de verificación: pAE0MCYh

Firmado por: Pablo Martín Vasallo
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 30/06/2022 11:38:20

ÍNDICE

1.	RESUMEN	1
2.	ABSTRACT.....	1
3.	INTRODUCCIÓN	3
4.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	7
5.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
	5.1. Pacientes.	8
	5.2. Obtención de muestras y procesamiento.....	8
	5.3. Cultivos primarios.....	9
	5.4. Cultivo en fresco para óptica de Nomarski.....	9
	5.5. Inmunocitoquímica.	10
	5.6. Microscopía.....	10
6.	RESULTADOS	11
7.	DISCUSIÓN	21
8.	CONCLUSIONES	27
9.	BIBLIOGRAFÍA	27

1. RESUMEN

El glioblastoma (GBM) es el tumor maligno cerebral más frecuente y agresivo en los adultos y el tratamiento estándar consiste en la resección quirúrgica seguida de radioterapia y quimioterapia. El GBM se caracteriza por la heterogeneidad celular, rápida proliferación, angiogénesis e invasión extensiva, características que le confieren una alta agresividad y resistencia a los tratamientos actuales. Las poblaciones celulares que forman parte del microambiente tumoral pueden tener diferentes características de malignidad. Este estudio pretende caracterizar algunas células en cultivos primarios de GBM mediante análisis inmunocitoquímico y la localización celular y subcelular de la inmunofilina FKBP51. En cultivos primarios de GBM se observó una variación de la expresión de los marcadores celulares GFAP, CD31, CD34 y MAP2 entre casos y pases. La actividad proliferativa marcada por Ki67 fue mayor en el segundo pase y FKBP51 se expresó en todos los tipos celulares con localización citoplasmática, nuclear, en torno a la membrana nuclear y como agregaciones en forma de cuerpos de inclusión.

Palabras clave: Glioblastoma, cultivo primario, heterogeneidad celular, inmunocitoquímica, FKBP51.

2. ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is the most common and aggressive malignant brain tumour in adults and standard treatment consists of surgical resection followed by radiotherapy and chemotherapy. GBM is characterised by cellular heterogeneity, rapid proliferation, angiogenesis and extensive invasion, characteristics that make it highly aggressive and resistant to current treatments. The cell populations that form part of the tumour microenvironment may have different characteristics of malignancy. This study aims to characterise cells in primary cultures of GBM by immunocytochemical analysis and the cellular and subcellular localisation of the immunophilin FKBP51. In primary cultures of GBM, variation in the expression of the cellular markers GFAP, CD31, CD34 and MAP2 was observed between cases and passages Ki67-labelled proliferative activity was highest in the second passage and

FKBP51 was expressed in all cell types and localized in cytoplasm, nucleus, around the nuclear membrane and as aggregations in the form of inclusion bodies.

Keywords: Glioblastoma, primary culture, cellular heterogeneity, immunocytochemistry, FKBP51.

3. INTRODUCCIÓN

El glioblastoma (GBM) o astrocitoma grado IV es el tumor maligno cerebral más frecuente y agresivo en los adultos, con una supervivencia media de 15 meses desde su diagnóstico (Kan et al., 2020). Es un tumor incurable y el tratamiento estándar actual consiste en la resección quirúrgica seguida de radioterapia y quimioterapia (da Hora et al., 2019). El GBM se caracteriza por la heterogeneidad celular, rápida proliferación, angiogénesis e invasión extensiva (Bronisz et al., 2014) y por ello, las células de glioblastoma invasivas escapan a la cirugía y a las terapias focales y, por lo tanto, representan un obstáculo importante para su tratamiento (Vollmann-Zwerenz et al., 2020).

Las poblaciones heterogéneas de células tumorales, las células madre de glioma (GSC, *glioma stem cells*) y otras células no tumorales presentes en el microambiente (Fig. 1) sirven como reguladores críticos de la progresión y recurrencia del tumor. Además, la infiltración de células inmunitarias en las regiones tumorales contribuye al establecimiento de un microambiente tumoral inmunosupresor para promover el desarrollo tumoral, la metástasis y la resistencia a las terapias contra el cáncer (Francis Curtin et al., 2018).

En el GBM, la población de células cancerosas está formada principalmente por células de astrocitoma y células madre de glioma, mientras que el microambiente tumoral está formado por astrocitos, células microgliales, pericitos, telocitos, células endoteliales y neuronas, y la comunicación entre estos tipos de células es fundamental en la biología tumoral (Rotoli et al., 2019). Existen diferentes marcadores para identificar estos tipos celulares presentes en el GBM, como la proteína *cluster of differentiation 31* (CD31) también conocida como *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1), un receptor de membrana altamente glicosilado expresado por células endoteliales, macrófagos derivados de monocitos y pericitos. Su localización en la membrana plasmática de la célula varía en función de los reordenamientos del citoesqueleto de actina y está impulsada por la formación de microdominios de membrana tras la estimulación celular (Caligiuri, 2020).

Las células endoteliales también expresan la proteína *cluster of differentiation 34* (CD34), una fosfoglucoproteína transmembrana que también se expresa en macrófagos y telocitos. Las propiedades de las células endoteliales CD34 a menudo están relacionadas con las células hematopoyéticas, ya que ambos tipos de células pueden aislarse de la sangre periférica utilizando CD34 como antígeno (Sidney et al., 2014). Los astrocitos y las células del astrocitoma forman la mayor parte de la población celular del GBM, y se pueden identificar por medio de la expresión de la *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) (Pérez Rodríguez, 2016). Múltiples estudios han caracterizado la expresión de GFAP en subtipos de glioma, lo que ha permitido establecer a GFAP como un biomarcador para astrocitoma. En el cerebro humano sano, GFAP se expresa principalmente en astrocitos maduros. Por lo tanto, se cree que una expresión alta de GFAP marca tumores menos malignos más diferenciados. Sin embargo, más recientemente se observó la expresión de GFAP en la glía radial del cerebro humano en desarrollo y en células madre neurales adultas del cerebro adulto, mostrando que GFAP también se expresa en células del Sistema Nervioso Central (SNC) no diferenciadas e inmaduras (van Bodegraven et al., 2019).

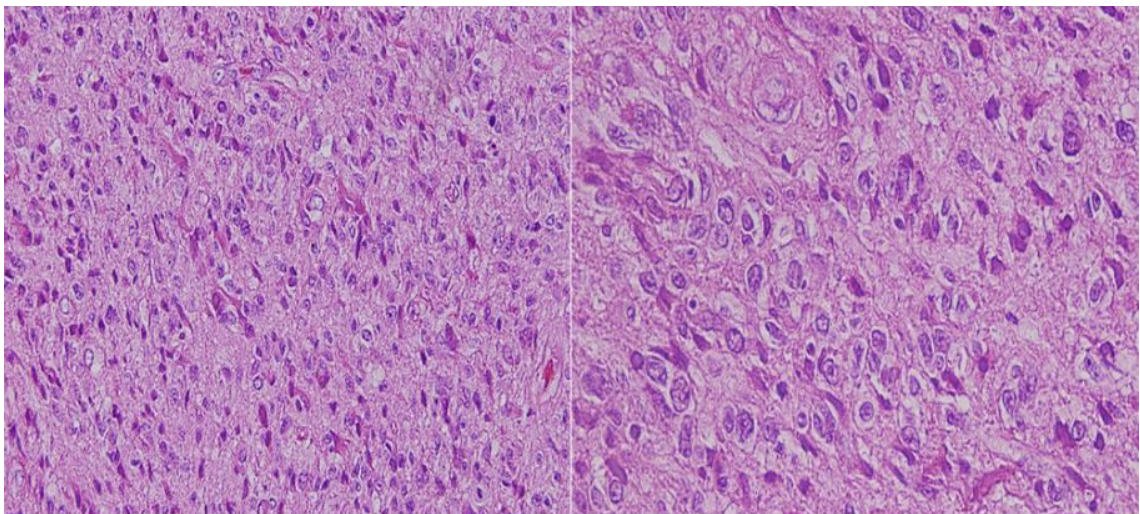


Figura 1. Histología característica del glioblastoma multiforme (Pérez Rodríguez, 2016).

En el microambiente tumoral también se han identificado neuronas, que expresan la proteína conocida como *neuronal nuclei* (NeuN) y la *microtubule-associated protein 2* (MAP2). NeuN se detecta exclusivamente en las neuronas posmitóticas y se distribuye en los núcleos de estas neuronas en casi todas las partes del sistema nervioso de los vertebrados. El nivel de expresión de NeuN se ha utilizado para evaluar directamente la muerte o pérdida neuronal, y la reaparición de células NeuN+

se ha convertido en un marcador confiable para cuantificar los efectos terapéuticos en estudios experimentales (Duan et al., 2016). MAP2 es una abundante proteína que participa en el desarrollo de los procesos neuronales y la plasticidad sináptica y se localiza principalmente en los cuerpos celulares y las dendritas de las neuronas (Dehmelt & Halpain, 2004). La expresión ectópica de MAP2 en células no neuronales, especialmente en células cancerosas que se dividen rápidamente, puede provocar la interrupción de la inestabilidad dinámica de los microtúbulos, defectos del huso mitótico, detención del ciclo celular y apoptosis (Maddodi et al., 2010).

