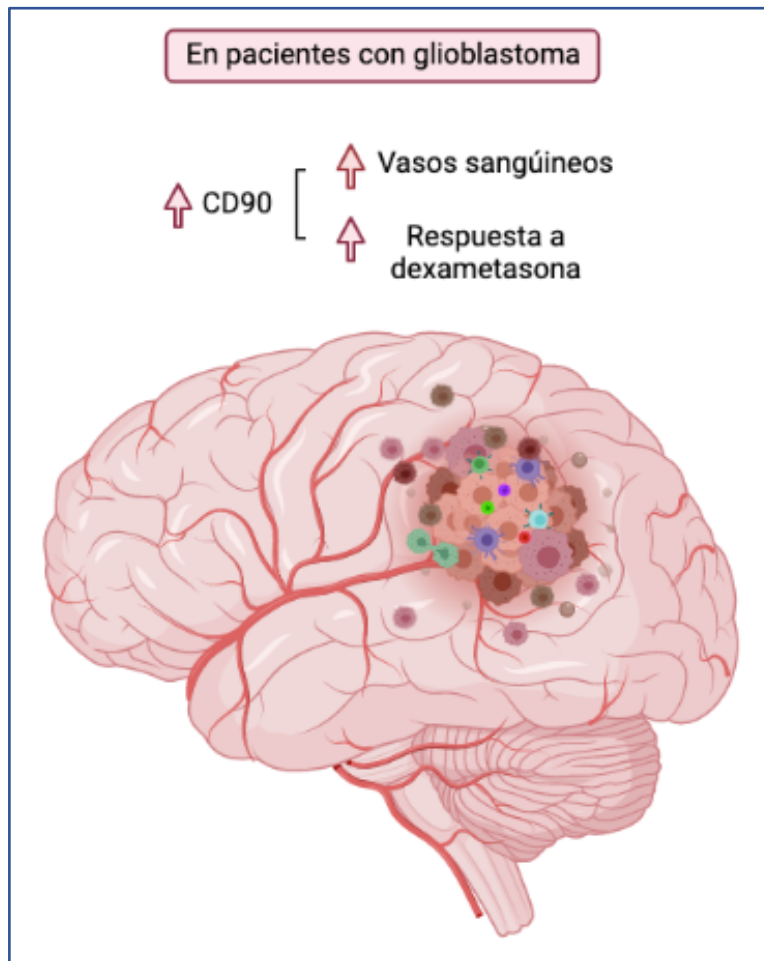


# CD90 COMO POTENCIAL MARCADOR PREDICTIVO PARA EL TRATAMIENTO DE GLIOBLASTOMA CON DEXAMETASONA

TRABAJO DE FIN DE GRADO



ESTUDIANTE: LAURA FRANCO EZQUERRO

Tutor: Isabel García Álvarez

Supervisor: Noemí García Romero



Universidad  
Francisco de Vitoria  
UFV Madrid

MADRID, 1 DE JUNIO DE 2021

Universidad Francisco de Vitoria

Institución: Brain Tumor Lab

## Acrónimos empleados

- SNC: Sistema Nervioso Central
- GB: Glioblastoma
- MRI: Imagen por resonancia magnética
- TTF: *Tumor Treating Field*
- ARNm: ARN mensajero
- CSCs: Célula madre cancerígena
- GPI: glicosilfosfatidilinositol
- SN: Sistema nervioso
- TAMs: Macrófagos asociados a tumor
- ECs: Células madre cancerígenas endoteliales
- $\alpha$ -SMA:  $\alpha$ -actina de músculo liso
- MSCs: células madre mesenquimales

# Índice

<b>Abstract .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>4</b>
<b>2. Objetivo e hipótesis.....</b>	<b>9</b>
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>9</b>
3.1. Selección de la cohorte.....	9
3.2. Hematoxilina-eosina (H&E).....	10
3.3. Inmunofluorescencia .....	10
3.4. qRT-PCR .....	13
3.5. Normalización de datos obtenidos por qRT-PCR e IF .....	14
<b>4. Resultados .....</b>	<b>15</b>
4.1. El total de las muestras analizadas tenían características neoplásicas.....	15
4.2. Los varones presentan una mayor incidencia de GB y mayor edad media pero una mayor supervivencia en nuestra cohorte. ....	17
4.3. Todas las muestras de GB expresaban <i>CD90</i> y alta heterogeneidad de genes de CSCs. ....	18
4.4. Existen diferencias morfológicas y genéticas entre los vasos CD90+ y CD90-.....	21
4.5. Los respondedores tienden a tener mayores niveles de CD90.....	23
4.6. Debido a la alta heterogeneidad no existe correlación entre los niveles de CD90 obtenidos mediante qRT-PCR y la IF.....	24
<b>5. Discusión y Conclusiones .....</b>	<b>26</b>
<b>6. Bibliografía .....</b>	<b>29</b>

## Abstract

Los gliomas son los tumores malignos más comunes del sistema nervioso central (SNC). El glioblastoma (GB), o glioma de grado IV, es el más agresivo en adultos, con una mediana de supervivencia de 8 meses si no se sigue un tratamiento. Actualmente, la terapia consiste en cirugía, seguida de radioterapia junto con quimioterapia concomitante y adyuvante, normalmente temozolomida. Antes de la resección tumoral, el fármaco más comúnmente recetado es el agente corticoideo dexametasona, para cesar las cefaleas y el edema cerebral asociado al tumor, dado que inhibe a las prostaglandinas y los leucotrienos, produciendo una respuesta anti-inflamatoria e inmunosupresora. A pesar de los esfuerzos de la comunidad científica, actualmente solo se ha conseguido aumentar la esperanza de vida a 20,9 meses, como consecuencia principalmente de la elevada heterogeneidad intra- e inter-tumoral. Sin embargo, ensayos previos han demostrado que la respuesta clínica a dexametasona mejora en aquellos pacientes con mayor expresión de CD90. Por lo que decidimos estudiar el potencial uso de CD90 como marcador predictivo de respuesta a dexametasona en una cohorte de 24 pacientes con GB y analizar la heterogeneidad del tumor. Mediante PCR cuantitativa a tiempo real e inmunofluorescencia pudimos observar en nuestra cohorte como los respondedores a dexametasona presentan una mayor cantidad de células CD90+.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, en un futuro, CD90 podría usarse como marcador predictivo de respuesta, mejorando así la terapia. Sin embargo, se necesitan más estudios que expliquen los mecanismos moleculares implicados en el proceso de angiogénesis en GB así como profundizar en la heterogeneidad del tumor y aumentar el número muestral para minimizar los errores producidos por esta.

Palabras clave: glioblastoma, CD90, THY-1, dexametasona.

## 1. Introducción

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Se estima que actualmente, diecinueve millones de personas padecen cáncer. Lamentablemente, la incidencia de esta enfermedad va en aumento y se predice que en el año 2035 habrán catorce millones de casos nuevos de cáncer (Pilleron et al., 2019). Esta patología se define como un conjunto de enfermedades de causa genética en la que células anormales se dividen descontroladamente y presentan capacidad para invadir nuevos tejidos (Hausman, 2019) en un proceso conocido como metástasis (Suhail et al., 2019). Además, también puede expandirse a otros tejidos a través de la sangre y la linfa. El crecimiento y la expansión del tumor se ve favorecido por la angiogénesis, que permite la creación de nuevos vasos sanguíneos, trayendo nutrientes al núcleo tumoral y sirviendo como vía de expansión y migración (Zanotelli & Reinhart-King, 2018). Los tumores resultantes presentan proliferación sostenida, diferenciación indefinida, inestabilidad genética, modificaciones metabólicas, evasión del sistema inmune y capacidad angiogénica, pro-inflamatoria y metastática (Hanahan & Weinberg, 2000). Según el libro escrito por Robert A. Weinberg *“The biology of cancer”* (Garland science, 2014), el 80% de los tumores surge de células epiteliales y se conocen como carcinomas que pueden ser escamosos o adenocarcinomas según si la célula de origen rodea una cavidad o forma parte de una glándula, respectivamente. Otro tipo de clasificación es según la capa embrionaria de la que proviene: ectodermo, endodermo o mesodermo. Sin embargo, la mayoría de los carcinomas pueden formar parte de las tres capas. Una excepción de esta clasificación son los teratomas, tumores benignos originados de células embrionarias con la capacidad de diferenciación en las tres capas embrionarias. Por último, distinguimos los tumores anaplásicos, tan indiferenciados que no permiten determinar ni un origen ni la capa embrionaria a la que pertenecen. El proceso de transformación es secuencial y además va asociado a cambios histológicos que correlacionan con alteraciones moleculares y que indican la previsión del tumor: hiperplasia, metaplasia, displasia y neoplasia (formación del tumor). El tumor puede ser benigno o maligno.

Dentro del sistema nervioso central (SNC) también existe mucha heterogeneidad en cuanto a la variedad celular y posicional que puede presentar cada tumor (Pajtler et al., 2015). El glioma es un tumor localizado en el cerebro y que puede presentar cuatro grados de severidad. El glioma de grado cuatro se conoce como glioblastoma (GB) y es el más común y agresivo de todos los tumores del SNC, con una supervivencia mediana de 8 meses sin tratamiento (Ostrom et al.,

2020). Normalmente cursa con cambios de personalidad y desórdenes del carácter, así como deterioro sensoriomotor, afasia, epilepsia, dolores de cabeza, náuseas, vómitos, mareos, fatiga y deterioro cognitivo (Wirsching et al., 2016). Este tipo de tumor surge a partir de células de la glía o de sus precursores, así como de oligodendrogliomas, ependimomas u oligoastrocitomas. Presenta una incidencia de 7,08 personas de cada cien mil habitantes (Ostrom et al., 2020), una alta mortalidad y gran heterogeneidad. Esto dificulta en gran medida la investigación de la enfermedad y, por tanto, el descubrimiento de alguna terapia efectiva. De esta manera, solo se han conseguido pequeños avances en el tratamiento.

El diagnóstico del GB comienza por la detección del tumor mediante pruebas de imagen como la imagen por resonancia magnética (MRI), tomografía computacional, y tomografía por emisión de positrones entre otras. A continuación, se lleva a cabo un estudio histopatológico. Se clasifica como GB cuando los pacientes presentan numerosas zonas necróticas y de proliferación microvascular. Posteriormente, se analizan marcadores moleculares como la metilación del promotor de *MGMT*, una proteína de reparación del ADN, así como mutaciones en el gen *IDH* y amplificaciones en *EGFR* (Wirsching et al., 2016).

El tratamiento contra el GB de primera línea viene definido por el Protocolo Stupp (Cruz Da Silva et al., 2021), que consiste en la resección tumoral seguida de radioterapia y quimioterapia adyuvante y concomitante, normalmente temozolomida. De esta manera, se aumenta la esperanza de vida hasta 14,6 meses. La nueva alternativa que ha surgido en los últimos años consiste en el uso del casco *Tumor Treating Field* (TTF) (Wang et al., 2021) cuyo uso puede aumentar la esperanza de vida hasta 20,9 meses al desestabilizar el uso mitótico impidiendo la división celular. Previa a la resección tumoral, se trata el edema cerebral asociado a tumor. Uno de los fármacos más empleados es la dexametasona (Sundaram et al., 1978) un corticoide tipo fluorado indicado en el tratamiento de larga duración. Este presenta alta capacidad anti-inflamatoria e inmunosupresora y baja actividad mineralocorticoide. Según la ficha técnica del medicamento, su mecanismo de acción principal consiste en la inhibición de la síntesis de fosfolipasa A2, un enzima liberador de los ácidos grasos poliinsaturados precursores de prostaglandinas y leucotrienos. Como consecuencia, se disminuyen la vasodilatación, el exudado vascular, la respuesta inmunológica, la actividad leucocitaria, la agregación y la degranulación de los neutrófilos y la liberación de enzimas hidrolíticas por los lisosomas. Además, se activan los receptores glucolíticos localizados en el citoplasma, y, en consecuencia, se movilizan

endopeptidasas, inhibidores del plasminógeno y lipocortina. La dexametasona tiene un segundo mecanismo de acción que consiste en la inhibición de diferentes genes implicados en los procesos de inflamación mediante la alteración de la estructura de sus ARN mensajeros (ARNm) (Cima AEMPS, 2020).