La actividad proliferativa de las células tumorales representa un importante marcador pronóstico en el diagnóstico del cáncer y uno de los métodos para evaluarla es la detección de antígenos específicos del ciclo celular. Por ejemplo, Ki67, *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) y las proteínas *minichromosome maintenance* (MCM) son marcadores estándar de proliferación que se usan comúnmente para evaluar la fracción de crecimiento de una población celular (Juríková et al., 2016). Ki67 es un indicador de proliferación frecuentemente usado en diferentes tipos de cáncer, sobre todo en el cáncer de mama y al expresarse de manera abundante en células malignas se ha convertido en un objetivo prometedor para la terapia contra el cáncer. Se encuentra principalmente en la corteza nucleolar durante la interfase y se recluta en los cromosomas condensados durante la mitosis (Wang et al., 2018).

Las proteínas PCNA y MCM se han identificado como participantes importantes de la replicación del DNA. PCNA es una proteína esencial que participa en una variedad de procesos del metabolismo del DNA, incluida la replicación y reparación del DNA, la organización y transcripción de la cromatina y la cohesión de las cromátidas hermanas. Además, PCNA está implicado en la supervivencia celular y posiblemente en las vías del metabolismo energético, como la glucólisis. Las proteínas responsables del mantenimiento de los minicromos se denominaron proteínas MCM. Estas proteínas se consideran el factor clave para el inicio de la replicación, son necesarios para la elongación de la replicación y están implicadas en la cohesión, condensación, transcripción y recombinación de moléculas de DNA (Juríková et al., 2016).

FKBP51 (FK506 *binding protein* 51), codificada por el gen FKBP5, es una inmunofilina multifuncional que pertenece a la superfamilia de proteínas (Rotoli et

al., 2019) cuyos miembros son dianas para fármacos inmunosupresores, como la rapamicina, ciclosporina y también la propia FK506 (tacrolimus o fujimicina). Las inmunofilinas son una familia de proteínas que presentan un dominio FKBP con actividad peptidilprolil isomerasa (PPIasa) (Pérez Rodríguez, 2016). FKBP51 puede actuar como cochaperona en la maquinaria de la proteína de choque térmico 90 (Hsp90, *heat shock protein 90*), uniéndose al receptor de glucocorticoides y regulando su función (Hähle et al., 2019). Entre estas inmunofilinas que se unen a Hsp90, hay dos altamente homólogas, FKBP51 y FKBP52 (proteínas de unión a FK506 de 51 kDa y 52 kDa, respectivamente) (Zgajnar et al., 2019), que a menudo actúan en conjunto de manera antagónica (Hähle et al., 2019) y aunque comparten características (Pérez Rodríguez, 2016) como la acción del receptor de esteroides, la actividad transcripcional, la conformación de proteínas, el tráfico de proteínas, la diferenciación celular, la apoptosis, la progresión del cáncer, la actividad de la telomerasa y la arquitectura del citoesqueleto (Zgajnar et al., 2019), también tiene características únicas como su papel en la regulación de múltiples vías de señalización, en la génesis tumoral y la quimio-resistencia (Pérez Rodríguez, 2016). FKBP51 ejerce funciones en las respuestas a la terapia antineoplásica y en la tumorigénesis a través de sus efectos sobre la maduración del receptor de esteroides y a través de su regulación de varias vías de señalización, como NF- κ B (*nuclear factor kappa B*), PKA (*protein kinase A*), TGF β (*transforming growth factor β*) y Akt (Rotoli et al., 2019).

En condiciones basales, FKBP51 muestra una expresión pronunciada en adipocitos y células T (Hähle et al., 2019). En humanos, se expresa en múltiples tejidos, incluyendo riñón, músculo esquelético, hígado, placenta, el corazón y sangre periférica y su nivel de expresión es mucho menor en páncreas, bazo, y estómago y más bajo en cerebro, colon o pulmón (Pérez Rodríguez, 2016). En el cerebro de los roedores, la expresión basal de FKBP51 es mayor en el hipocampo, pero se ha observado una fuerte inducción de FKBP51 en la amígdala y en el núcleo paraventricular del hipotálamo como respuesta al estrés o de glucocorticoides (Hähle et al., 2019). Además de un papel en la génesis tumoral, numerosos estudios han indicado también que puede tener un papel en las enfermedades psiquiátricas tales como depresión y en neurología, unida a Hsp90 está asociada en la fisiopatología de

tau asociada a microtúbulos que se acumula en un grupo de trastornos neurodegenerativos tales como la enfermedad de Alzheimer (Pérez Rodríguez, 2016).

Se han evidenciado niveles de expresión alterados de FKBP51 en varios tipos de cáncer, incluido el GBM. Prácticamente todos los tipos de células tumorales de glioblastoma humano expresan FKBP51 de una manera celular y subcelular diferente (Rotoli et al., 2022). La isoforma FKBP51s (*splicing isoform of FKBP51*) se encuentra abundantemente expresada en GBM, donde actúa como cochaperona de la proteína PD-L1 (*programmed cell death ligand-1*) (D'arrigo et al., 2017), una proteína que anula la actividad de los linfocitos T citotóxicos, facilitando la evasión del sistema inmune, la supervivencia celular y la resistencia al tratamiento (D'Arrigo et al., 2019).

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Estudios previos han demostrado la gran heterogeneidad celular que presenta el GBM y que estas poblaciones celulares presentes en el microambiente tumoral con diferentes perfiles de expresión probablemente tienen características de malignidad distintas. La identificación de características moleculares adicionales de estas subpoblaciones celulares ayudaría al diagnóstico y podría servir como regulador de la progresión y resistencia a los tratamientos existentes actualmente, también sería útil en el establecimiento del pronóstico.

FKBP51 es una proteína que participa en las vías de proliferación y crecimiento tumoral, y, por tanto, juega un papel importante en la biología del GBM y podría utilizarse como marcador de subpoblaciones celulares.

Los objetivos de este trabajo son:

1. Establecer cultivos primarios de GBM a partir de muestras de pacientes obtenidas tras cirugía en el Hospital Universitario de Canarias (HUC).
2. Caracterizar celularmente los cultivos primarios de GBM mediante la identificación inmunocitoquímica de cuatro marcadores celulares: GFAP, CD31, CD34 y MAP2, estudiando la intensidad de expresión y la localización celular y subcelular de estas proteínas.

3. Evaluar la capacidad proliferativa de los cultivos primarios de GBM estudiando la expresión de Ki67 mediante identificación inmunocitoquímica y seguir la evolución de la actividad proliferativa.
4. Estudiar la localización celular y subcelular de la proteína FKBP51 en células de GBM humano en cultivo primario con el fin de establecer una asociación entre estos patrones y la biología del cultivo.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Pacientes.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de La Laguna (ULL) y por el Comité de Ética del Hospital Universitario de Canarias (HUC). Todos los pacientes o sus responsables firmaron un consentimiento informado para el diagnóstico y la investigación en muestra de tejido antes de la inscripción en el estudio.

Se incluyeron 3 pacientes diagnosticados con GBM (2 hombres y una mujer) y 1 paciente masculino con diagnóstico de linfoma, todos mayores de 60 años. El primer paciente estaba diagnosticado con GBM, con hemiparesia en clínica inicial y una lesión en la zona parietal. El segundo paciente analizado fue una mujer con deterioro cognitivo y una lesión en la zona frontal. El tercer paciente también estaba diagnosticado con GBM, presentaba inestabilidad y una lesión en la zona frontal y el último paciente analizado estaba diagnosticado de linfoma.

5.2. Obtención de muestras y procesamiento.

Se recolectaron muestras de GBM de pacientes que se sometieron a la cirugía inicial en el HUC y antes de que recibieran radioterapia y/o quimioterapia. Tras la cirugía se recogió la muestra en suero fisiológico y se llevó al Laboratorio de Biología del Desarrollo (Facultad de Biología, ULL) para su procesamiento.

En el laboratorio se llevó a cabo la disgregación mecánica de la muestra en condiciones de asepsia. La muestra se pasó a una placa de 60mm y se disgregó con tijeras en fragmentos de tamaño igual o menor a 1mm. Una vez disgregado todo el tejido, se añadió *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM/F12, 112220-032,

Gibco TM Cell Culture-Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) con 10% de suero fetal bovino (FBS) y una mezcla de tres antibióticos: penicilina (59 mg/L; Sigma-Aldrich, USA), streptomcina (100 mg/L; Sigma-Aldrich, USA) y anfotericina (25 mg/L; Sigma-Aldrich, USA) y se centrifugó durante 10 minutos a 1500rpm. La muestra se resuspendió con DMEM/F12 y se sembró un flask de 75cm² y se incubó en una incubadora con ambiente humidificado a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂ para su crecimiento.

5.3. Cultivos primarios.

El crecimiento celular se observó en dos intervalos de tiempo diferentes, t=7 y t=20 días desde el día que se puso en cultivo (t=0). Los cultivos se mantuvieron en incubación durante 7 días con las mismas condiciones descritas anteriormente. En el séptimo día se levantaron las células de la superficie del flask mediante tratamiento enzimático con Tripsina/EDTA 1x (MS00S6200A, Biowest, Nuaille, Francia) e incubación durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, se añadió un volumen de DMEM/F12 para detener la actividad enzimática y se centrifugó durante 10 minutos a 1500rpm para lavar. El pellet celular fue resuspendido en 2mL de DMEM/F12 y las células se contaron con un contador automático (*T20 automated cell counter*, Bio Rad) usando una mezcla de 10µl de suspensión celular y 10µl de Trypan Blue (1450021, Bio-Rad) en una *dual chamber slide* (1450011, Bio-Rad). Se sembraron 5x10⁴ células en una placa de 4 pocillos (1,9cm²) con un cubreobjetos recubierto con poli-L-lisina y se incubaron durante 24h para permitir su adhesión a la superficie. El contenido restante se puso en una placa de 60mm con DMEM/F12 y se dejó en el incubador para que las células siguieran creciendo. Después de 20 días desde t=0, se realizó el mismo procedimiento con esta placa en cultivo, lo que correspondería con el segundo pase.