Como se ha mencionado con anterioridad, una de las características más importantes que presenta el GB es su alta heterogeneidad celular. Esto dificulta en gran medida su estudio, pues implica la coexistencia de diversos tipos celulares, entre ellos, las células madre cancerígenas o *cancer stem cells* (CSCs). Este tipo celular presenta características tanto de las células madre como de las células cancerígenas. Sus principales funciones son la auto-renovación, capacidad de diferenciación hacia otros tipos celulares, capacidad tumorigénica y resistencia a fármacos. Se pueden distinguir del resto de células por sus alteraciones durante la división celular y las diferencias en la expresión génica. Existen varios marcadores de CSCs como son CD133, CD44, CD29 y CD24, (Yu et al., 2012) entre otros.

CD90 o THY-1 es un glicosilfosfatidilinositol (GPi), un glicolípido unido covalentemente al extremo carboxil terminal de una proteína con un dominio inmunoglobina tipo V, sin dominio intracelular, y cuya función principal está implicada en la transmisión de señales (Avril et al., 2017; Sauzay et al., 2019). Es capaz de interactuar con integrinas  $\alpha v/\beta 3$ ,  $\alpha x/\beta 2$ , con sindecán 4, CD90 y CD97 (Leyton et al., 2019). Aunque no se conoce mucho acerca de sus funciones, se ha demostrado que CD90 está involucrado en las uniones célula a célula y célula a matriz, en los procesos de adhesión, migración y metástasis (Schubert et al., 2013), el crecimiento y regeneración axonal, los procesos de apoptosis, inflamación (Wetzel et al., 2004), fibrosis y proliferación y migración de fibroblastos en recuperación frente a daño (He et al., 2012; Woo et al., 2015). En tejido sano tanto de humano como en ratón, esta proteína se expresa en el sistema nervioso (SN), en las células olfativas y en la piel. También se ha encontrado en bazo y timo de ratón. Además, CD90 se expresa en cáncer de piel, de hígado, mielóide y de cerebro, como es el GB. En este tipo tumoral no se han encontrado mutaciones del gen, al contrario que en el neuroblastoma donde se han estudiado tres mutaciones en *frameshift* (Sauzay et al., 2019).

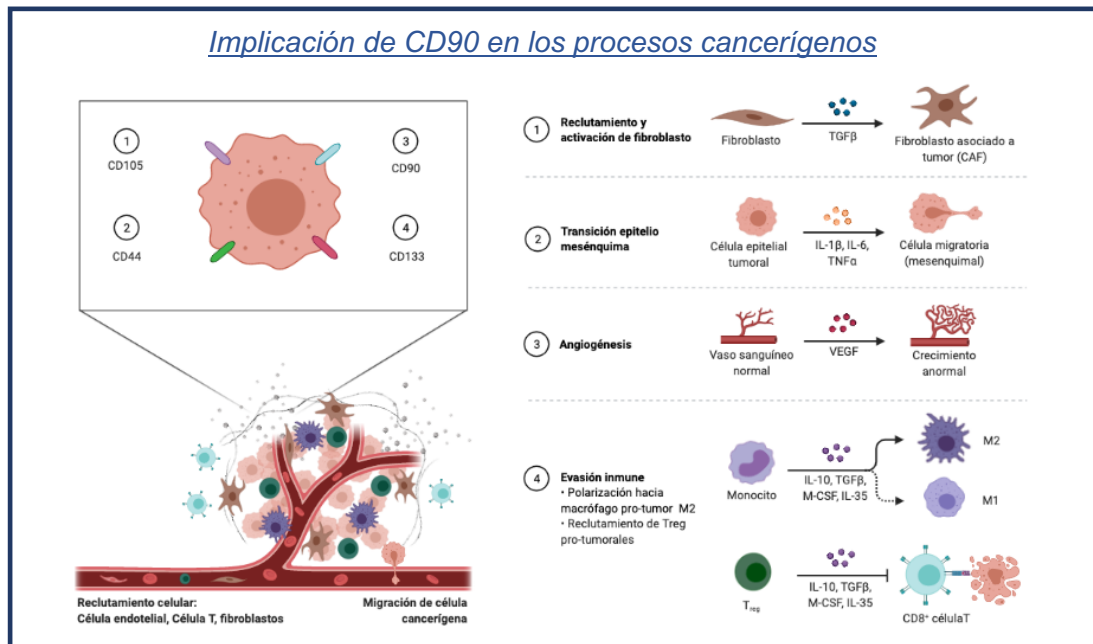
En GB, la función de CD90 no resulta clara, sin embargo, se ha visto relacionado con procesos de oncogénesis como son la angiogénesis, es decir, formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de unos preexistentes, metástasis (Yamashita et al., 2013) y la formación de neuroesferas

(He et al., 2012). Diferentes estudios afirman que esta proteína es expresada por CSCs, por células endoteliales, pericitos y fibroblastos (Inoue et al., 2016; Wei et al., 2020). También se ha asociado la expresión de CD90 con la adhesión, migración e invasión del tumor mediante las vías de señalización de SRC y FAK (Avril et al., 2017; Rege et al., 2006). Esto correlaciona con otros estudios que han afirmado que CD90 presenta una importante función en los procesos de metástasis tumoral en GB y los procesos de angiogénesis. Una de las hipótesis se basa en la interacción de las integrinas CD11b y CD18, de los monocitos circulantes y de los macrófagos, con CD90, promoviendo reclutamiento celular y migración transendotelial (Schubert et al., 2011). De esta manera, se facilita la llegada y migración de macrófagos asociados a tumor (TAMs). Además, se han encontrado poblaciones CD90+ y CD105+, un marcador de endotelio relacionado con angiogénesis activa (Inoue et al., 2016). Así mismo, se ha demostrado una relación entre los niveles de CD90 y la respuesta a otro fármaco corticoideo empleado en el tratamiento del edema tumoral, dasatinib (Avril et al., 2017).

Teniendo en cuenta que los GB son tumores sólidos muy vascularizados dependientes del proceso de angiogénesis, el estudio de la función específica de CD90 resulta vital (Ahir et al., 2020). El proceso angiogénico es muy complejo ya que en él se ven involucrados otros mecanismos oncogénicos como son la migración, proliferación y diferenciación celular hacia células madre cancerígenas endoteliales (ECs) mayoritariamente dirigida por la ruta de Notch (Ranganathan et al., 2011). Los vasos sanguíneos se componen de ECs, células musculares y células de sostén conocidas como pericitos (Tennant & McGeachie, 1990). Se ha observado la presencia de CD90 en todas las capas vasculares, incluida la capa muscular, dado que se han observado poblaciones celulares CD90+ que además expresaban  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) (Inoue et al., 2016). Sin embargo, los vasos tumorales presentan estructuras glomerulares poco funcionales que van a determinar el desarrollo del glioma (Mathivet et al., 2017). Estos suelen ser menos organizados ya que presentan menos membrana basal y menor número de pericitos. Como consecuencia, estos vasos son más permeables. Normalmente, la angiogénesis se asocia con un aumento en la migración tumoral y un peor pronóstico (Figura 1).

Se conoce que las células madre mesenquimales (MSCs) se diferencian a pericitos y estos migran al vaso para adherirse a la célula endotelial y proporcionarle estabilidad (D'Amore & Shima, 1996). Este proceso se ha visto favorecido en un ambiente de glioma. Se ha demostrado que las MSCs expresan CD90 y que esta proteína correlaciona con angiogénesis (Yi et al., 2018).

Además, previos hallazgos de nuestro equipo, aún no publicados, muestran en una cohorte de 58 pacientes con GB, tras la administración de 4 mg de dexametasona 12 horas antes de la resección tumoral, que la sobreexpresión de CD90 correlaciona de manera significativa con la respuesta a dexametasona.



*Figura 1: Esquema de los procesos cancerígenos en los que CD90 se ha visto involucrado en GB.*

Finalmente, ante las discrepancias existentes y el poco conocimiento sobre las funciones de CD90, nuestro equipo de investigación pretende arrojar un poco de luz a las funciones más importantes que CD90 puede tener en los pacientes con GB. Ya que algunos estudios defienden que CD90 puede ser utilizado como marcador de CSCs, mientras que otros estudios han determinado que CD90 no tiene una utilidad clínica en la formación y resistencia de estas CSCs (Woo et al., 2015). Para ello nosotros estudiaremos la expresión de CD90 junto con otros genes de CSCs como son *CD133*, *CD44* y *OCT3/4*. Dado que también se ha afirmado que CD90 puede intervenir en el proceso de angiogénesis, nos planteamos qué relación puede tener CD90 con el número de vasos sanguíneos, estructura y funcionalidad. Además, ya que anteriormente observamos una relación entre los niveles de CD90 y la respuesta a dexametasona, en el presente trabajo, profundizaremos en ella teniendo en cuenta la heterogeneidad tumoral.

## 2. Objetivo e hipótesis

Para confirmar nuestra hipótesis de que CD90 puede llegar a ser un potencial marcador de respuesta a dexametasona, formulamos los siguientes objetivos:

- Estudiar la expresión de CD90 en una cohorte de 24 pacientes con GB.
  - Caracterizar las muestras según la expresión de genes de endotelio y de CSCs.
- Analizar la relación de CD90 con la respuesta a dexametasona.
  - Observar las diferencias entre vasos sanguíneos CD90+ y CD90-.
- Observar la correlación entre los datos obtenidos mediante PCR a tiempo real (qRT-PCR) y los obtenidos mediante inmunofluorescencia (IF).

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Selección de la cohorte

La cohorte se compone de muestras de 24 pacientes de entre 27 y 84 años diagnosticados con glioma de grado II (n=2), III (n=3) o IV (n=16), con gliosarcoma grado IV (n=1) y con glioma recurrente (n=2). Las muestras se obtuvieron del Hospital La Fe entre el año 2014 y 2016.

#### Cohorte del estudio.

*Tabla 1: Cohorte empleada en el estudio. (M) Sexo masculino. (F) Sexo femenino. (-) Dato desconocido.*

ID Paciente	Género	Edad	Supervivencia	Diagnóstico
TCGBM05	F	38	5 meses	Glioblastoma, grado IV
TCGBM09	M	70	19 meses	Glioblastoma, grado IV
TCGBM19	M	-	5 meses	Glioblastoma, grado IV
TCGBM20	M	42	-	Glioblastoma, grado IV
TCGBM21	F	36	14 meses	Glioblastoma, grado IV
TCGBM25	M	77	10 meses	Glioblastoma, grado IV
TCGBM26	M	41	25 meses	Glioma, grado III
TCGBM28	M	57	-	Glioblastoma grado IV
TCGBM30	M	65	19 meses	Glioblastoma grado IV

TCGBM34	M	34	12 meses	Glioblastoma grado IV
TCGBM39	M	66	-	Glioblastoma grado IV
TCGBM43	F	46	20 meses	Glioma grado III
TCGBM45	M	27	-	TCGBM18 recurrente
TCGBM46	M	53	4 meses	Glioma, grado III
TCGBM47	M	66	-	TCGBM30 recurrente
TCGBM54	M	-	8 meses	Glioblastoma, grado IV
TCGBM60	M	56	-	Glioblastoma, grado IV
TCGBM63	F	52	-	Glioblastoma, grado IV
TCGBM64	F	38	-	Gliosarcoma, grado IV
TCGBM66	F	-	-	Glioblastoma, grado IV
TCGBM68	M	56	-	Glioma, grado II
TCGBM69	M	84	-	Glioblastoma, grado IV
TCGBM72	F	42	-	Glioma grado II.
TCGBM73	M	54	-	Glioblastoma grado IV

### 3.2. Hematoxilina-eosina (H&E)

Se emplearon y revisaron las H&E de las 24 muestras para corroborar la malignidad del tejido a estudiar.

### 3.3. Inmunofluorescencia

Las 24 muestras empleadas fueron las correspondientes a las H&E, para asegurar el estudio sobre tejido tumoral.

Las primeras siete muestras (TCGBM 5, TCGBM 9, TCGBM 19, TCGBM 20, TCGBM 21, TCGBM 25 y TCGBM 26) se trataron con el anticuerpo primario CD90 *rabbit anti-human* (EPR3132) y el anticuerpo secundario Alexa Fluor 647 *goat anti-rabbit* (A31634). Las restantes (TCGBM 28, TCGBM 30, TCGBM 34, TCGBM 39, TCGBM 43, TCGBM 45, TCGBM 46, TCGBM 47, TCGBM 54, TCGBM 60, TCGBM 63, TCGBM 64, TCGBM 66, TCGBM 68, TCGBM 69, TCGBM 72 y TCGBM 73) se trataron con el mismo anticuerpo primario, pero otro anticuerpo secundario, Alexa Fluor 488 *donkey anti-rabbit* (A21206).

Pasos del día 1 si el anticuerpo secundario empleado es Alexa Fluor 647:

- I. La muestra se calienta a 80°C durante veinte minutos para ayudar en el proceso de desparafinado.
- II. Se procede a hidratar la muestra con lavados consecutivos en Xileno (dos lavados), alcohol en concentraciones decrecientes (100%, 100%, 96%, 70%) y agua destilada, durante 5 minutos en cada lavado.
- III. Se lavan las muestras en PBS 0.1M (gibco *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) durante cinco minutos.
- IV. Desenmascaramos las muestras con tampón Citrato (1,47g de Citrato sódico y 250 µL de Tween20) a pH 6.01 durante veinte minutos. Para ello es necesario calentar el citrato hasta el punto de ebullición.
- V. Lavamos las muestras para eliminar los restos del tampón Citrato con PBS 0.1 M + Tritón 0.1% (*Sigma-Aldric*) + BSA 0.1% (*Fisher Scientific*). Este paso se lleva a cabo en agitación.
- VI. Bloqueamos la muestra con *Normal Goat Serum* (NGS, Sigma G9023-10ML -10ML) a 5% en PBS 1X + Tritón 0.1% durante una hora a temperatura ambiente. A cada muestra se añaden 80 µL. Este paso se lleva a cabo en agitación.
- VII. Se incuban las muestras con el anticuerpo primario durante toda la noche en agitación y a 4°C. A cada muestra se le añaden 80 µL del anticuerpo primario CD90 disuelto en el bloqueo en proporción 1:100 respectivamente. Cada muestra tendrá un control negativo que en lugar de la solución con el anticuerpo tendrá solución de bloqueo.

Pasos del día 2 si el anticuerpo secundario empleado es Alexa Fluor 647:

- I. Lavar las muestras con PBS 0.1M en seis lavados de 2 minutos cada uno. Este paso se lleva a cabo en agitación.
- II. Incubar las muestras durante 1 hora con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 647 diluido en PBS 0.1M en proporción 1:200. Este paso se lleva a cabo en agitación.
- III. Se lavan las muestras con PBS 0.1M en seis lavados de 2 minutos cada uno. Este paso se lleva a cabo en agitación.
- IV. Se tiñen los núcleos con 80 µl de DAPI en concentración 1:5000 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Este paso se lleva a cabo en agitación.

- V. Lavar las muestras con PBS 0.1M en cinco lavados de 2 minutos. Este paso se lleva a cabo en agitación.
- VI. Se secan las muestras, se aplica Fluorsave (Calbiochem) para preservar la fluorescencia, se cubre el portaobjetos y se procede a la observación en microscopio de fluorescencia pasados 20 minutos.

Para la tinción de las diecisiete muestras restantes con Alexa Fluor 488, los pasos a seguir serán los mismos con dos diferencias:

Día 1, paso VI: Se empleará suero de mono (NDS, D9663-10ML) en concentración 1:100 en lugar de NGS.

Día 2, paso II: Se empleará Alexa Fluor 488 diluido en PBS 0.1M en proporción 1:600 en lugar de Alexa Fluor 647 diluido en PBS 0.1M en proporción 1:200.

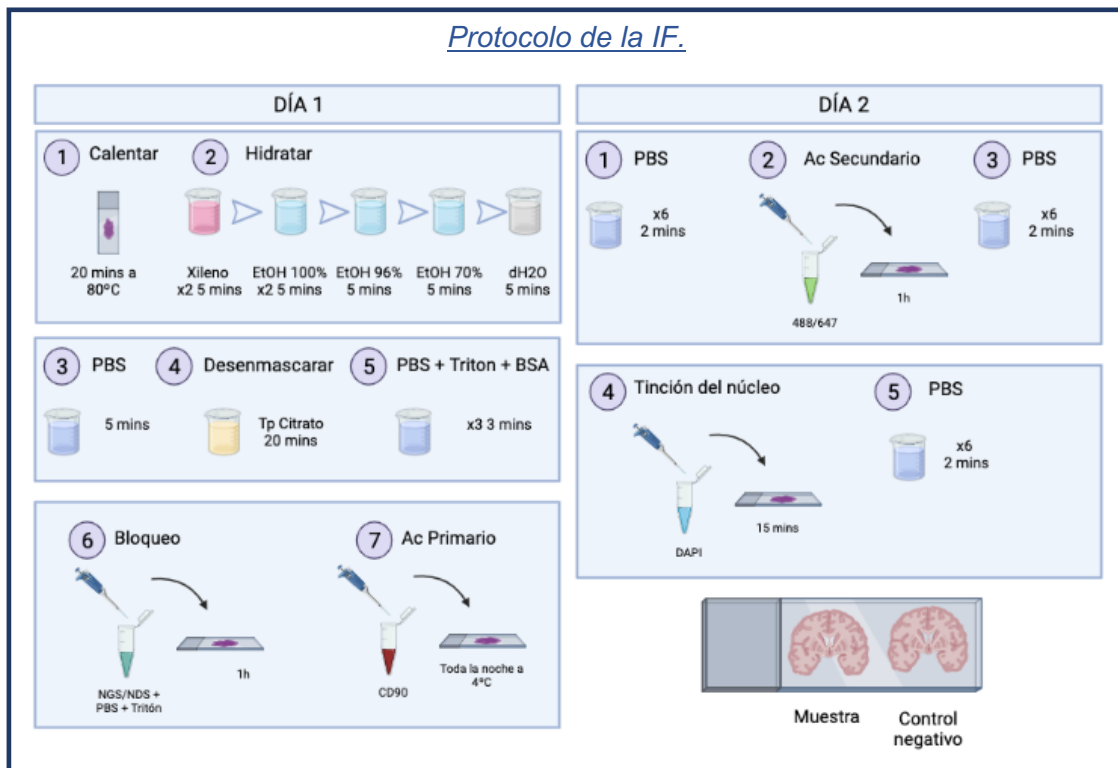
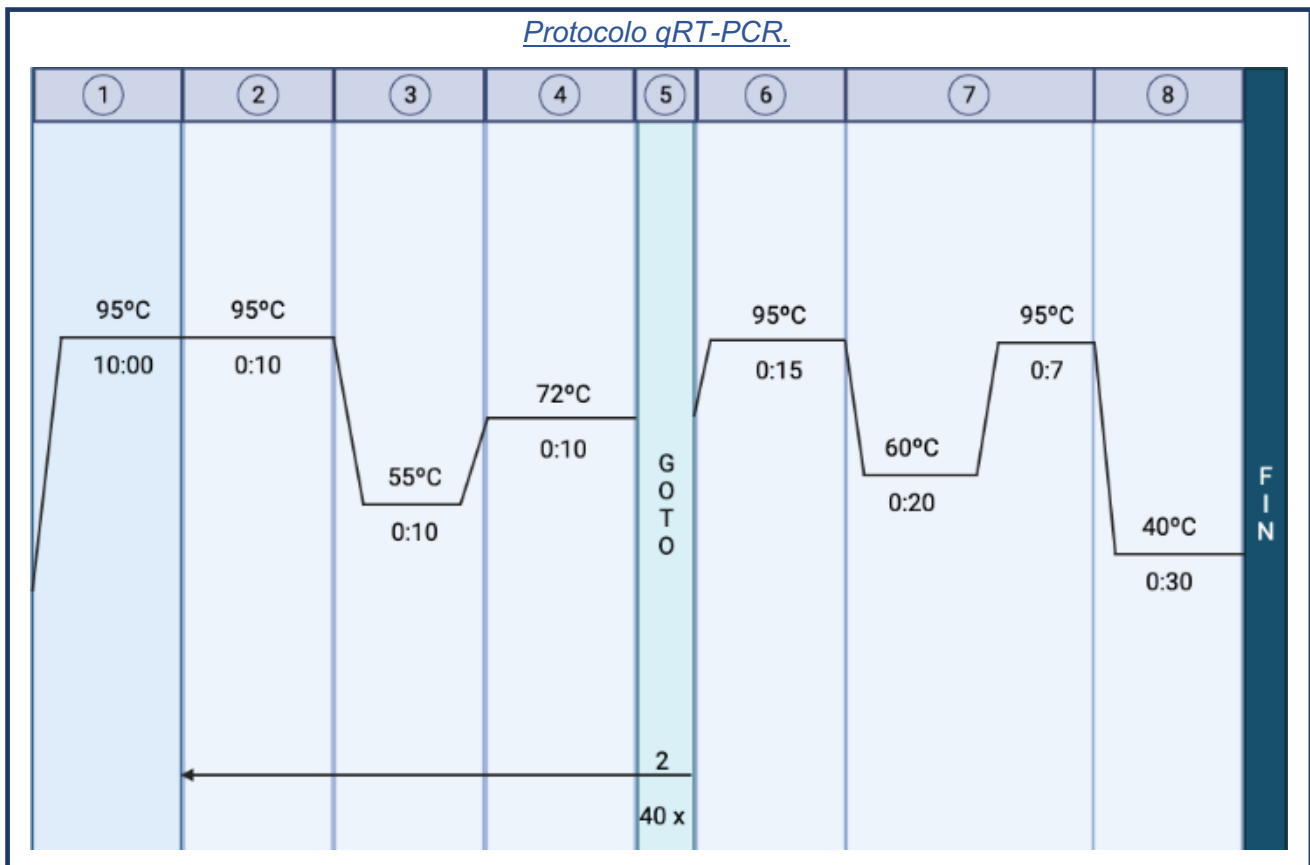


Figura 2: Protocolo esquematizado del proceso de IF. Los pasos del esquema resumen los pasos redactados anteriormente. No viene especificado el paso VI del día 2.

La IF se cuantificó con el programa *Image J*. Para ello se llevaron a cabo 8 fotografías aleatorias de cada muestra y 8 fotografías aleatorias de los controles negativos. Posteriormente se marcaron los vasos sanguíneos de cada imagen y se calculó su intensidad.

### 3.4. qRT-PCR

Se analizó la expresión de los genes *CD90*, *CD31*, *CD133*, *CD44* y *OCT3/4*. Se preparó una mastermix con 3,6 µl de H<sub>2</sub>O DEPC (BP2484-100 Fisher BioReagents), 5 µl de SybrGreen (Takara TB green premix ex taq 2x Tli RNaseH Plus, Bulk), 2 µl de ADNc y 0,8 µl de primers por pocillo. La solución de 0,8 µl de primers contiene tanto el primer forward como el reverse. Como gen de referencia se empleó *β-Actina*.



*Figura 3: Protocolo a seguir para la ejecución de la qRT-PCR. Tiempo estimado de 1 hora y 32 minutos.*

Primers forward y reverse de cada gen.