5.4. Cultivo en fresco para óptica de Nomarski.

Para observar las células en fresco y ver la morfología celular se utilizó la muestra del paciente 1. Se descongeló la muestra y se añadió DMEM. Posteriormente se añadió el contenido anterior en una placa de cultivo de 4 pocillos con una de superficie de cultivo de 1.9 cm²/pocillo y con cristales estériles sin recubrir. Se observó el

crecimiento durante 4 días consecutivos (t=1,2,3 y 4) desde t=0 días para ver cómo evolucionaba el cultivo en número celular y ambiente.

5.5. Inmunocitoquímica.

Después de 24 horas, las células se fijaron con metanol 100% y se llevó a cabo el estudio inmunocitoquímico. Para fijarlas, en primer lugar, se realizaron dos lavados con PBS estéril y se añadió metanol 100% frío a cada pocillo. Se llevaron las placas a -20°C durante 6 minutos y pasado ese tiempo, se realizaron otros dos lavados con PBS.

Para la inmunocitoquímica, en primer lugar, se realizó el paso de permeabilización y bloqueo durante 30 minutos con Solución de Bloqueo Universal, SBU (1% de albúmina de suero bovino (BSA); 0,1% gelatina; 0,5% Tritón X-100; 0,05% azida; PBS 1x; pH: 7,2-7,4). Luego se incubó la muestra durante una hora con los anticuerpos primarios (véase la tabla 1) diluidos en SBU. Para eliminar los anticuerpos primarios no unidos se realizaron tres lavados durante 10 minutos cada uno con solución salina tamponada con Tris, TBS 1x-Tween (pH: 8,4; 0,5% Tween-20; TBS 10x: 0,5M Tris; 9% NaCl). Posteriormente se incubó la muestra con el anticuerpo secundario (Tabla 1) diluido en TBS 1x-Tween durante una hora en oscuridad a temperatura ambiente.

5.6. Microscopía

El cultivo en fresco se observó con el microscopio óptico Olympus BX50 con óptica de Nomarski. Los casos 1 y 4 fueron analizados utilizando el microscopio óptico Olympus BX50 con fluorescencia y los otros dos casos con el microscopio confocal Leica TCS SP8.

Anticuerpo	Diana	Tipo	Clase	Huésped	Dilución	Fuente
Anti-CD31	CD31	P	MC	MS	1:250	MA1-219, Termo Fischer
Anti-CD34	CD34	P	MC	MS	1:250	sc-4799, Santa Cruz Biotechnology
Anti-GFAP	GFAP	P	MC	MS	1:200	G3893, Sigma-Aldrich
Anti-MAP2	MAP2	P	MC	MS	1:750	MAB378, Chemicon International
Anti-FKBP51	FKBP51	P	PC	RB	1:100	ab46002, Abcam
Anti-Ki67	Ki67	P	MC	MS	Listo para usar	PA0230, BOND
FITC-conj. Anti-mouse	Ratón IgG	S	PC	GT	1:125	F0257, Sigma
DyLight®650conj. Anti-mouse	Ratón IgG	S	PC	GT	1:100	ab97018, Abcam
FITC-conj. Anti-rabbit	Conejo IgG	S	PC	GT	1:200	F9887, Sigma

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en el estudio. Tipo: P (primario), S (secundario). Clase: PC (policlonal), MC (monoclonal). Huésped: MS (ratón), RB (conejo), GT (cabra).

6. RESULTADOS

Para observar la evolución del cultivo de células de GBM se obtuvieron imágenes del cultivo en fresco del primer paciente durante cuatro días consecutivos. La figura 2 muestra imágenes obtenidas con óptica de Nomarski del cultivo en fresco. Se observaron células individuales (Fig. 2A-D) con diferentes morfologías.

En el panel A y D de la figura 2 se observan células con una morfología fusiforme y con un volumen nuclear grande en relación con el escaso citoplasma. También hay células individuales con morfología irregular (Fig. 2B), o con forma triangular y con ramificaciones (Fig. 2C), además las células presentes en estos paneles también muestran un núcleo grande con respecto al citoplasma. Se observaron algunas agrupaciones celulares en los diferentes días (Fig. 2E-H) y en estas agrupaciones se reflejaron otras morfologías celulares presentes en el GBM como las células con forma de “huevo frito” (Fig. 2E y H) o las morfologías fusiformes anteriores (Fig. 2F y H) además de otras células con forma irregular (Fig. 2E y H).

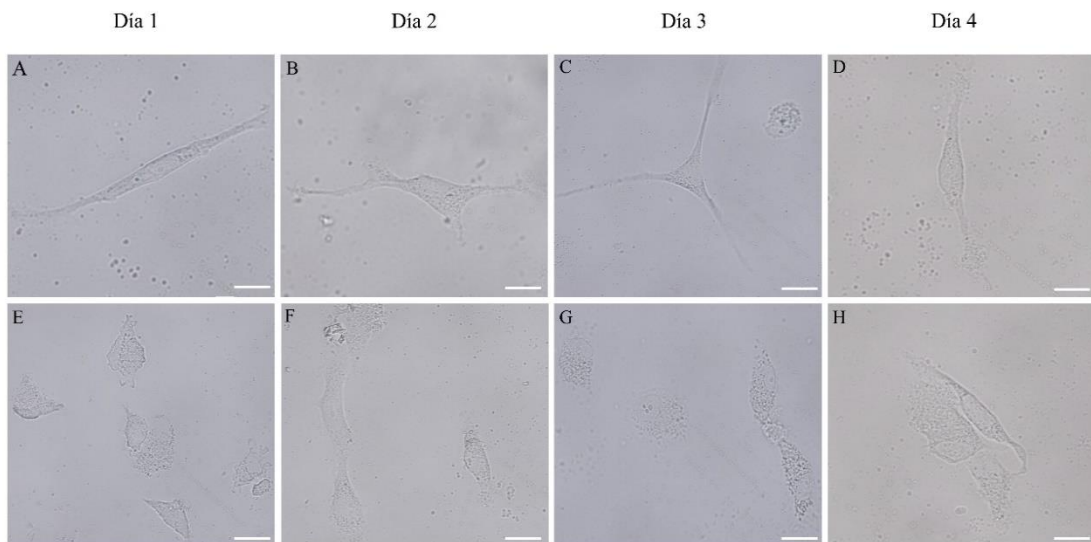


Figura 2. Imágenes del cultivo en fresco del caso 1 obtenidas con óptica de Nomarski durante cuatro días consecutivos de observación. A-D) Células individuales. E-H) Agrupaciones celulares. Imágenes tomadas a 40x. Barra = 20 μ m.

Se establecieron cultivos primarios de GBM y de linfoma para observar su crecimiento y evolución en dos periodos de tiempo, 7 días (primer pase) y 20 días (segundo pase) y para evaluar la intensidad (véase la tabla 2) y localización de la expresión de los marcadores celulares GFAP, CD31, CD34, y MAP2, del indicador de proliferación Ki67 y de la proteína FKBP51. Cada figura que aparece a continuación (Fig. 3-6) corresponde con un caso y tanto para el estudio de la expresión y localización de FKBP51 como para el resto de las proteínas, el número de células se estableció en todos los casos mediante marcaje con DAPI.

El primer caso analizado mostró diferencias con respecto a los otros dos casos de GBM. En los dos pases se observaron células GFAP+. En el primero presentaron una tinción celular homogénea citoplasmática y nuclear, con una morfología muy irregular y ramificada (Fig. 3A) y con núcleos de gran tamaño (Fig. 3E). En el segundo pase la intensidad de la tinción fue mucho más fuerte y las células tenían un tamaño mayor. La expresión fue principalmente citoplasmática y se observaron núcleos grandes e irregulares con respecto al citoplasma.

CD31 mantuvo una intensidad de expresión baja al igual que en los demás casos (tabla 2), pero en este se observó tinción específica con inclusiones citoplasmáticas (Fig. 3B). En el segundo pase CD31 aumentó su expresión ligeramente (tabla 2), principalmente en el citoplasma y el núcleo, con células de un tamaño mayor y con morfologías más irregulares. En los dos pases los núcleos observados tenían un gran tamaño respecto al citoplasma celular.

Se detectó expresión de CD34, citoplasmática, nuclear y formando inclusiones más intensas (Fig. 3C). Las células marcadas tienen morfología tipo “huevo frito”, alargadas y ramificadas, todas con núcleos de gran tamaño (Fig. 3G). En el segundo pase disminuyó la expresión de esta proteína, como se puede observar en la tabla 2, y se concentra principalmente en el núcleo, marcando células con morfología similar a las del primer pase.

En el caso 1 se detectó expresión de MAP2, que disminuye en el segundo pase (tabla 2), en citoplasma, núcleo y con una intensidad mayor formando inclusiones citoplasmáticas. Las células presentaron una morfología principalmente fusiforme y con numerosas ramificaciones (Fig. 3D). Los núcleos se observaron con un gran tamaño con respecto al escaso citoplasma (Fig. 3H). En el segundo pase las células presentaron un mayor tamaño, con una distribución de la expresión citoplasmática y nuclear, con la misma morfología anterior.