*Tabla 2: Secuencias de los primers empleados en la qRT-PCR de los genes CD90, CD31, CD133, CD44 y OCT3/4. (Fw) Secuencia del primer forward. (Rv) Secuencia del primer reverse.*

Gen	Primer	Referencia	Secuencia
CD90	Fw	AASh-0073	CGCTCTCCTGCTGCTAACAGTCTT
	Rv	AASh-0074	CAGGCTGAACTCGTACTGGA
CD133	Fw	AASh-0908	GGAAACTAAGAAGTATGGGAGAACA
	Rv	AASh-0909	CGATGCCACTTTCTCACTGAT
CD44	Fw	AASh-0910	CAACAACACAAATGGCTGGT
	Rv	AASh-0911	CTGAGGTGTCTGTCTCTTTACTCT
OCT3/4	Fw	AASh-0067	CAAAAACCCTGGCACAACACT
	Rv	AASh-0068	CCTGTCTCCGTCACCACTCT
CD31	Fw	AASh-0334	TGTGCTCATCATGCTCTGTG
	Rv	AASh-0335	ACGCTTGTACACTGCTTTG
$\beta$ -Actina	Fw	AASh-0477	CATCCCCCAAAGTTCACAAT
	Rv	AASh-0478	ATGGCAAGGGACTTCCTGTA

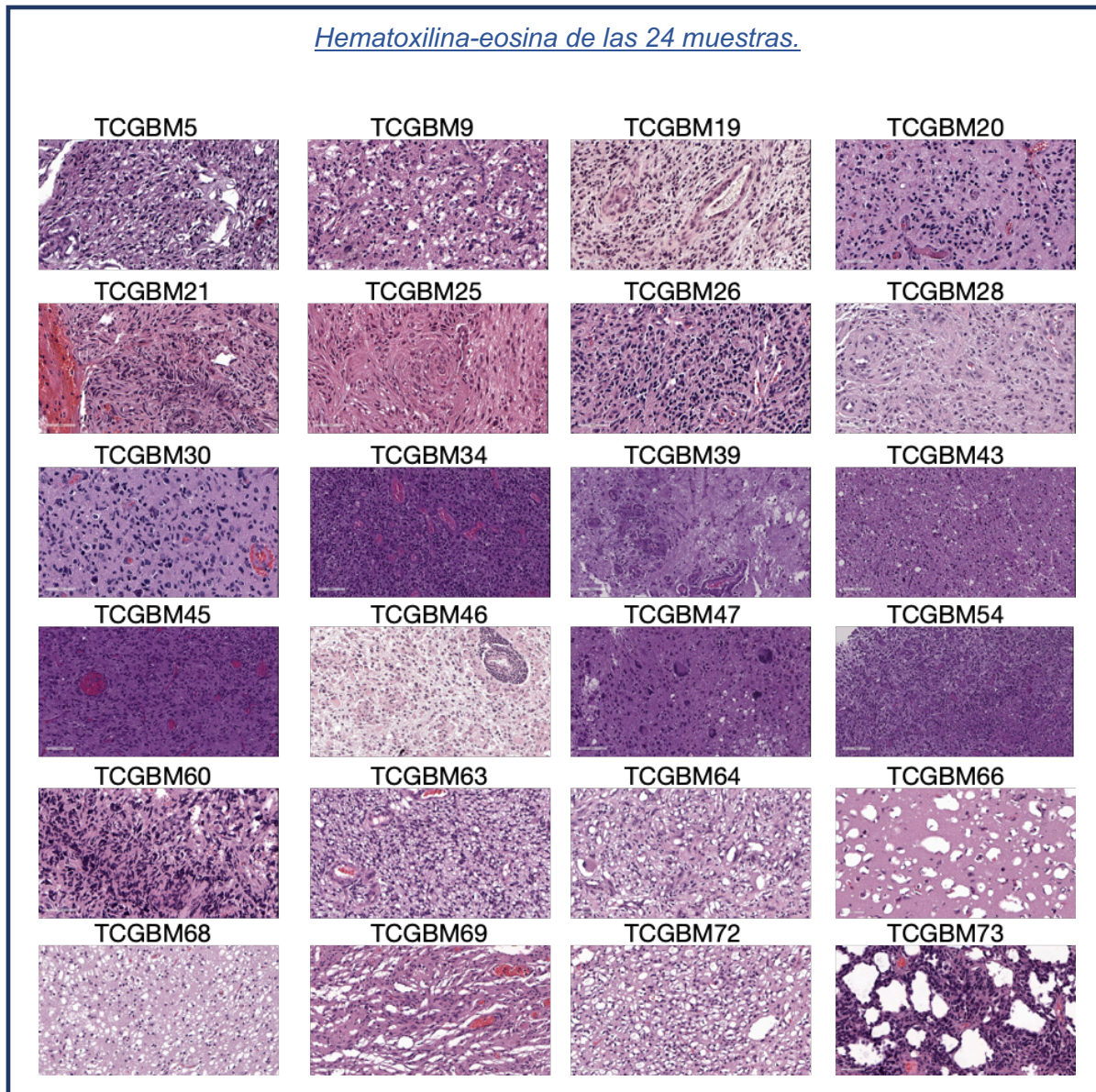
### 3.5. Normalización de datos obtenidos por qRT-PCR e IF

Para normalizar ambos datos en un único valor por muestra en una escala numérica del 1 al 0, primero calculamos la media de los valores obtenidos por ambas técnicas para cada muestra, de manera que para una muestra tendremos dos valores, el obtenido por qRT-PCR y el obtenido por IF. En segundo lugar, restamos el valor mínimo obtenido mediante cada técnica. Es decir, a los valores obtenidos mediante qRT-PCR restamos el menor de ellos. De igual manera sucede con los valores de la IF. A estos valores obtenidos, los dividimos por el mayor de ellos. Como resultado, para cada muestra obtuvimos dos valores, uno por técnica, comprendidos entre el 0 y el 1. A continuación, calculamos el promedio de ambos valores, quedando así un único valor representativo de ambas técnicas para cada muestra.

#### 4. Resultados

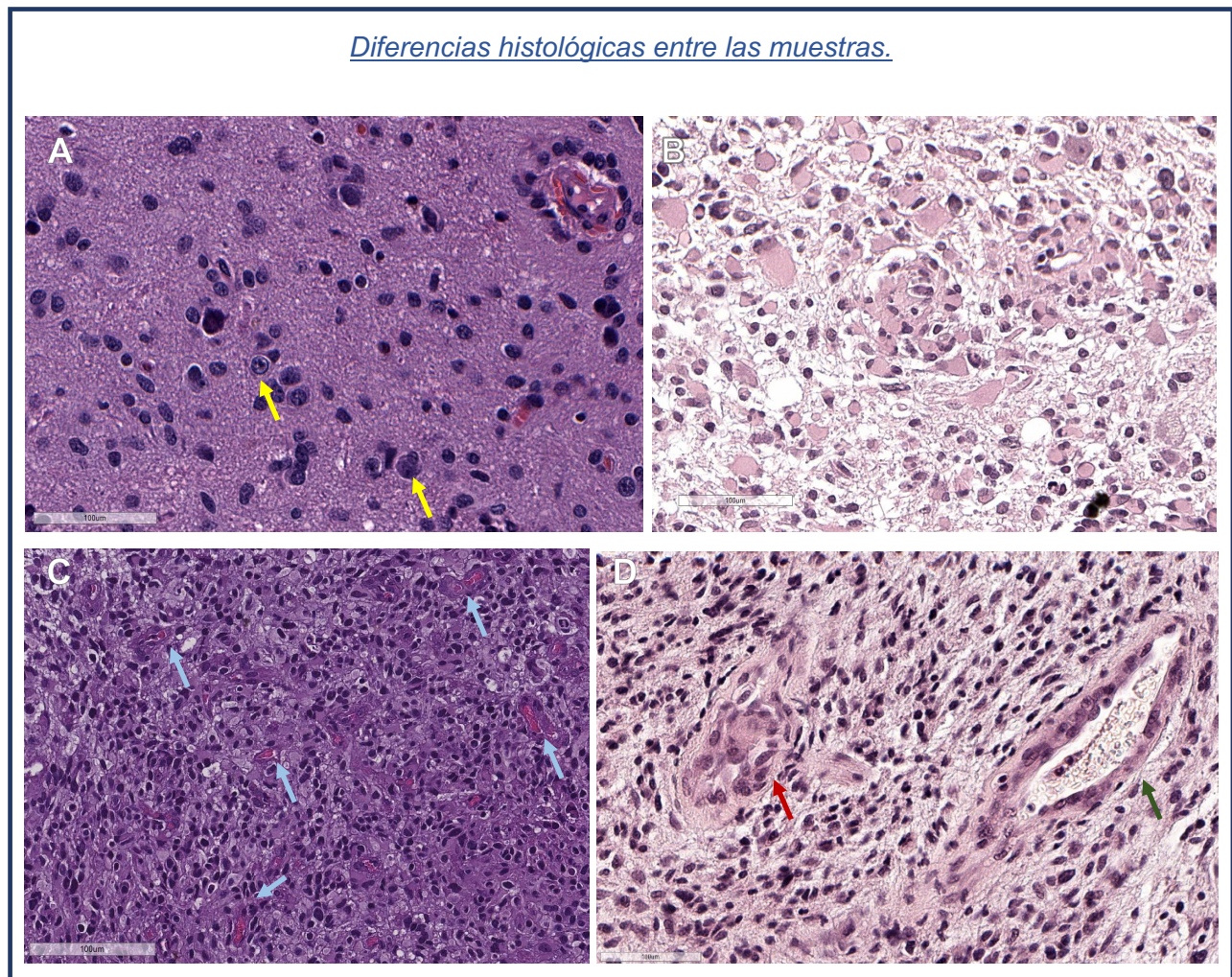
##### 4.1. El total de las muestras analizadas tenían características neoplásicas.

En primer lugar, para establecer la cohorte de pacientes con GB, se llevó a cabo un análisis de las H&E de las 24 muestras (Figura 4).



*Figura 4: Hematoxilina-eosina a 20X. Nótese las diferencias histológicas entre las muestras. TCGBM 66, TCGBM 68, TCGBM69, TCGBM 72 y TCGBM73 presentan numerosas zonas necróticas.*

Mediante la H&E se confirmó que todas las muestras eran tumorales (Figura 5A). Se observó que cada muestra presentaba una histopatología diferente (Figura 4, 5A, 5B, 5C y 5D), consecuencia de la heterogeneidad tumoral. Se encontraron muestras con alto porcentaje de células como son TCGBM 5 y TCGBM 26, muestras con muy pocas células y mayor matriz como es TCGBM 66 y muestras que, dada la agresividad del tumor, presentaban mayoritariamente zonas necróticas como TCGBM 68 (Figura 4) y TCGBM 46 (Figura 5B). También observamos que las zonas hemorrágicas eran abundantes y el número, tamaño y la forma de los vasos sanguíneos variaban (Figura 5C y 5D).



*Figura 5: Hematoxilina-eosina a 20X. (A) TCGBM 21, ejemplo de tejido tumoral donde las dos flechas amarillas están señalando dos células malignas. (B) TCGBM 46, ejemplo de tejido tumoral necrótico. (C) TCGBM 54, ejemplo de tejido tumoral con numerosos vasos sanguíneos de pequeño tamaño. Las flechas azules señalan 5 pequeños vasos. (D) TCGBM 19, ejemplo de*

tejido tumoral con dos grandes vasos sanguíneos. La flecha roja señala un vaso de estructura glomerular mientras que la flecha verde señala un vaso de estructura tubular.

#### 4.2. Los varones presentan una mayor incidencia de GB y mayor edad media pero una mayor supervivencia en nuestra cohorte.

A continuación, se estudió la cohorte empleada. En primer lugar, dado que estudios anteriores habían afirmado que el GB era más común en hombres que en mujeres, analizamos si esto se cumplía en nuestra cohorte. Nuestros resultados mostraron que el 71% de los pacientes con GB eran varones, frente al 29% que eran mujeres (Figura 6). En segundo lugar, calculamos la edad media a la que se había diagnosticado el glioma. Esta resultó ser de 49 años. De la misma manera, calculamos la media de edad de aparición distinguiendo hombres de mujeres. Observamos que, en nuestra cohorte, la edad media en mujeres era de 42 años, mientras que en hombres era de 56 años. Por tanto, el tumor cerebral presenta una mayor incidencia en hombres que en mujeres, pero la edad de aparición en mujeres es más temprana que en hombres.