El nivel de proliferación se mantuvo moderado (tabla 2), con marcaje nuclear y con inclusiones citoplasmática en el primer pase (Fig. 3I) y nuclear en el segundo pase (Fig. 3J). La fluorescencia específica para FKBP51 mostró una fuerte intensidad que se mantuvo en el segundo pase (véase tabla 2), con expresión citoplasmática y nuclear (Fig. 3K). Las células FKBP51+ también mostraron morfologías similares a las

presentes en otros marcadores, fusiformes y ramificadas, formando redes y con núcleos prominentes (Fig.3O).

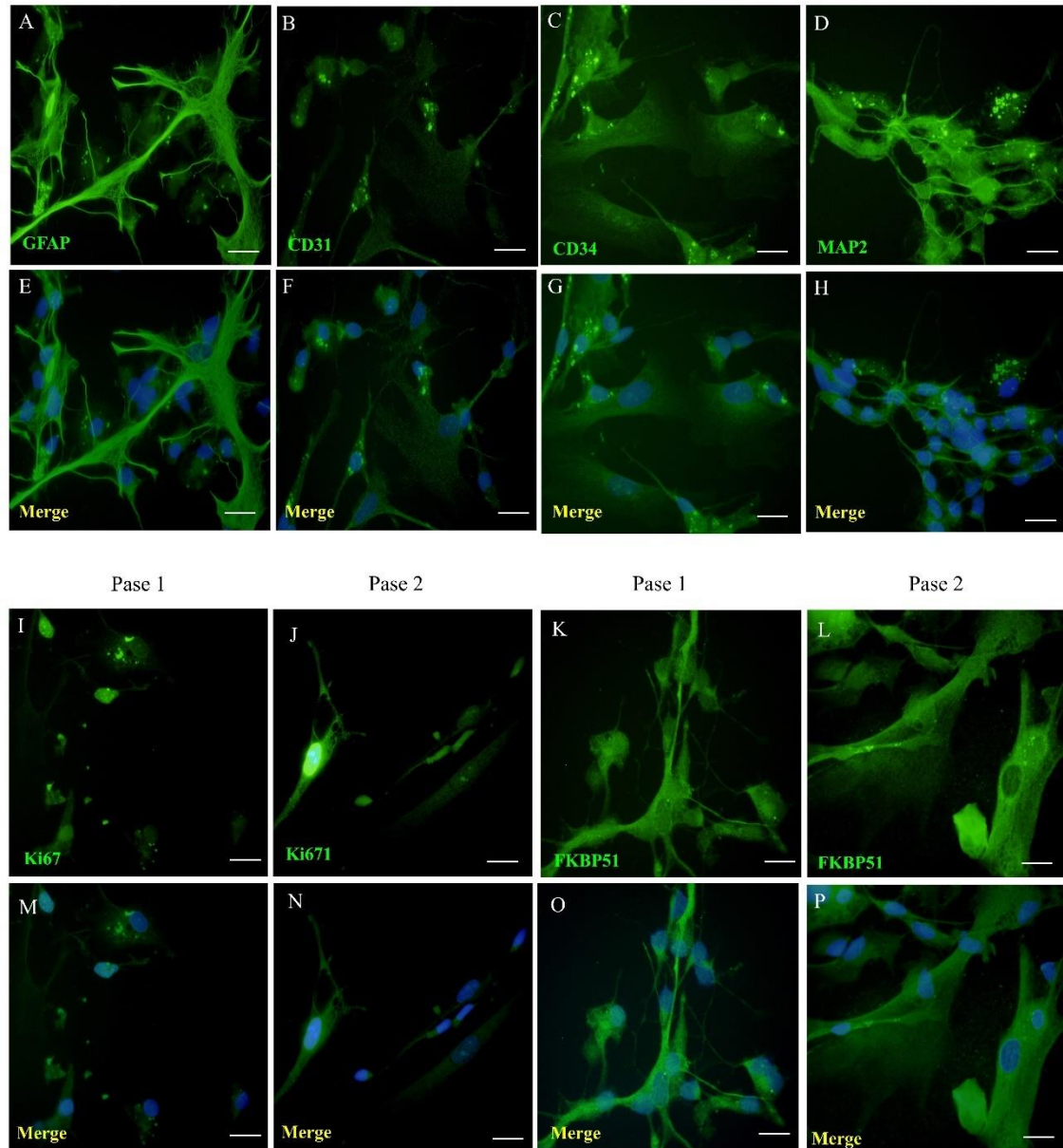


Figura 3. Imágenes de microscopía de fluorescencia de cultivo primario de GBM del caso 1 con marcaje inmunofluorescente. A-D) Expresión de GFAP, CD31, CD34 y MAP2 respectivamente, todas en verde. E-H) Merge con DAPI. I y J) Expresión de Ki67 en el primer y segundo pase, respectivamente. M y N) Merge de Ki67 con DAPI. K y L) Expresión de FKBP51 en el primer y segundo pase, respectivamente. O y P) Merge de FKBP51 con DAPI. Imágenes tomadas a 40x. Barra = 20 μ m.

En el caso 2 se observó una intensa expresión citoplasmática de GFAP en células grandes y con morfología estrellada e irregular (Fig. 4A). En el segundo pase la intensidad de la expresión de GFAP disminuyó (tabla 2).

CD31 mostró un marcaje débil (Fig. 4B), localizado principalmente en el citoplasma. Las células CD31+ presentaron una morfología estrellada y con células en mitosis (Fig. 4F). En el segundo pase aumentó la expresión de CD31 (tabla 2) y el marcaje se concentró principalmente en el citoplasma. Las células marcadas presentaron principalmente una morfología de “huevo frito”, de mayor tamaño, con un núcleo grande con respecto al citoplasma y también algunas en mitosis. No se detectó expresión de CD34 (Fig. 4C y G) y MAP2 (Fig. 4D y H) en los dos pases de este caso. La tinción específica para Ki67 mostró un aumento considerable de un pase a otro (tabla 2). En el primer pase la proliferación detectada fue menor (Fig. 4I), mientras que en el segundo pase presentaron una mayor intensidad para Ki67 (Fig. 4J).

Mayoritariamente, las células presentaron una morfología en “huevo frito” con inmunofluorescencia específica para FKBP51 en el citoplasma, aunque algunas también tenían expresión más baja en el núcleo (Fig. 4K y O). En el segundo pase no se detectó expresión en el núcleo (Fig. 4L).

En el caso 3 las proteínas estudiadas siguieron el mismo patrón de expresión que el caso anterior en el primer pase. En el primer pase se detectaron células GFAP+ con una expresión citoplasmática generalmente homogénea. Se observaron con una morfología diversa, estrellada con ramificaciones, triangular y alargada (Fig. 5A y E). En el segundo pase no se detectó GFAP.

CD31 mostró una baja expresión en membrana plasmática y citoplasma, con células de una morfología alargada y con núcleos grandes con respecto al citoplasma en el primer pase (Fig. 5B y F). En el segundo pase la expresión se mantuvo a la misma intensidad (tabla 2), pero con una concentración mayor en el citoplasma. Como en el caso anterior, no se detectó expresión de CD34 (Fig. 5C) ni de MAP2 (Fig. 5D) en ninguno de los dos pases.

En este caso se observó un bajo grado de proliferación en el primer pase (Fig. 5I) y en el segundo no se detectó Ki67. En el primer pase FKBP51 mostró una tinción específica fuerte y citoplasmática, con una distribución de la intensidad heterogénea en toda la célula (Fig. 5K). En el segundo pase se mantuvo la expresión de FKBP51 (tabla 2), principalmente con una expresión nuclear, alrededor del núcleo y en algunas células formando inclusiones citoplasmáticas (Fig. 5L).

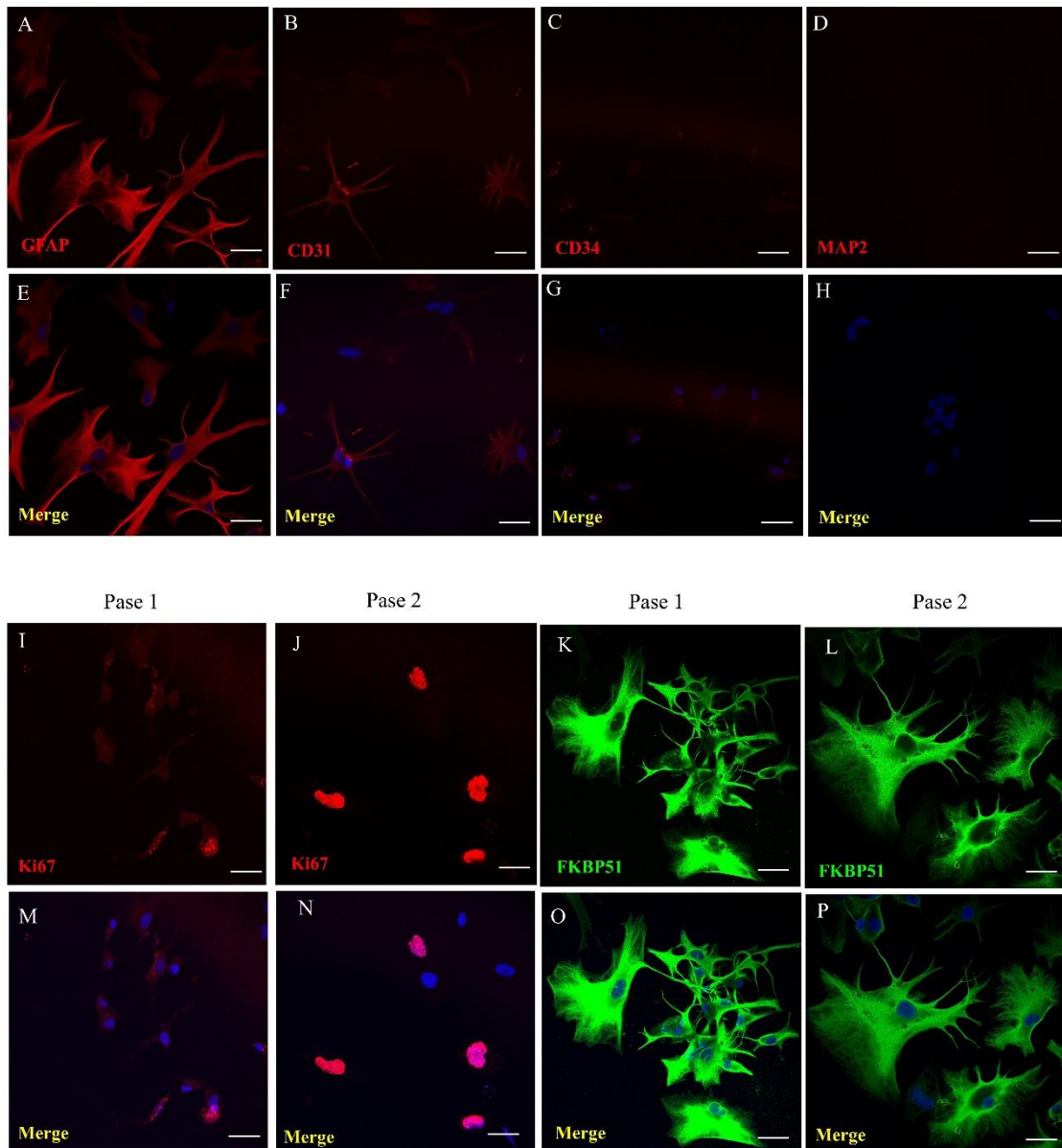


Figura 4. Imágenes confocales de cultivo primario de GBM del caso 2 con marcaje inmunofluorescente. A-D) Expresión de GFAP, CD31, CD34 y MAP2 respectivamente, todas en rojo. E-H) Merge con DAPI. I y J) Expresión de Ki67 en rojo en el primer y segundo pase, respectivamente. M y N) Merge de Ki67 con DAPI. K y L) Expresión de FKBP51 en verde en el primer y segundo pase, respectivamente. O y P) Merge de FKBP51 con DAPI. Imágenes tomadas a 40x. Barra = 20µm

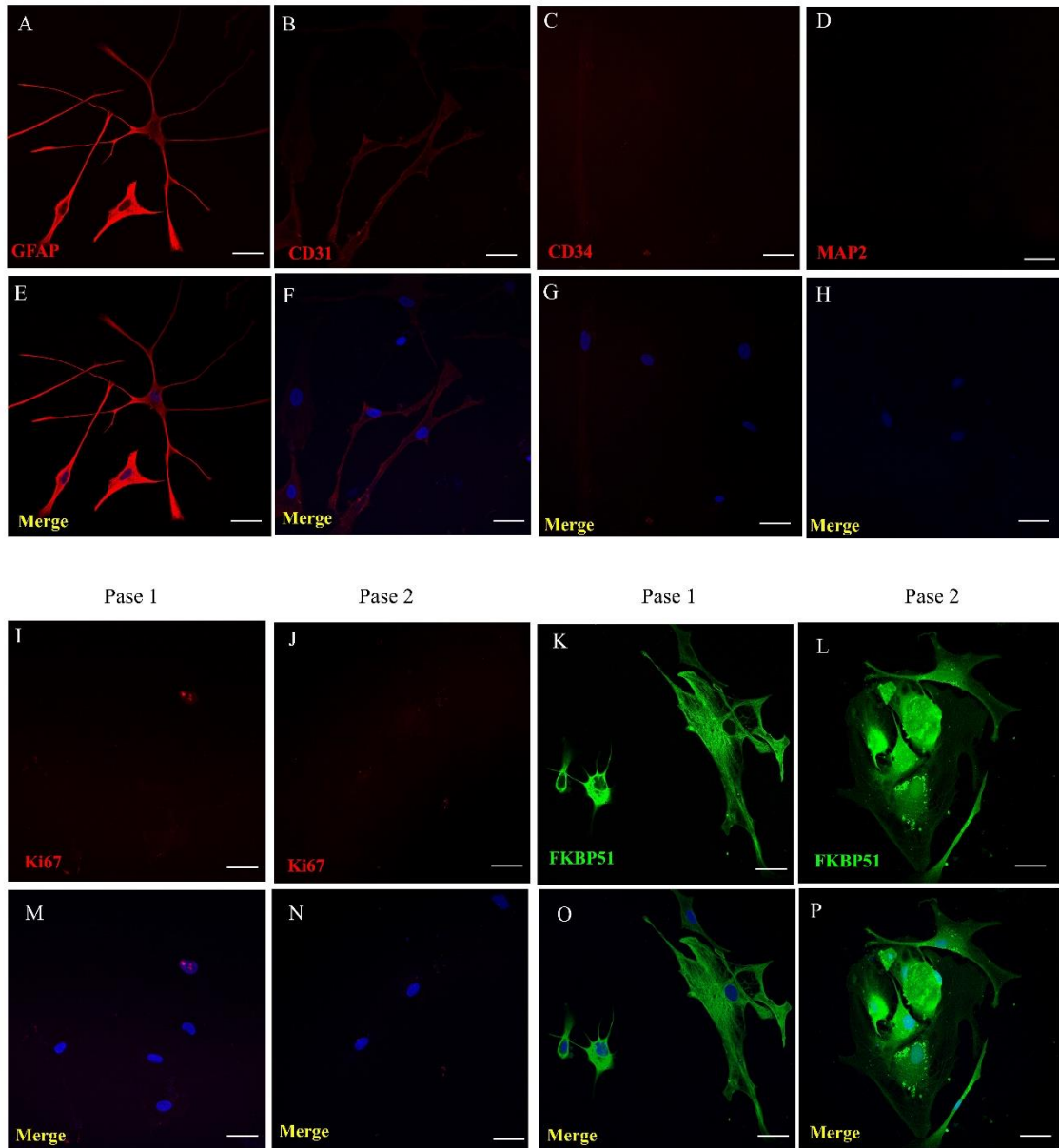


Figura 5. Imágenes confocales de cultivo primario de GBM del caso 3 con marcaje inmunofluorescente. A-D) Expresión de GFAP, CD31, CD34 y MAP2 respectivamente, todas en rojo. E-H) Merge con DAPI. I y J) Expresión de Ki67 en rojo en el primer pase y en el segundo pase, respectivamente. M y N) Merge de Ki67 con DAPI. K y L) Expresión de FKBP51 en verde en el primer y segundo pase, respectivamente. O y P) Merge de FKBP51 con DAPI. Imágenes tomadas a 40x. Barra = 20 μ m.

En el último caso analizado, un linfoma que antes de la cirugía aparentó ser un glioblastoma, se observó inmunofluorescencia específica para GFAP en el primer pase, pero en el segundo pase no se detectó expresión (tabla 2). En el primer pase mostró una expresión celular generalizada en células con morfología irregular en “huevo frito” (Fig. 6A y E).

Se observó una baja expresión de CD31 en el primer pase (tabla 2), citoplasmática y nuclear. Las células marcadas mostraron una morfología tipo “huevo frito” y gran tamaño (Fig. 6B). En el segundo pase aumentó la expresión de esta proteína, principalmente en el núcleo y en la envoltura nuclear, las células eran de mayor tamaño y adquieren una morfología más irregular. Se detectó una expresión moderada de CD34 en el primer pase, que disminuyó en el segundo. En este primer pase se observó intensidad de la tinción en el citoplasma y más concentrada en el núcleo (Fig. 6C). Las células marcadas presentaron una morfología en “huevo frito” y estrellada y los núcleos eran prominentes con respecto al citoplasma (Fig. 6G). En el segundo pase la expresión se concentró hacia la zona nuclear en células con morfología de “huevo frito” y con una intensidad mayor en inclusiones citoplasmáticas.

MAP2 también se expresó en este caso, disminuyendo su expresión en el segundo pase. Se detectó expresión de MAP2 principalmente por medio de numerosas inclusiones citoplasmáticas y nucleares (Fig. 6D) en células con morfología redondeada y fusiformes (Fig. 6H). En el segundo pase también se observó una expresión principal en inclusiones.

En este último caso no se pudo realizar la valoración del nivel de proliferación en el primer pase por contaminación del pocillo, pero en el segundo pase mostró una alta proliferación (Fig. 6I y L). También se observó inmunofluorescencia específica para FKBP51, pero de intensidad moderada. Su marcaje fue homogéneo, tanto en el citoplasma como en el núcleo (Fig. 6J). En el segundo pase se mantuvo la expresión, pero en este caso las células marcadas presentaron otra morfología, en este caso de “huevo frito” y la expresión se concentró principalmente en la zona nuclear en la mayoría de las células y con mayor intensidad formando inclusiones (Fig. 6K).