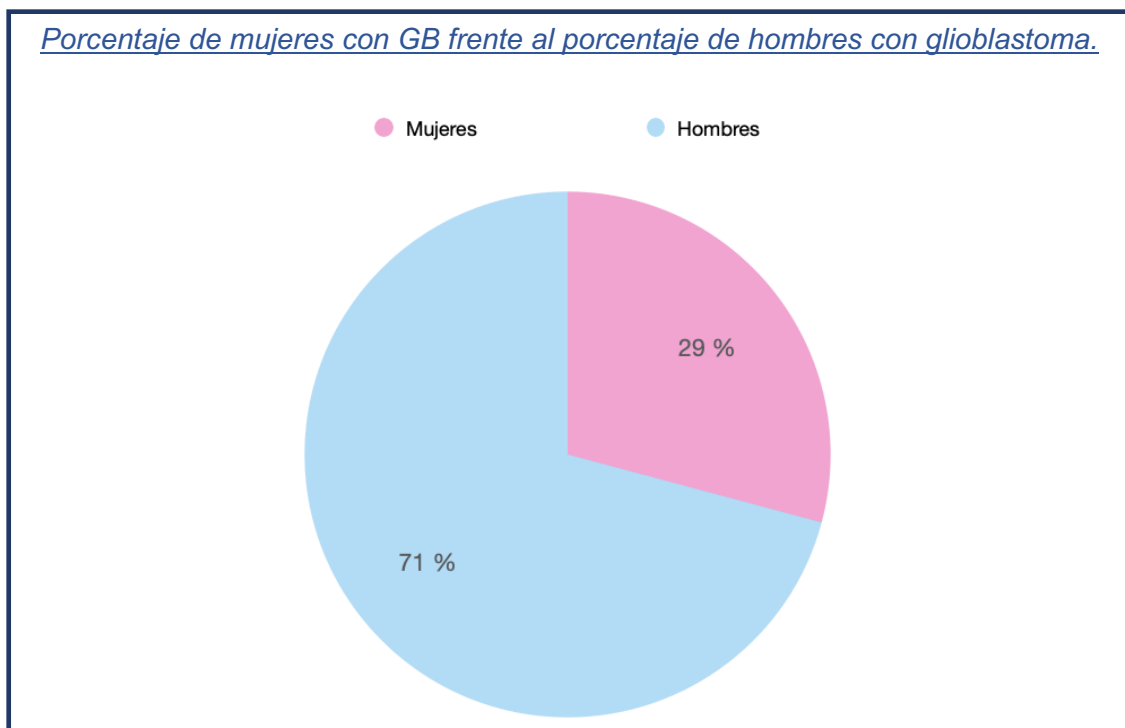


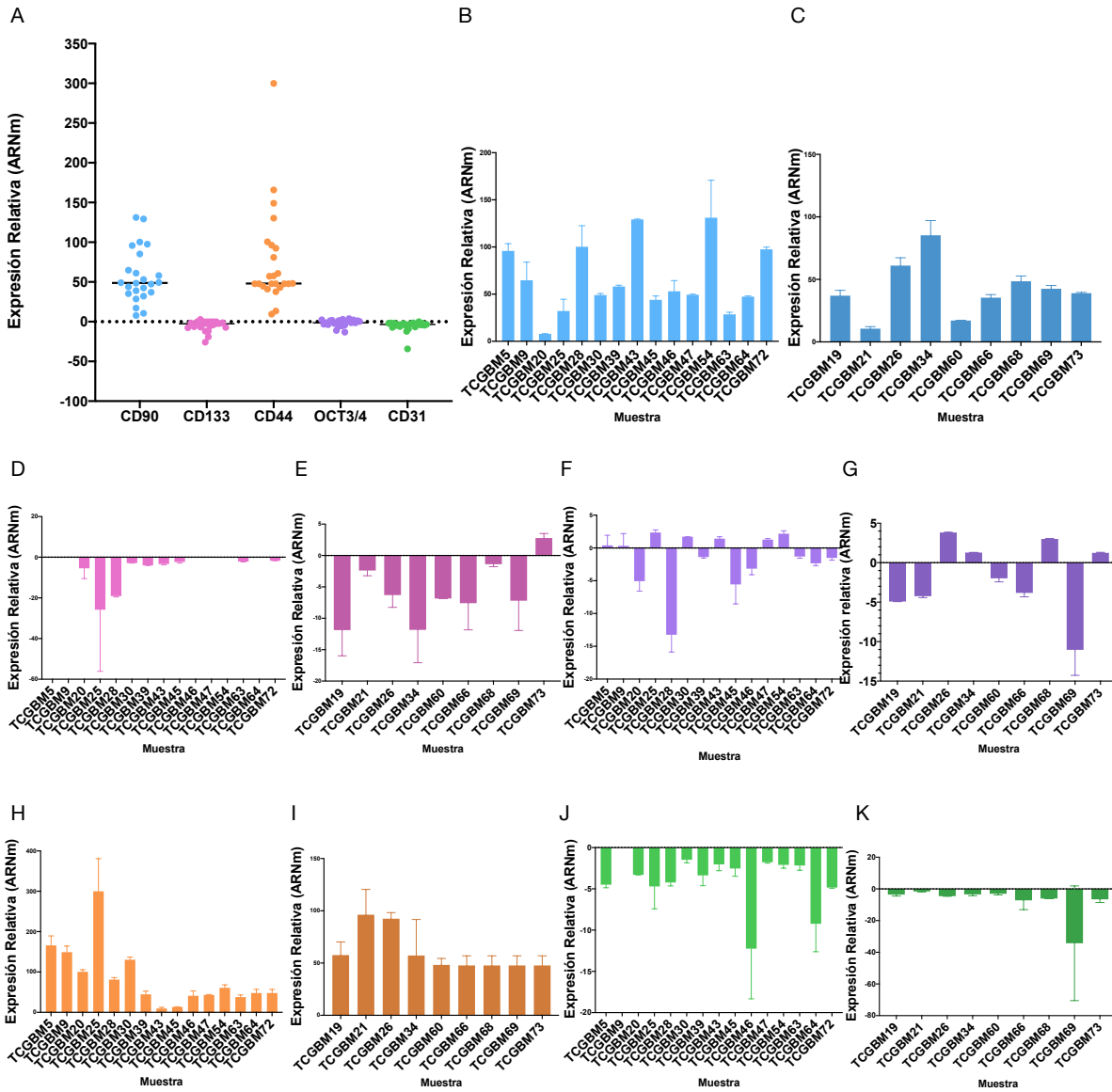
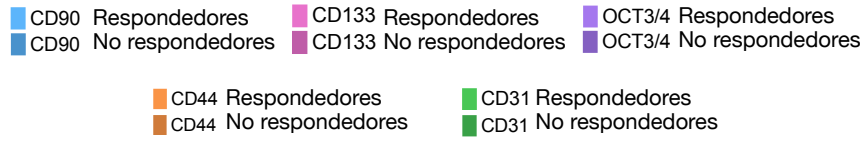
Figura 6: Esquema circular del porcentaje de hombres y mujeres enfermos de nuestra cohorte de pacientes.

Por otro lado, observamos que el 71% de las mujeres con tumor cerebral presentaban GB frente a otros gliomas de menor grado. De la misma manera, el 70% de los hombres con glioma presentaban GB frente a otros de menor grado. También observamos que la edad media de aparición del tumor variaba según el grado. De manera que, en mujeres, la edad media de diagnóstico del GB era de 32,8 años, frente a 44 años si el tumor era de menor grado. En hombres observamos que la edad media de diagnóstico del GB era de 60 años y de 48,6 años si se trataba de gliomas de grado II y III. Además, analizamos los meses de supervivencia y, en conjunto, los hombres de nuestra cohorte tienden a sobrevivir más meses que las mujeres. En concreto, los varones diagnosticados de GB tienen una supervivencia media de 13 meses frente a los 6,3 meses de las mujeres. Si el diagnóstico es de un glioma de menor grado, ambas tasas de supervivencia aumentan, siendo de 25 meses en hombres y de 20 meses en mujeres.

#### **4.3. Todas las muestras de GB expresaban *CD90* y alta heterogeneidad de genes de CSCs.**

A continuación, con el fin de analizar la expresión de *CD90* en la cohorte, llevamos a cabo una qRT-PCR de las 24 muestras para los genes *CD90*, *CD133*, *CD44*, *OCT3/4* y *CD31* (Figura 7A). Como gen de referencia empleamos  $\beta$ -*Actina*. Las muestras que presentaban mayor expresión de *CD90* fueron TCGBM 43 y TCGBM 54, con unos niveles relativos de expresión cercanos de 129 y 131, respectivamente. Estas muestras, además, fueron obtenidas a partir de pacientes que habían sido buenos respondedores a la dexametasona. Sin embargo, la muestra TCGBM 20, también del grupo de los respondedores, presentó los menores niveles de *CD90* con un valor de 7,8. La muestra TCGBM 21, perteneciente al grupo de los no respondedores, fue la siguiente con menores niveles de expresión, siendo estos de 10,55 (Figura 7B, 7C). El resto de los genes presentaron patrones de expresión irregulares (Figura 7D, 7E, 7F, 7G, 7H, 7I, 7J, 7K). Además, también se analizaron las diferencias de expresión entre hombres y mujeres sin hallar datos significativos. Por último, no se observó ninguna correlación entre los genes. Las muestras presentaban patrones de expresión muy diferentes y, aún así, todas expresaban *CD90* y los marcadores de CSCs *CD44* y *OCT3/4* (Tabla 3). En nuestra cohorte no observamos que los pacientes con mayor grado de glioma fueran aquellos con mayores niveles de ARNm de *CD90*.

*Expresión de CD90, CD133, CD44, OCT3/4 y CD31.*



*Figura 7: qRT-PCR de la cohorte. (A) Esquema resumen de la expresión relativa de los genes CD90, CD133, CD44, OCT3/4 y CD31 en las 24 muestras. La media de la expresión relativa de cada gen viene representada por una línea negra. (B) Expresión relativa de CD90 en las muestras*

obtenidas de pacientes respondedores. (C) Expresión relativa de CD90 en las muestras obtenidas de pacientes no respondedores. (D) Expresión relativa de CD133 en las muestras obtenidas de pacientes respondedores. (E) Expresión relativa de CD133 en las muestras obtenidas de pacientes no respondedores. (F) Expresión relativa de OCT3/4 en las muestras obtenidas de pacientes respondedores. (G) Expresión relativa de OCT3/4 en las muestras obtenidas de pacientes no respondedores. (H) Expresión relativa de CD44 en las muestras obtenidas de pacientes respondedores. (I) Expresión relativa de CD44 en las muestras obtenidas de pacientes no respondedores. (J) Expresión relativa de CD31 en las muestras obtenidas de pacientes respondedores. (K) Expresión relativa de CD31 en las muestras obtenidas de pacientes no respondedores.

Una vez obtuvimos las expresiones relativas de los diferentes genes, agrupamos los datos según si estos genes se expresaban o no y caracterizamos el tejido de las 24 muestras.

#### Caracterización de los 24 tejidos.

**Tabla 3:** Caracterización de las muestras según los genes que expresa. (+) Gen expresado en dicha muestra. (-) Gen no expresado por la muestra.

Muestra	CD31	CD90	CD133	CD44	OCT3/4	Diagnóstico
TCGBM5	+	+	-	+	+	Glioblastoma, grado IV
TCGBM9	-	+	-	+	+	Glioblastoma, grado IV
TCGBM19	+	+	+	+	+	Glioblastoma, grado IV
TCGBM20	+	+	+	+	+	Glioblastoma, grado IV
TCGBM21	+	+	+	+	+	Glioblastoma, grado IV
TCGBM25	+	+	+	+	+	Glioblastoma, grado IV
TCGBM26	+	+	+	+	+	Glioma, grado III
TCGBM28	+	+	+	+	+	Glioblastoma grado IV
TCGBM30	+	+	+	+	+	Glioblastoma grado IV
TCGBM34	+	+	+	+	+	Glioblastoma grado IV
TCGBM39	+	+	+	+	+	Glioblastoma grado IV
TCGBM43	+	+	+	+	+	Glioma grado III
TCGBM45	+	+	+	+	+	TCGBM18 recurrente

TCGBM46	-	+	-	+	+	Glioma, grado III
TCGBM47	+	+	-	+	+	TCGBM30 recurrente
TCGBM54	+	+	-	+	+	Glioblastoma, grado IV
TCGBM60	+	+	+	+	+	Glioblastoma, grado IV
TCGBM63	+	+	+	+	+	Glioblastoma, grado IV
TCGBM64	+	+	-	+	+	Gliosarcoma, grado IV
TCGBM66	+	+	+	+	+	Glioblastoma, grado IV
TCGBM68	+	+	+	+	+	Glioma, grado II
TCGBM69	+	+	+	+	+	Glioblastoma, grado IV
TCGBM72	+	+	+	+	+	Glioma grado II.
TCGBM73	+	+	+	+	+	Glioblastoma grado IV