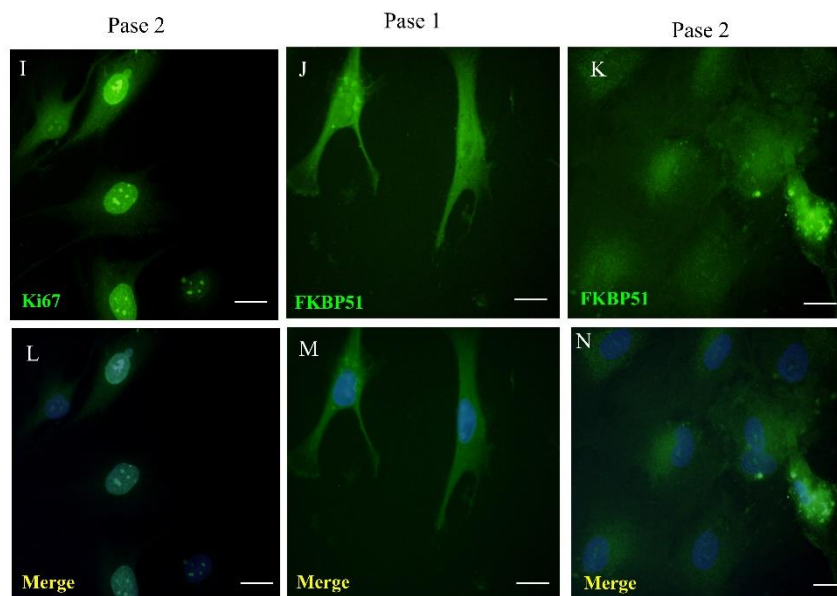
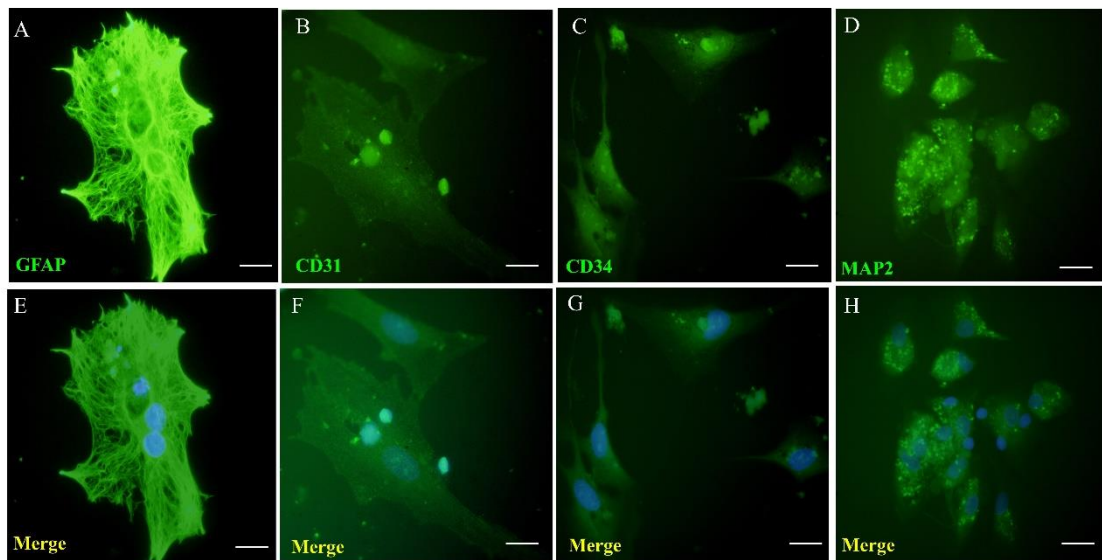


Figura 6. Imágenes con microscopía de fluorescencia de cultivo primario de linfoma del caso 4 con marcaje inmunofluorescente. A-D) Expresión de GFAP, CD31, CD34 y MAP2 respectivamente, todas en verde. E-H) Merge con DAPI. I) Expresión de Ki 67 en verde en el segundo pase. L) Merge de Ki67 con DAPI. J y K) Expresión de FKBP51 en verde en el primer y segundo pase, respectivamente. M y N) Merge de FKBP51 con DAPI. Imágenes tomadas a 40x. Barra = 20 μ m.

La expresión de GFAP, CD31, CD34, MAP2, Ki67 y FKBP51 se cuantificó de forma observacional estableciendo cuatro niveles de intensidad. Las intensidades de las tinciones se calificaron como ausente (-), cuando no se detectó expresión de las proteínas, débil (+), si la intensidad de la tinción específica para esa proteína se

observaba, pero de manera tenue y en pocas células, moderada (++) cuando se detectó expresión más o menos homogénea o fuerte (+++) cuando la tinción era muy intensa con respecto a las demás imágenes y homogénea en la distribución y número celular. Estos puntos de corte se establecieron tras un estudio inicial de todo el material (Tabla 2).

GFAP mostró una fuerte expresión en todos los casos de GBM en el primer pase y en el caso de linfoma también se detectó una fuerte expresión en el primer. En el segundo pase GFAP mostró una mayor variación, disminuyendo su expresión según el caso. En el primer caso (GBM) se mantuvo una fuerte expresión en los dos pases. En el segundo caso (GBM) disminuyó a moderada en el segundo pase y en el tercer caso y en el caso con linfoma se observó lo mismo, no se detectó expresión en el segundo pase. CD31 se expresó en todos los casos y pases, aumentando su expresión de baja a moderada en el segundo pase en dos casos de GBM (caso 1 y 2) y ocurrió lo mismo en el caso con linfoma (caso 4). Sin embargo, en el caso 3 (GBM) se mantuvo una expresión baja en los dos pases. Se detectó la misma expresión de CD34 en el caso 1 (GBM) y en el caso 4 (linfoma) en los dos pases, disminuyendo su expresión de moderada a baja de un pase a otro en los dos casos. En los otros dos casos con GBM (caso 2 y 3) no se detectó señal de CD34 en ninguno de los pases. Se detectó señal de MAP2 en el caso 1 (GBM) y en el caso 4 (linfoma). En estos dos casos la expresión de MAP2 disminuyó en el segundo pase, pero se detectaron intensidades de expresión diferentes. En el caso 1 (GBM) la expresión disminuyó de fuerte a moderada, mientras que en el caso 4 (linfoma) la expresión fue menor, variando de moderada a baja de un pase a otro. Por otra parte, no se detectó señal de MAP2 en los casos 2 (GBM) y 3 (GBM) en ninguno de los dos pases. El nivel de proliferación, detectado con la expresión de Ki67, también reflejó una variabilidad entre pases en la señal de la expresión detectada entre ellos. En el primer caso se mantuvo un nivel de proliferación moderado en los dos pases. Sin embargo, en los otros dos casos de GBM (caso 2 y 3) se detectó un nivel bajo de proliferación en el primer pase y variación de la intensidad de la señal en el segundo pase. En el segundo caso (GBM) aumentó la intensidad de expresión en el segundo pase y en el tercer caso (GBM) no se detectó expresión en el segundo pase. Tanto en el caso 2 (GBM) como en el caso con linfoma (caso 4) se detectó una fuerte expresión de Ki67 en el segundo pase. FKBP51 mostró una expresión fuerte y estable en los tres casos de GBM

analizados, y se mantuvo de esta manera en ambos pases. Sin embargo, en el caso 4 con linfoma, también se detectó que la expresión de esta proteína se mantiene estable en ambos pases, pero en comparación con los casos de GBM la expresión fue menor.

	<i>Caso 1</i> (GBM)		<i>Caso 2</i> (GBM)		<i>Caso 3</i> (GBM)		<i>Caso 4</i> (Linfoma)	
	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2
<i>GFAP</i>	+++	+++	+++	++	+++	-	+++	-
<i>CD31</i>	+	++	+	++	+	+	+	++
<i>CD34</i>	++	+	-	-	-	-	++	+
<i>MAP2</i>	+++	++	-	-	-	-	++	+
<i>Ki67</i>	++	++	+	+++	+	-	/	+++
<i>FKBP51</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++

Tabla 2. Niveles de expresión de proteínas en cultivos primarios de GBM y linfoma. Niveles de expresión deducidos por cuantificación inmunocitoquímica para los marcadores celulares GFAP, CD31, CD34 y MAP2, para el indicador de proliferación Ki67 y para la proteína FKBP51 en los dos pases del cultivo primario de GBM. Casos 1-3: Pacientes con GBM primario. Caso 4: Paciente con linfoma. Grados de intensidad: (-) ausente, (+) débil; (++) moderada; (+++) fuerte.

7. DISCUSIÓN

El glioblastoma (GBM) es el tumor cerebral primario más frecuente y agresivo, con una supervivencia media de 15 meses a pesar de la cirugía y los tratamientos de radioterapia y quimioterapia (Kan et al., 2020) Anteriormente se denominaba glioblastoma multiforme debido a la heterogeneidad celular que presenta y las diferencias significativas al analizar diferentes secciones del tumor. Sin embargo, actualmente se sabe que a pesar de esa heterogeneidad se caracteriza por presentar unas determinadas poblaciones celulares como células del astrocitoma y células madre de glioma, que son las células malignas predominantes en el GBM, además de una población altamente heterogénea de células migratorias, neovascularizadoras y mieloides infiltradas que forman un complejo microambiente tumoral (Rotoli et al.,

2019) como son los astrocitos, células microgliales, pericitos, telocitos, células endoteliales y neuronas maduras. En este trabajo se caracterizaron celularmente cultivos primarios de GBM por medio de la identificación inmunocitoquímica de los marcadores GFAP, CD31, CD34 y MAP2 para describir las poblaciones celulares presentes en estos tumores.

La comunicación entre las células del microambiente tumoral es fundamental en la biología del GBM y, en consecuencia, la proteína FKBP51, que integra estímulos externos e internos para regular varias vías de señalización (Rotoli et al., 2019) también desempeña un papel importante en el GBM. Por ello se ha estudiado la expresión y localización de FKBP51 en cultivos primarios de GBM mediante análisis inmunocitoquímico.