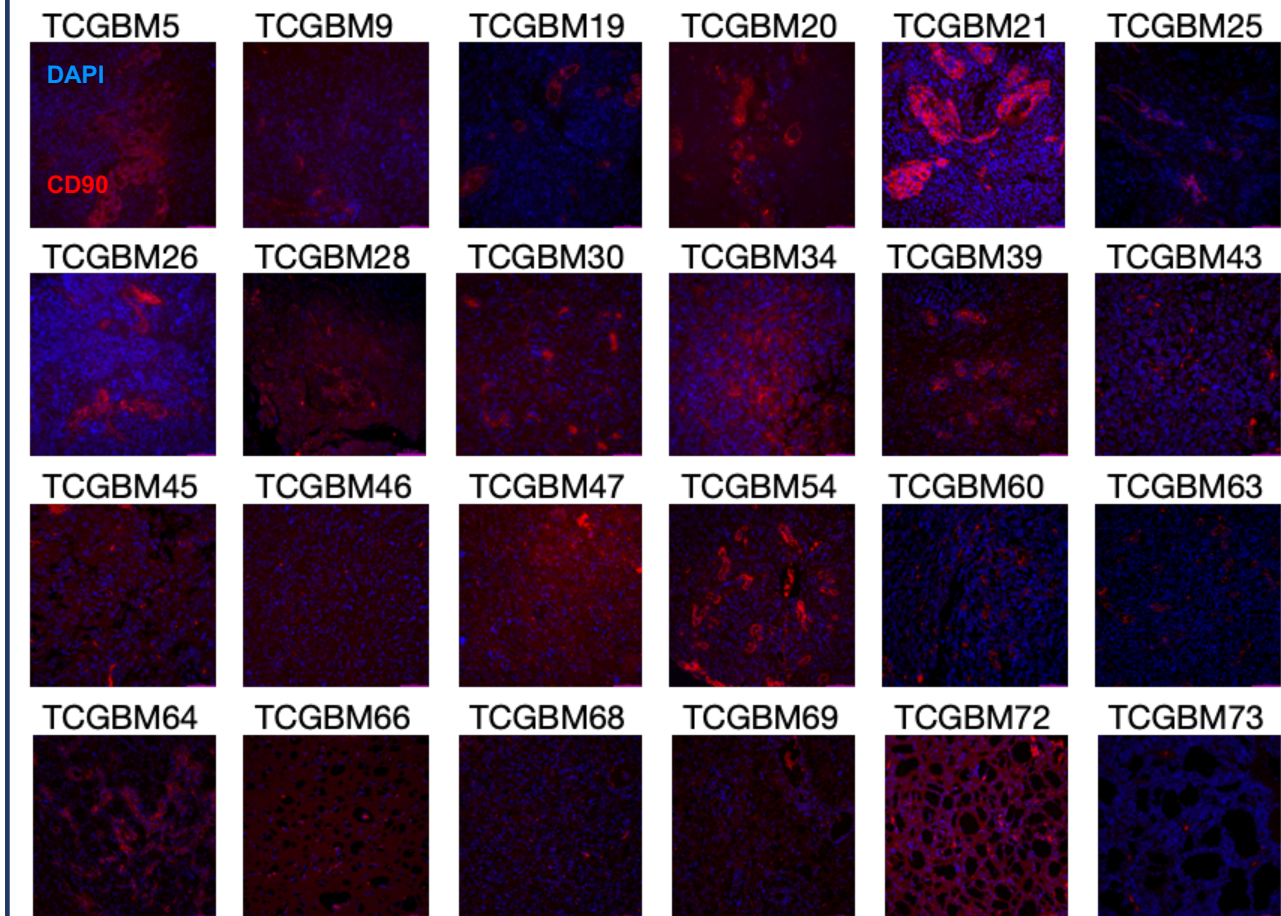
El 100% de las muestras expresaban *CD90*, *CD44* y *OCT3/4*. El 8,33% de los tejidos fueron negativos para el marcador de endotelio *CD31* y, además, estas fueron negativas también para *CD133*. El 25% de las muestras fueron negativas para *CD133*.

#### 4.4. Existen diferencias morfológicas y genéticas entre los vasos CD90+ y CD90-.

Para llevar a cabo nuestro segundo objetivo, en primer lugar, tuvimos que analizar la expresión de CD90 en las 24 muestras mediante IF. De esta manera, pudimos analizar la relación entre los niveles de CD90 a nivel de proteína, así como a nivel de ARNm, con la respuesta a dexametasona.

La inmunofluorescencia en los tejidos de GB confirmó que CD90 marca los vasos sanguíneos (Figura 8). Además, tras la cuantificación, observamos que aquellas muestras que habían presentado mayores niveles de intensidad de CD90, como es TCGBM21 (Figura 8 y 9B), también tenían mayor número de vasos sanguíneos y estos, a su vez, eran de mayor tamaño. Sin embargo, no está claro el tipo celular que CD90 marca, puesto que tan solo vemos que forma parte de la estructura vascular. Además, pudimos observar que existían vasos que no se marcaban con CD90, incluso en la misma muestra, como sucede en TCGBM 39 (Figura 9A).

Inmunofluorescencia.

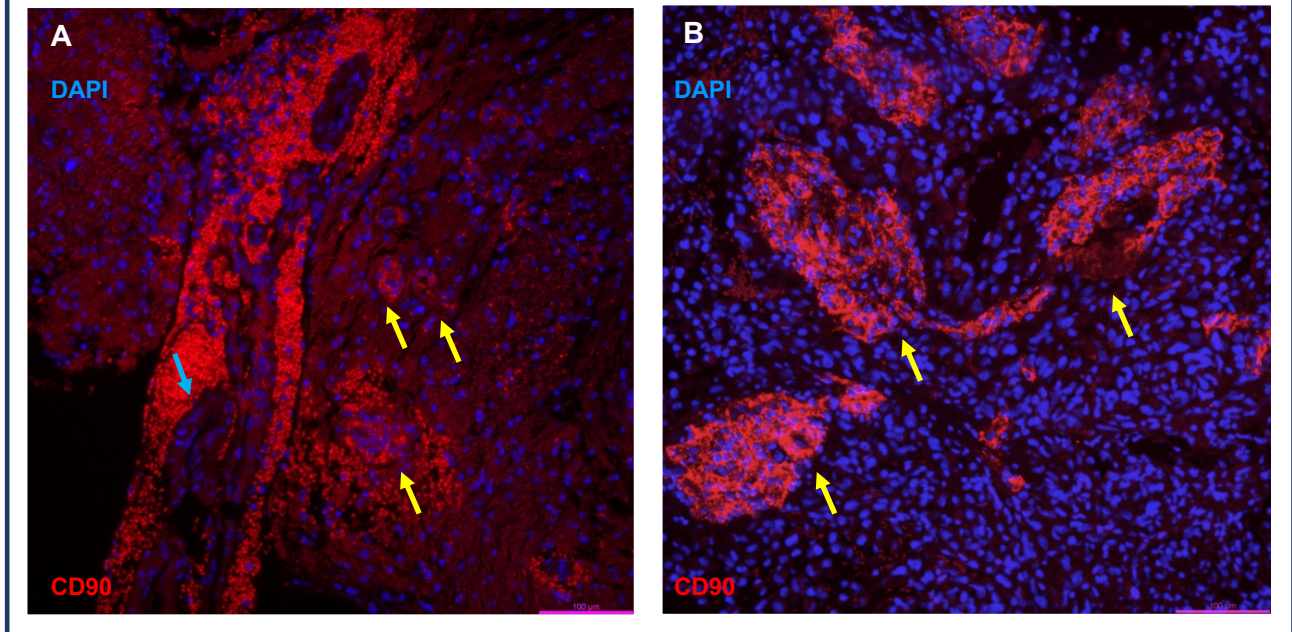


*Figura 8: Inmunofluorescencia a 20X de las 24 muestras.*

Por otro lado, también observamos diferencias morfológicas entre los vasos sanguíneos CD90+ y CD90-. Los vasos CD90+ presentan estructuras glomerulares, sin un lumen definido (Figura 9B), mientras que los vasos CD90- tienen estructuras tubulares (Figura 9A).

También quisimos estudiar con estos datos si los pacientes de nuestra cohorte con mayores niveles de CD90 eran aquellos con un diagnóstico de GB. Observamos que los tejidos con un diagnóstico de glioma de menor grado correspondían a las muestras con menores niveles de señal CD90+, a excepción de la muestra TCGBM 26 que presentó una elevada señal para CD90.

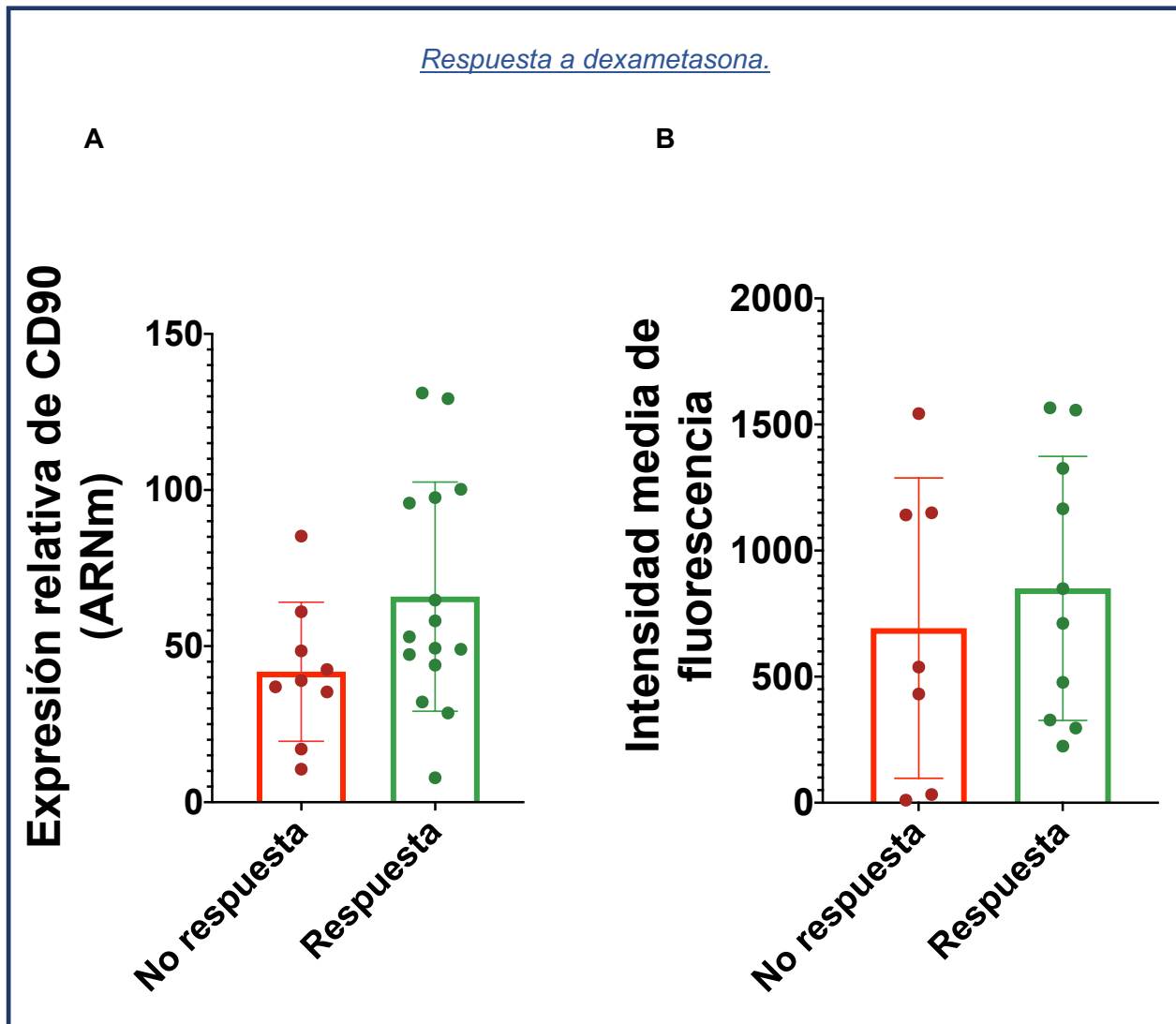
TCGBM 39 y TCGBM 21. Diferencias entre los vasos que CD90 marca y los que no.



*Figura 9: Inmunofluorescencia de TCGBM 39 y TCGBM 21 a 20X. (A) TCGBM 39. Las tres flechas amarillas señalan tres vasos marcados por CD90. La flecha azul señala una parte de un gran vaso central negativo para CD90. (B) TCGBM 21. Las tres flechas amarillas señalan tres grandes vasos CD90+.*

#### **4.5. Los respondedores tienden a tener mayores niveles de CD90.**

A continuación, se llevó a cabo una t-Student para analizar la relación existente entre los pacientes con mayores niveles de expresión de CD90 y la respuesta a dexametasona. Aunque no obtuvimos datos significativos, observamos que los respondedores tienden a tener mayores niveles de CD90. Este estudio lo llevamos a cabo primero con los datos obtenidos mediante la qRT-PCR (Figura 10A) y, después, con la intensidad obtenida en la cuantificación de la IF (Figura 10B). Para llevar a cabo este análisis, retiramos de la cuantificación de la IF aquellas muestras cuyo tejido estaba dañado, mal parafinado o necrótico. Estas fueron TCGBM 43, TCGBM 45, TCGBM 46, TCGBM 47, TCGBM 66, TCGBM 69 Y TCGBM 72. Los resultados no fueron significativos.

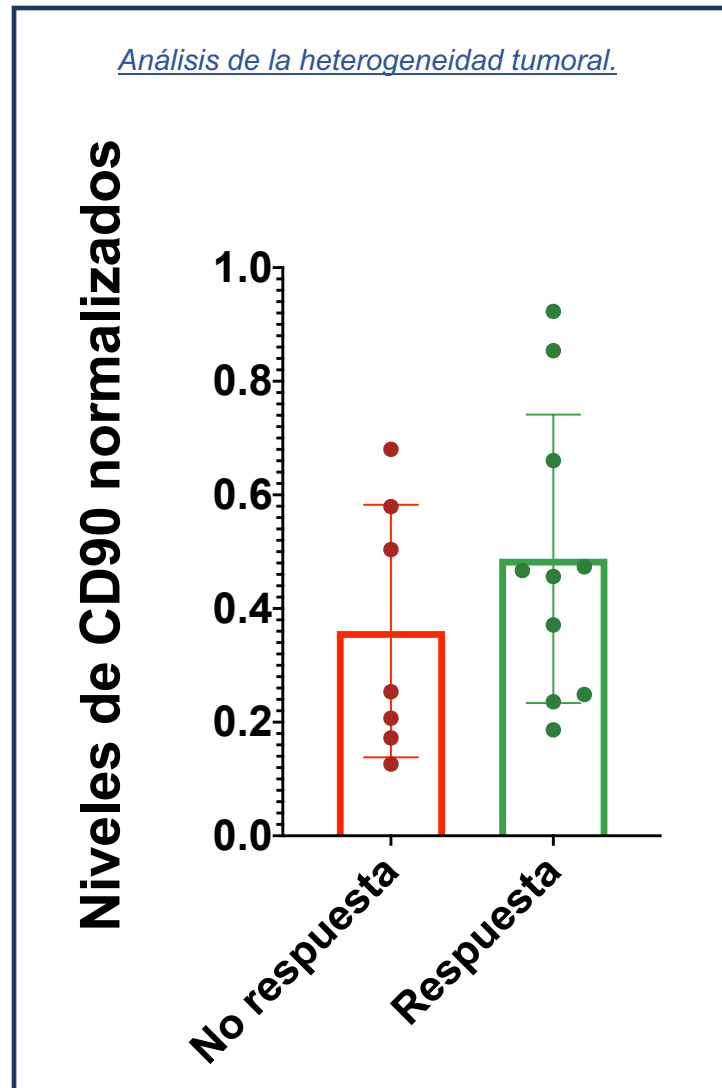


*Figura 10: Relación entre niveles de CD90 y la respuesta a dexametasona. (A) La relación entre el ARNm de CD90 y la respuesta a dexametasona no fue significativa con un  $p$ -valor = 0,09. (B) La relación entre la intensidad de fluorescencia y la respuesta a dexametasona no fue significativa con un  $p$ -valor = 0,5.*

**4.6. Debido a la alta heterogeneidad no existe correlación entre los niveles de CD90 obtenidos mediante qRT-PCR y la IF.**

Teniendo en cuenta la heterogeneidad tumoral que presenta el GB, decidimos analizar, una vez se obtuvieron los niveles de CD90 mediante ambas técnicas, la correlación entre ellos. Los resultados mostraron que no existía correlación entre dichos datos.

Por este motivo, decidimos unificar los datos obtenidos de cada paciente mediante la IF y la qRT-PCR. Para ello normalizamos los valores en una escala del 0 al 1. A continuación, se analizó la relación existente de estos nuevos niveles de CD90 con la respuesta a dexametasona (Figura 11).



*Figura 11: Relación no significativa entre los niveles de CD90 y la respuesta a dexametasona con  $p$ -valor = 0,3.*

Los resultados mostraron que no existía significancia entre los niveles de CD90 y la respuesta a dexametasona. Sin embargo, el  $p$ -valor era menor que el obtenido mediante IF.

## 5. Discusión y Conclusiones

El estudio de la biología tumoral del GB es de vital relevancia para mejorar el abordaje del tratamiento de los pacientes. En nuestra cohorte, pudimos observar que el GB tiene mayor incidencia en hombres que en mujeres. Sin embargo, la edad media del diagnóstico en mujeres es inferior a la de los hombres. Además, observamos que, frente a estudios anteriores que establecieron la edad media de inicio del GB en 65 años (Ostrom et al., 2020), nuestra cohorte presentaba una edad media de 49 años. Aunque no se tiene certeza de las posibles causas de este descenso en la edad de aparición, algunos estudios indican que puede deberse a un incremento en la exposición a radiaciones, como las producidas por los teléfonos móviles (Omuro & DeAngelis, 2013). También observamos que los hombres presentan una mayor supervivencia que las mujeres ante los gliomas. Esto difiere de otros estudios que han afirmado que las mujeres tienen una mayor supervivencia en este tipo tumoral y en otros tumores cerebrales, debido a mayores niveles de estrógenos (Ostrom et al., 2018; Trifiletti et al., 2017). Este sesgo podría deberse a que el tamaño muestral empleado sea demasiado pequeño, o que en la zona del levante español exista esta tendencia.

Por otro lado, al analizar los diferentes genes que nuestra cohorte expresaba, observamos que existía una gran variabilidad. Es decir, el GB es un tumor con una alta heterogeneidad genética. Sin embargo, y en contraposición con otros estudios, en nuestra cohorte, las muestras con mayores niveles de ARNm de *CD90* no coincidieron con los gliomas de mayor grado. Por otro lado, no se encontraron diferencias en la expresión de genes de CSCs, endotelio y *CD90* entre mujeres y hombres, con lo que las diferencias observadas a nivel de incidencia, edad y supervivencia no deben estar ligadas a estos genes. En cuanto a la falta de correlación entre los genes, podríamos atribuir este resultado a la heterogeneidad tumoral, ya que, si cada región del tumor presenta unos patrones de expresión diferentes, no se va a poder encontrar relación entre ellos.

Todas las muestras tumorales fueron CD90+. Sería interesante aumentar la muestra con pacientes no tumorales y comprobar si correlaciona con los estudios que afirman que los pacientes con gliomas presentan mayores niveles de CD90 que los pacientes sanos. En caso afirmativo podría estudiarse CD90 como marcador tumoral o marcador pronóstico de glioma. Además, atendiendo al controvertido rol de CD90 como marcador de CSCs, nuestros resultados

muestran que existen poblaciones CD90+/CD44+, CD90+/OCT3/4+ y CD90+/CD133+. Esto sugiere que CD90 puede emplearse también como marcador de CSCs. Sin embargo, también es cierto que del mismo modo que otros estudios (He et al., 2012), nosotros encontramos poblaciones CD90+/CD133-. Esto puede indicar que CD90 marca CSCs con características diferentes a las marcadas por CD133. Todo esto apoya aún más que CD90 esté mayormente expresado en tejido tumoral frente a tejido sano. También se analizó la relación entre CD90 y el marcador de endotelio CD31. Dado que hay diversos estudios que clasifican a CD90 como marcador de CSCs, endotelio y pericitos (Yuasa et al., 2013), cabe pensar que las poblaciones CD90+ deberían ser CD31+. Sin embargo, nuestros resultados muestran que existen poblaciones CD90+/CD31-. Esto implica que CD90 marca otros tipos celulares constituyentes de los vasos diferentes al endotelio o un tipo de endotelio diferente al marcado por CD31. En este caso sería interesante llevar a cabo una nueva tinción contra CD90, CD31 y otros marcadores vasculares de endotelio, pericitos y músculo liso para analizar su posible colocalización.

Las imágenes obtenidas a partir de la inmunofluorescencia mostraron que a mayores niveles de CD90, mayor era el número de vasos de la muestra y mayor era su tamaño. También corroboramos que CD90 marca vasos sanguíneos, aunque no determinamos el tipo celular concreto. Además de observar que CD90 marca vasos, también observamos que no los marca todos. Es decir, hallamos vasos CD90+ y vasos CD90-, lo que implica que deben existir diferencias genéticas entre vasos. Profundizando en ello, encontramos además, diferencias morfológicas entre ellos. Mientras que los vasos CD90- presentaban estructuras tubulares, los vasos CD90+ tenían estructuras glomerulares, típicas de los vasos tumorales. Ante este hallazgo sería interesante analizar la funcionalidad de estos vasos, así como estudiar la función de CD90 en el cambio morfológico del vaso. Teniendo esto en cuenta, CD90 podría ser un potencial marcador de vasos sanguíneos tumorales procedentes del proceso de angiogénesis. Además, sería conveniente analizar la posibilidad de que CD90 marque pericitos tumorales en lugar de pericitos sanos, puesto que estos últimos, suelen ser menos abundantes en vasos tumorales.

Los datos obtenidos a partir de la IF también nos permitieron corroborar la teoría de que los pacientes con GB presentarían mayores niveles de CD90 que aquellos diagnosticados con grados más leves de glioma, a diferencia de los datos obtenidos mediante el estudio del ARNm. En nuestra cohorte observamos que las muestras con menor señal de fluorescencia procedían de pacientes que tenían un glioma de menor grado, a excepción de la muestra TCGBM26. Esta

contraposición a los resultados obtenidos mediante qRT-PCR puede deberse a que justamente las muestras empleadas para la IF de los pacientes con menor grado de glioma presentaban un tejido más acelular y necrótico, posiblemente por un mal proceso de fijamiento. Por otro lado, la diferencia puede deberse a que la muestra de ADNc empleada en la qRT-PCR no procediese únicamente de tejido tumoral, sino que también procediese de tejido sano. Esto, además, puede explicar la falta de correlación entre los niveles de CD90 obtenidos por IF y qRT-PCR. Una de las opciones para minimizar este error sería aumentar la n de pacientes.

En lo referente a la variación en la respuesta a dexametasona según los niveles de CD90, observamos que el p-valor obtenido cuando la relación se calculó con los datos de la qRT-PCR era menor que cuando se calculó a partir de los datos de la IF. Esto puede ser consecuencia de la heterogeneidad tumoral, de modo que al estudiar en la IF una superficie tan pequeña del tumor, esta no resulte representativa de su totalidad y, por tanto, difiera de los resultados de la qRT-PCR, que al emplear ADNc de una mayor región cerebral, puede ser más representativa. Por otro lado, cabe destacar que al normalizar los datos obtenidos en la qRT-PCR y la IF, el p-valor obtenido fue menor que el calculado únicamente con los datos de la IF. Por tanto, podemos afirmar, que la heterogeneidad tumoral es susceptible de causar errores de análisis y que, en consecuencia, es necesario minimizarla en la medida de lo posible, por ejemplo, aumentando la cantidad de muestra. Sin embargo, a expensas de esta diversidad celular en el tumor, la tendencia que presentaban los respondedores de tener mayores niveles de CD90 se vio a nivel de ARNm tanto como a nivel de proteína e incluso en la normalización de ambos datos. Dado que, en estudios anteriores con una muestra de 58 pacientes la relación sí que fue significativa, esperamos que un aumento de los pacientes suponga mejorar el p-valor y obtener resultados significativos.

Por último, nos planteamos en próximos estudios analizar el descenso de leucotrienos y prostaglandinas que produce la dexametasona y comparar estos entre los respondedores y no respondedores. Así como buscar la posible relación de este descenso con los niveles de CD90.