La mayoría de los estudios actuales utilizan líneas celulares y estas no reflejan con exactitud la heterogeneidad del microambiente tumoral y por tanto es importante desarrollar modelos fiables de GBM humano. El cultivo de tejido tumoral directamente del tumor resecado, estableciendo cultivos primarios como se ha realizado en este trabajo, tiene la ventaja de que se asemeja más a la verdadera enfermedad humana y comprende una variedad de componentes celulares presentados en el microambiente natural del tumor (Kan et al., 2020).

Los marcadores celulares utilizados (GFAP, CD31, CD34 y MAP2) han permitido identificar las poblaciones de células presentes en los cultivos primarios de GBM, tanto las células malignas diferenciadas (células de astrocitoma) como las células diferenciadas que forman el microambiente tumoral.

En los cultivos primarios estudiados se identificaron astrocitos y células de astrocitoma por medio del marcaje con GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), una proteína implicada en la estructura y función del citoesqueleto y cuya expresión se incrementa tras el daño cerebral o durante la degeneración del Sistema Nervioso Central (SNC) (Pérez Rodríguez, 2016). En los gliomas, los astrocitos se activan, lo que da como resultado una capa de astrocitos reactivos que rodea el tumor. Este proceso que involucra la secreción de factores de crecimiento y citoquinas ayuda a reparar lesiones en el cerebro, pero también juega un papel en la progresión de la enfermedad (Francis Curtin et al., 2018).

Aunque estudios previos (Lacopino, F. et al., 2014) han demostrado que la expresión de GFAP no varía durante la progresión del GBM ni en los cultivos derivados de él ni durante los pases celulares o desarrollo de neuroesferas (Pérez Rodríguez, 2016), en este trabajo el primer caso (GBM) si mantiene una intensidad de expresión fuerte y constante, pero se observó una variación en el nivel de expresión de GFAP en el segundo caso (GBM), con una disminución de la señal en el segundo pase y en el caso 3 no se detectó señal en el segundo pase. Esta variación entre casos depende de la biología tumoral en concreto de cada uno de ellos, ya que se han establecido cultivos primarios únicamente de una sección del tumor que no representa el GBM en su totalidad. Sin embargo, en el linfoma también se detectaron células GFAP+ y MAP2+, esto puede deberse a que la muestra quirúrgica obtenida correspondía al límite tumoral.

Formando parte del microambiente tumoral se identificaron células endoteliales, pericitos y macrófagos por medio del marcaje con la proteína denominada *cluster of differentiation 31* (CD31) también conocida como *platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM-1), que está implicada en la migración de leucocitos, activación de integrinas y angiogénesis (Pérez Rodríguez, 2016) y se usa como marcador de células endoteliales para así evaluar el grado de angiogénesis tumoral. Las células endoteliales son importantes inductores de la invasión, especialmente en el nicho angiogénico (Vollmann-Zwerenz et al., 2020). Los estudios clínicos han demostrado que los gliomas malignos también están ampliamente infiltrados por macrófagos y microglía. La mayoría de estos macrófagos surgen de monocitos circulantes, que son reclutados al parénquima cerebral en condiciones patológicas. Esto es relevante en el GBM ya que va acompañado de una alteración de la barrera hematoencefálica durante la progresión de la enfermedad (Francis Curtin et al., 2018). Las células inmunitarias que infiltran el tumor juegan un papel importante regulando la progresión tumoral y son de gran valor diagnóstico (Pérez Rodríguez, 2016).

En todos los casos analizados se detectó expresión de CD31, que aumentó en el segundo pase excepto en el caso 3, que se mantuvo una expresión baja. Estos resultados reflejan que, según las muestras analizadas, en el cultivo primario de GBM se pueden estar activando procesos relacionados con la angiogénesis, como se observó en el caso 1 y 2, pudiendo indicar que se trata de una muestra del tumor con gran vascularización. Por otra parte, en el caso de linfoma también se expresó CD31,

aumentando cuando el cultivo permanece en crecimiento durante más tiempo (20 días), por lo que también se pueden estar activando procesos implicados en la angiogénesis en este caso. Además, se observó la presencia de otras células no endoteliales marcadas por CD31 y que por su morfología podrían tratarse de pericitos o macrófagos. En este caso los macrófagos pueden formar parte del componente inflamatorio del GBM. Este hecho, junto con las interacciones pericito-endotelial, favorece la angiogénesis patológica reflejando un potencial altamente invasivo (Rotoli, Pérez-Rodríguez, et al., 2017).

Además de células endoteliales, en la angiogénesis están implicadas células derivadas de la médula ósea, derivadas de progenitores hematopoyéticos, así como varios factores proangiogénicos que son inducidos por la hipoxia (Pérez Rodríguez, 2016). La fosfoglicoproteína transmembrana *cluster of differentiation 34* (CD34) es un marcador de endotelio vascular (Rotoli, Morales, et al., 2017) y autores como Kong et al. han demostrado que su expresión desempeña un papel crucial en la regulación de la angiogénesis del glioma al promover una nueva red de vasos sanguíneos y estimular un mayor crecimiento del glioma. Esto ocurre por el aumento del suministro de oxígeno y otros metabolitos necesarios, lo que conduce a la invasión del cerebro y empeora el pronóstico (Kong et al., 2016). A diferencia de CD31, sólo se detectó expresión de CD34 en un caso de GBM (caso 1) y en el linfoma se expresó de la misma forma que en el caso 1. Por lo tanto, en los otros dos casos de GBM (caso 2 y 3) en los que no se detectaron células CD34+, no hay telocitos o macrófagos formando parte del microambiente tumoral.

También se detectó la presencia de neuronas por medio del marcaje con *microtubule-associated protein 2* (MAP2), una proteína que participa en el desarrollo de los procesos neuronales y la plasticidad sináptica (Dehmelt & Halpain, 2004). En el GBM las neuronas son la población más escasa de células y además presentan un amplio grado de diferenciación (Rotoli, Pérez-Rodríguez, et al., 2017). Se ha informado de que los precursores neuronales endógenos tienen una respuesta antitumoral al dirigirse específicamente a las GSC, lo que sugiere que el microambiente del SNC controla la proliferación de las células gliales y las células cancerosas (Rotoli et al., 2019). Esta proteína se expresó en un caso de GBM (caso 1) con una intensidad fuerte que disminuyó en el segundo pase. En los otros dos casos de GBM (caso 2 y 3) no se detectó expresión. Estas neuronas presentes en el caso de

GBM (caso 1) probablemente procedan del entorno del tumor, ya que al realizar la cirugía se pudieron haber extraído células colindantes y la muestra analizada procedía de estos límites del tumor, mientras que en los otros casos de GBM (2 y 3) en los que no se detectó expresión de MAP2, las muestras analizadas probablemente procedían del interior tumoral.

En el GBM se distinguen células con un alto índice de proliferación (Pérez Rodríguez, 2016), que en este estudio se identificó por Ki67. La proteína Ki67 se detecta en los núcleos de las células en fase G1, S, G2 y mitosis, pero no en los núcleos de las células quiescentes en fase G0. Por lo tanto, el nivel de expresión de Ki67 indica el estado de proliferación celular. De hecho, Ki67 se ha propuesto como marcador pronóstico del cáncer (Yang et al., 2018). El nivel de proliferación varió según los casos y países. En el caso 1 (GBM) la actividad proliferativa se mantiene en el mismo nivel de intensidad y a diferencia de los demás casos de GBM, en el primer pase la proliferación observada fue moderada. Esto también puede ser indicativo de que se trata de un cultivo celular con actividad proliferativa más avanzada y que puede desencadenar en procesos que le confieren una mayor agresividad tumoral respecto a los otros dos casos de GBM, al igual que ocurría con la expresión de los marcadores comentados con anterioridad, ya que Ki67 es un marcador que se expresa de manera abundante en células malignas (Wang et al., 2018).

La inmunofilina FKBP51 ejerce funciones en la regulación de múltiples vías de señalización como en las respuestas a la terapia antineoplásica y en la tumorigénesis a través de sus efectos sobre la maduración del receptor de esteroides y a través de su regulación de varias vías de señalización, como NF- κ B, PKA, TGF β , y Akt (Rotoli et al., 2019). Se ha evidenciado que su sobreexpresión parece estar relacionada con una mayor agresividad de los gliomas (Pérez Rodríguez, 2016). En este estudio, los niveles de expresión de FKBP51 fueron altos y establecen los dos pases de los casos con GBM, en todas las poblaciones celulares identificadas. La expresión de FKBP51 en células endoteliales y perivasculares puede indicar que desempeña un papel fundamental en la angiogénesis y la migración celular. Esta proteína también puede estar involucrada en la alta proliferación e invasión de este tumor ya que interviene en las conexiones entre las diferentes poblaciones celulares que forman el microambiente tumoral. Debido a la fuerte y constante expresión de FKBP51 observada en todos los casos de GBM analizados en este trabajo y a que FKBP51 está

implicada en la génesis tumoral y en la quimio-resistencia (Pérez Rodríguez, 2016), esta proteína podría utilizarse en la terapia del GBM ya que es una característica común en los tres casos con GBM y se ha evidenciado que se expresa en las diferentes poblaciones celulares presentes en el microambiente tumoral y que contribuyen a la agresividad y resistencia a los tratamientos actuales

Este trabajo confirma la gran heterogeneidad interpaciente e intratumoral de los GBMs, así como el papel fundamental del microambiente tumoral, también muy variable. Los casos 2 y 3 de GBM presentaron características similares en cuanto a la expresión de las proteínas y el primer caso de GBM mostró grandes diferencias con los otros dos casos, expresando todas las proteínas estudiadas y pudiendo indicar la activación de procesos implicados en la agresividad e invasión del tumor, lo que se pudo observar por la intensidad de expresión de los cuatro marcadores analizados (GFAP, CD31, CD34y MAP2), por presentar una mayor tasa de proliferación en comparación con los otros dos casos y por el gran tamaño e irregularidad celular observados en la muestra.