Ante esto, cabe señalar que la vía de obtención de la muestra va a determinar en gran medida la calidad de los resultados obtenidos, dada la importante heterogeneidad tumoral. En este estudio, recomendamos obtener las muestras de la manera más representativa posible. Esto por otra parte supone un gran inconveniente, ya que para obtener una muestra representativa en

pacientes de GB es necesario acceder a gran parte del tumor cerebral. Sin embargo, actualmente se están desarrollando numerosas técnicas poco invasivas de obtención de ADN tumoral a través de las microvesículas (Fraser et al., 2019) y exosomas (Sautes-Fridman, 2019) tumorales. Ambas técnicas serían beneficiosas y útiles en la obtención de niveles de CD90 representativos del tumor.

Finalmente, y teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, conocer aquellos pacientes que van a poder beneficiarse en mayor medida del tratamiento con dexametasona permitirá personalizar la terapia en función de sus niveles de CD90. De la misma manera, aquellos pacientes que no vayan a beneficiarse de este corticoide podrán optar a otros que les produzca una mejor respuesta. Además, es de vital importancia ampliar los conocimientos en los mecanismos moleculares implicados en el proceso de angiogénesis tumoral y la función de CD90 en ellos. Así como la importancia de la heterogeneidad que este tipo de tumor presenta. Por otro lado, deben seguir investigándose los mecanismos moleculares que dirigen la diferencia de respuesta a la dexametasona. Estos avances permitirán diseñar nuevas terapias más efectivas y aumentar la esperanza de vida de estos pacientes.

## 6. Bibliografía

- Ahir, B. K., Engelhard, H. H., & Lakka, S. S. (2020). Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor: Glioblastoma. *Molecular Neurobiology*, 57(5), 2461–2478. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01892-8>
- Avril, T., Etcheverry, A., Pineau, R., Obacz, J., Jegou, G., Jouan, F., Le Reste, P.-J., Hatami, M., Colen, R. R., Carlson, B. L., Decker, P. A., Sarkaria, J. N., Vauléon, E., Chiforeanu, D. C., Clavreul, A., Mosser, J., Chevet, E., & Quillien, V. (2017). CD90 Expression Controls Migration and Predicts Dasatinib Response in Glioblastoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 23(23), 7360–7374. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1549>
- CIMA: Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Dexametasona Kern Pharma 4mg/ml solución inyectable EFG, Ficha Técnica del medicamento. [Internet] [Consultado en 26/05/2021]. Disponible: [https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/67455/FT\\_67455.html#](https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/67455/FT_67455.html#)
- Cruz Da Silva, E., Mercier, M.-C., Etienne-Selloum, N., Dontenwill, M., & Choulier, L. (2021). A Systematic Review of Glioblastoma-Targeted Therapies in Phases II, III, IV Clinical Trials.

*Cancers*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/cancers13081795>

- D'Amore, P. A., & Shima, D. T. (1996). Tumor angiogenesis: a physiological process or genetically determined? *Cancer Metastasis Reviews*, 15(2), 205–212. <https://doi.org/10.1007/BF00437473>
- Fraser, K., Jo, A., Giedt, J., Vinegoni, C., Yang, K. S., Peruzzi, P., Chiocca, E. A., Breakefield, X. O., Lee, H., & Weissleder, R. (2019). Characterization of single microvesicles in plasma from glioblastoma patients. *Neuro-Oncology*, 21(5), 606–615. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy187>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Hausman, D. M. (2019). What Is Cancer? *Perspectives in Biology and Medicine*, 62(4), 778–784. <https://doi.org/10.1353/pbm.2019.0046>
- He, J., Liu, Y., Zhu, T., Zhu, J., Dimeco, F., Vescovi, A. L., Heth, J. A., Muraszko, K. M., Fan, X., & Lubman, D. M. (2012). CD90 is identified as a candidate marker for cancer stem cells in primary high-grade gliomas using tissue microarrays. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 11(6), M111.010744. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.010744>
- Inoue, A., Tanaka, J., Takahashi, H., Kohno, S., Ohue, S., Umakoshi, A., Gotoh, K., & Ohnishi, T. (2016). Blood vessels expressing CD90 in human and rat brain tumors. *Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 36(2), 168–180. <https://doi.org/10.1111/neup.12244>
- Leyton, L., Díaz, J., Martínez, S., Palacios, E., Pérez, L. A., & Pérez, R. D. (2019). Thy-1/CD90 a Bidirectional and Lateral Signaling Scaffold. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 132. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00132>
- Mathivet, T., Bouleti, C., Van Woensel, M., Stanchi, F., Verschuere, T., Phng, L.-K., Dejaegher, J., Balcer, M., Matsumoto, K., Georgieva, P. B., Belmans, J., Scot, R., Stockmann, C., Mazzone, M., De Vleeschouwer, S., & Gerhardt, H. (2017). Dynamic stroma reorganization drives blood vessel dysmorphia during glioma growth. *EMBO Molecular Medicine*, 9(12), 1629–1645. <https://doi.org/10.15252/emmm.201607445>
- Omuro, A., & DeAngelis, L. M. (2013). Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA*, 310(17), 1842–1850. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.280319>

- Ostrom, Q. T., Patil, N., Cioffi, G., Waite, K., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2020). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017. *Neuro-Oncology*, 22(12 Suppl 2), iv1–iv96. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa200>
- Ostrom, Q. T., Rubin, J. B., Lathia, J. D., Berens, M. E., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2018). Females have the survival advantage in glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 20(4), 576–577. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy002>
- Pajtler, K. W., Witt, H., Sill, M., Jones, D. T. W., Hovestadt, V., Kratochwil, F., Wani, K., Tatevossian, R., Punchihewa, C., Johann, P., Reimand, J., Warnatz, H.-J., Ryzhova, M., Mack, S., Ramaswamy, V., Capper, D., Schweizer, L., Sieber, L., Wittmann, A., ... Pfister, S. M. (2015). Molecular Classification of Ependymal Tumors across All CNS Compartments, Histopathological Grades, and Age Groups. *Cancer Cell*, 27(5), 728–743. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.04.002>
- Pilleron, S., Sarfati, D., Janssen-Heijnen, M., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., & Soerjomataram, I. (2019). Global cancer incidence in older adults, 2012 and 2035: A population-based study. *International Journal of Cancer*, 144(1), 49–58. <https://doi.org/10.1002/ijc.31664>
- Ranganathan, P., Weaver, K. L., & Capobianco, A. J. (2011). Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nature Reviews. Cancer*, 11(5), 338–351. <https://doi.org/10.1038/nrc3035>
- Rege, T. A., Pallero, M. A., Gomez, C., Grenett, H. E., Murphy-Ullrich, J. E., & Hagood, J. S. (2006). Thy-1, via its GPI anchor, modulates Src family kinase and focal adhesion kinase phosphorylation and subcellular localization, and fibroblast migration, in response to thrombospondin-1/hep I. *Experimental Cell Research*, 312(19), 3752–3767. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.07.029>
- Sautes-Fridman, C. (2019). Retraction: Targeting and Therapy of Glioblastoma in a Mouse Model Using Exosomes Derived From Natural Killer Cells. *Frontiers in Immunology*, 10, 1770. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01770>
- Sauzay, C., Voutetakis, K., Chatziioannou, A., Chevet, E., & Avril, T. (2019). CD90/Thy-1, a Cancer-Associated Cell Surface Signaling Molecule. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 66. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00066>
- Schubert, K., Gutknecht, D., Köberle, M., Anderegg, U., & Saalbach, A. (2013). Melanoma cells

- use Thy-1 (CD90) on endothelial cells for metastasis formation. *The American Journal of Pathology*, 182(1), 266–276. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.10.003>
- Schubert, K., Polte, T., Bönisch, U., Schader, S., Holtappels, R., Hildebrandt, G., Lehmann, J., Simon, J. C., Anderegg, U., & Saalbach, A. (2011). Thy-1 (CD90) regulates the extravasation of leukocytes during inflammation. *European Journal of Immunology*, 41(3), 645–656. <https://doi.org/10.1002/eji.201041117>
- Suhail, Y., Cain, M. P., Vanaja, K., Kurywchak, P. A., Levchenko, A., Kalluri, R., & Kshitiz. (2019). Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Systems*, 9(2), 109–127. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.07.003>
- Sundaram, G. S., Shakir, K. M., Barnes, G., & Margolis, S. (1978). Release of phospholipase A and triglyceride lipase from rat liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 253(21), 7703–7710.
- Tennant, M., & McGeachie, J. K. (1990). Blood vessel structure and function: a brief update on recent advances. *The Australian and New Zealand Journal of Surgery*, 60(10), 747–753. <https://doi.org/10.1111/j.1445-2197.1990.tb07468.x>
- Trifiletti, D. M., Alonso, C., Grover, S., Fadul, C. E., Sheehan, J. P., & Showalter, T. N. (2017). Prognostic Implications of Extent of Resection in Glioblastoma: Analysis from a Large Database. *World Neurosurgery*, 103, 330–340. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2017.04.035>
- Wang, L., Xiao, Y., Tian, T., Jin, L., Lei, Y., Finnell, R. H., & Ren, A. (2021). Corrigendum to “Digenic variants of planar cell polarity genes in human neural tube defect patients.” *Mol Genet Metab*. 2018 May;124(1):94-100. doi:10.1016/j.ymgme.2018.03.005. Epub 2018 Mar 18. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29573971/>. In *Molecular genetics and metabolism* (Vol. 132, Issue 3, p. 211). <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2021.01.010>
- Wei, K., Korsunsky, I., Marshall, J. L., Gao, A., Watts, G. F. M., Major, T., Croft, A. P., Watts, J., Blazar, P. E., Lange, J. K., Thornhill, T. S., Filer, A., Raza, K., Donlin, L. T., Siebel, C. W., Buckley, C. D., Raychaudhuri, S., & Brenner, M. B. (2020). Notch signalling drives synovial fibroblast identity and arthritis pathology. *Nature*, 582(7811), 259–264. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2222-z>
- Weinberg, R. (2ª Edición). (2014) *The biology of cancer*. New York : Garland Science, Taylor & Francis Group, [2014] ©2014

- Wetzel, A., Chavakis, T., Preissner, K. T., Sticherling, M., Hausteiner, U.-F., Andereg, U., & Saalbach, A. (2004). Human Thy-1 (CD90) on activated endothelial cells is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(6), 3850–3859. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.6.3850>
- Wirsching, H.-G., Galanis, E., & Weller, M. (2016). Glioblastoma. *Handbook of Clinical Neurology*, 134, 381–397. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802997-8.00023-2>
- Woo, S. R., Oh, Y. T., An, J. Y., Kang, B. G., Nam, D.-H., & Joo, K. M. (2015). Glioblastoma specific antigens, GD2 and CD90, are not involved in cancer stemness. *Anatomy & Cell Biology*, 48(1), 44–53. <https://doi.org/10.5115/acb.2015.48.1.44>
- Yamashita, T., Honda, M., Nakamoto, Y., Baba, M., Nio, K., Hara, Y., Zeng, S. S., Hayashi, T., Kondo, M., Takatori, H., Yamashita, T., Mizukoshi, E., Ikeda, H., Zen, Y., Takamura, H., Wang, X. W., & Kaneko, S. (2013). Discrete nature of EpCAM+ and CD90+ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 57(4), 1484–1497. <https://doi.org/10.1002/hep.26168>
- Yi, D., Xiang, W., Zhang, Q., Cen, Y., Su, Q., Zhang, F., Lu, Y., Zhao, H., & Fu, P. (2018). Human Glioblastoma-Derived Mesenchymal Stem Cell to Pericytes Transition and Angiogenic Capacity in Glioblastoma Microenvironment. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 46(1), 279–290. <https://doi.org/10.1159/000488429>
- Yu, Z., Pestell, T. G., Lisanti, M. P., & Pestell, R. G. (2012). Cancer stem cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(12), 2144–2151. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.08.022>
- Yuasa, T., Juniantito, V., Ichikawa, C., Yano, R., Izawa, T., Kuwamura, M., & Yamate, J. (2013). Thy-1 expression, a possible marker of early myofibroblast development, in renal tubulointerstitial fibrosis induced in rats by cisplatin. *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie*, 65(5), 651–659. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2012.07.005>
- Zanotelli, M. R., & Reinhart-King, C. A. (2018). Mechanical Forces in Tumor Angiogenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1092, 91–112. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-95294-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-95294-9_6)