Las terapias estándar actuales son incapaces de dirigirse a las células tumorales infiltradas, y hasta el momento no se dispone de tratamientos eficaces, por lo que existe una necesidad clínica urgente de investigar con más detalle los mecanismos que conducen a esta invasión (Vollmann-Zwerenz et al., 2020). Con este trabajo se observó que FKBP51 es una proteína en común en todos los casos de GBM analizados y además se observó que también interviene en la biología del linfoma. Por lo tanto, FKBP51 puede ser una proteína de interés terapéutico para seguir investigando.

Es importante tener en cuenta que los marcadores celulares estudiados ayudan a identificar características de la muestra, pero no del tumor al completo. Por ello, estos resultados ayudan a caracterizar en parte los cultivos primarios de GBM, pero no describen en su totalidad el tumor. Es necesario analizar un número mayor de casos y diferentes secciones del mismo tumor para observar si la expresión de estas proteínas sufre variaciones o siguen un patrón similar de expresión para así poder caracterizar en mayor profundidad tumores tan heterogéneos como es el caso del GBM.

8. CONCLUSIONES

1. En los cultivos primarios de GBM se detectó fluorescencia específica para GFAP (marcador específico de astrocitos) en los 3 casos con cambios variables según el caso estudiado.
2. En los cultivos primarios de GBM la expresión de CD31 (marcador de células endoteliales) aumenta en el segundo pase.
3. La expresión de CD34 y MAP2 sólo se detectó en el cultivo celular procedente del caso 1 y disminuyó en el segundo pase.
4. El nivel de proliferación valorado mediante detección de Ki67 reflejó una mayor actividad proliferativa en el segundo pase, aunque con gradientes variables
5. FKBP51 se expresa en todos los tipos celulares de localización citoplasmática, nuclear, con una mayor intensidad alrededor del núcleo en torno a la membrana nuclear y, en todas las localizaciones, también como agregaciones en forma de cuerpos de inclusión.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Bronisz, A., Wang, Y., Nowicki, M. O., Peruzzi, P., Ansari, K. I., Ogawa, D., Balaj, L., de Rienzo, G., Mineo, M., Nakano, I., Ostrowski, M. C., Hochberg, F., Weissleder, R., Lawler, S. E., Chiocca, E. A., & Godlewski, J. (2014). Extracellular vesicles modulate the glioblastoma microenvironment via a tumor suppression signaling network directed by miR-1. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2650>
- Caligiuri, G. (2020). CD31 as a therapeutic target in atherosclerosis. *Circulation Research*, *126*(9), 1178–1189. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.315935>
- da Hora, C. C., Schweiger, M. W., Wurdinger, T., & Tannous, B. A. (2019). Patient-Derived Glioma Models: From Patients to Dish to Animals. In *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells8101177>
- D'Arrigo, P., Digregorio, M., Romano, S., Tufano, M., Rea, A., Hausch, F., Dedobbeleer, M., Vigorito, V., Russo, S., Bauder, M., Rogister, B., & Romano, M. F. (2019). The

- splicing FK506-binding protein-51 isoform plays a role in glioblastoma resistance through programmed cell death ligand-1 expression regulation. *Cell Death Discovery*. <https://doi.org/10.1038/s41420-019-0216-0>
- D'Arrigo, P., Russo, M., Rea, A., Tufano, M., Guadagno, E., Laura, M., de Caro, D. B., Pacelli, R., Hausch, F., Staibano, S., Ilardi, G., Parisi, S., Romano, M. F., & Romano, S. (2017). *A regulatory role for the co-chaperone FKBP51s in PD-L1 expression in glioma*. www.impactjournals.com/oncotarget
- Dehmelt, L., & Halpain, S. (2004). *The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins Gene organization and evolutionary history*. <http://genomebiology.com/2004/6/1/204>
- Duan, W., Zhang, Y. P., Hou, Z., Huang, C., Zhu, H., Zhang, C. Q., & Yin, Q. (2016). Novel Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator. *Molecular neurobiology*, 53(3), 1637–1647. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9122-5>
- Francis Curtin, J., Alfaro, C., Rodabe Amaria, S. N., Liu, Q., Ma, Q., Long, W., Xing, C., Chu, J., Luo, M., Wang, H. Y., & Wang, R.-F. (2018). Cancer Stem Cells and Immunosuppressive Microenvironment in Glioma. *Cancer Stem Cells and Immunosuppressive Microenvironment in Glioma. Front. Immunol*, 9, 2924. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02924>
- Hähle, A., Merz, S., Meyners, C., & Hausch, F. (2019). The many faces of FKBP51. In *Biomolecules*. <https://doi.org/10.3390/biom9010035>
- Juríková, M., Danihel, L., Polák, Š., & Varga, I. (2016). Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochemica*, 118(5), 544–552. <https://doi.org/10.1016/J.ACTHIS.2016.05.002>
- Kan, L. K., Drummond, K. J., Hunn, M., Williams, D. A., O'brien, T. J., & Monif, M. (2020). A simple and reliable protocol for the preparation and culturing of fresh surgically resected human glioblastoma tissue. *Methods and Protocols*. <https://doi.org/10.3390/mps3010011>
- Kim, S. S., Pirolo, K. F., & Chang, E. H. (2015). Isolation and culturing of glioma cancer stem cells. *Current Protocols in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb2310s67>

- Kong, X., Guan, J., Ma, W., Li, Y., Xing, B., Yang, Y., Wang, Y., Gao, J., Wei, J., Yao, Y., Xu, Z., Dou, W., Lian, W., Su, C., Ren, Z., & Wang, R. (2016). CD34 over-expression is associated with gliomas' higher WHO grade. In *Medicine (United States)* (Vol. 95, Issue 7, p. e2830). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002830>
- Maddodi, N., Bhat, K. M., Devi, S., Zhang, S. C., & Setaluri, V. (2010). Oncogenic BRAFV600E induces expression of neuronal differentiation marker MAP2 in melanoma cells by promoter demethylation and down-regulation of transcription repressor HES1. *The Journal of biological chemistry*, 285(1), 242–254. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.068668>
- Pérez Rodríguez, N. D. (2016). *Estudio de la expresión de diversos genes en Glioblastoma Multiforme y correlaciones con malignidad y supervivencia*. <http://riull.ull.es/xmlui/handle/915/21185>
- Rotoli, D., Díaz-Flores, L., Gutiérrez, R., Morales, M., Ávila, J., & Martín-Vasallo, P. (2022). AmotL2, IQGAP1, and FKBP51 Scaffold Proteins in Glioblastoma Stem Cell Niches. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 70(1), 9–16. <https://doi.org/10.1369/00221554211025480>
- 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*. <https://doi.org/10.1369/0022155419833334>
- Rotoli, D., Morales, M., Maeso, M. D. C., García, M. D. P., Morales, A., Ávila, J., & Martín-Vasallo, P. (2016). Expression and localization of the immunophilin FKBP51 in colorectal carcinomas and primary metastases, and alterations following oxaliplatin-based chemotherapy. *Oncology Letters*, 12(2), 1315–1322. <https://doi.org/10.3892/OL.2016.4772>
- Rotoli, D., Morales, M., del Carmen Maeso, M., del Pino García, M., Gutierrez, R., Valladares, F., Ávila, J., Díaz-Flores, L., Mobasher, A., & Martín-Vasallo, P. (2017). Alterations in IQGAP1 expression and localization in colorectal carcinoma and liver metastases following oxaliplatin-based chemotherapy. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6525>

- Rotoli, D., Pérez-Rodríguez, N. D., Morales, M., Maeso, M. D. C., Ávila, J., Mobasheri, A., & Martín-Vasallo, P. (2017). IQGAP1 in podosomes/invadosomes is involved in the progression of glioblastoma multiforme depending on the tumor status. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms18010150>
- Sidney, L. E., Branch, M. J., E Dunphy, S. A., Dua, H. S., & Hopkinson, A. (2014). *Concise Review: Evidence for CD34 as a Common Marker for Diverse Progenitors*. <https://doi.org/10.1002/stem.1661>
- van Bodegraven, E. J., van Asperen, J. v, Robe, P. A. J., & Hol, E. M. (2019). *Importance of GFAP isoform-specific analyses in astrocytoma*. <https://doi.org/10.1002/glia.23594>
- Vollmann-Zwerenz, A., Leidgens, V., Feliciello, G., Klein, C. A., & Hau, P. (2020). Tumor cell invasion in glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6). <https://doi.org/10.3390/IJMS21061932>
- Wang, X., Prager, B. C., Wu, Q., Kim, L. J. Y., Gimple, R. C., Shi, Y., Yang, K., Morton, A. R., Zhou, W., Zhu, Z., Obara, E. A. A., Miller, T. E., Song, A., Lai, S., Hubert, C. G., Jin, X., Huang, Z., Fang, X., Dixit, D., ... Rich, J. N. (2018). Reciprocal Signaling between Glioblastoma Stem Cells and Differentiated Tumor Cells Promotes Malignant Progression. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.03.011>
- Zgajnar, N. R., de Leo, S. A., Lotufo, C. M., Erlejman, A. G., Piwien-Pilipuk, G., & Galigniana, M. D. (2019). *biomolecules Biological Actions of the Hsp90-binding Immunophilins FKBP51 and FKBP52*. <https://doi.org/10.3390/biom9020052>