

PAPEL DE LOS PROCESOS DE REPARACIÓN DEL ADN EN RESPUESTA A QUIMIOTERAPIA EN GLIOBLASTOMA

ESTUDIANTES

Camacho-Mesa, Paula¹; Cosgaya-Ortiz, Lola²;
Mendoza-Cartón, María.²; Ortega-Estrada, Rafael¹

INVESTIGADORA

Muñoz-Fernández, Ariadna.³

INSTITUCIONES

1. CES Lope de Vega SCA
2. IES Fidiana
3. GC22-Epigenética, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC)

Investigador Principal: Ariadna Muñoz-Fernández
Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC)

Profesor/Tutor: Dr. Marcos Mateo-Fernández
CES Lope de Vega SCA, Córdoba

IMIBIC for High School Programme, 2023



ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES/FUNDAMENTOS TEÓRICOS	3
2.1. GLIOBLASTOMA	3
2.2. TRATAMIENTO: TEMOZOLOMIDA.	4
2.3. REPARACIÓN DE ADN POR MGMT	5
2.4. PCR.....	6
2.5. ELECTROFORESIS	7
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	7
4. PLANIFICACIÓN DE LAS SESIONES	8
5. MATERIALES Y MÉTODOS	8
5.1. CULTIVOS CELULARES.	8
5.2. PURIFICACIÓN DE ARNM Y MEDIDA EN NANODROP.	9
5.3. RETROTRANSCRIPCIÓN A ADNC.	11
5.3.1. PCR.....	11
5.4. ELECTROFORESIS	13
5.5. DISEÑO EXPERIMENTAL	13
6. RESULTADOS	14
7. CONCLUSIÓN	15
8. AGRADECIMIENTOS	15
9. BIBLIOGRAFÍA	16

ROLE OF DNA REPAIR PROCESSES IN RESPONSE TO CHEMOTHERAPY IN GLIOBLASTOMA

Camacho-Mesa, Paula¹; Cosgaya-Ortiz, Lola²; Mendoza-Cartón, María²; Ortega-Estrada, Rafael¹; Mateo-Fernández, Marcos¹; Muñoz-Fernández¹, Ariadna³.

RESUMEN

La medicina personalizada ha surgido como una estrategia innovadora y prometedora para abordar este cáncer cerebral letal de manera más precisa y efectiva conocido como Glioblastoma que es un tipo de tumor del SNC formado a partir del tejido glial cuya incidencia es mayor entre 45-65 años y su tasa de supervivencia es muy baja. A este tumor se le ha aplicado un tratamiento con temozolomida para eliminar las células tumorales. Para ello se ha purificado el ARNm de dos líneas celulares de glioblastoma, luego se ha obtenido el ADNc mediante retrotranscripción y se ha amplificado mediante PCR el gen *MGMT*. Finalmente se ha realizado una electroforesis en gel de agarosa analizando la expresión del gen *MGMT*, comparando la expresión del gen *MGMT* en células de glioblastoma sensibles (A172) y resistentes (T98G). Tras esto se ha comprobado que la calidad del ARN es válida gracias a los datos obtenidos y medidos en Nanodrop procedentes de los pellets celulares de las líneas de glioblastoma A172 y T98G. Además, se ha visto que la expresión de *MGMT* solo está presente en la línea resistente. En conclusión, la línea celular A172 es sensible a la terapia y por lo tanto no expresa el gen *MGMT* y la línea celular T98G es resistente a la terapia y expresa el gen *MGMT*.

PALABRAS CLAVE: Medicina personalizada, Glioblastoma, *MGMT*, Temozolomida

ABSTRACT

Personalized medicine has emerged as an innovative and promising strategy to more accurately and effectively address this lethal brain cancer known as Glioblastoma which is a type of CNS tumor formed from glial tissue whose incidence is highest between 45-65 years and its survival rate is very low. This tumour has been treated with temozolomide to kill tumour cells. For this purpose, the mRNA of two glioblastoma cell lines was purified, cDNA was obtained by retrotranscription and the *MGMT* gene was amplified by PCR. Finally, an agarose gel electrophoresis was performed analyzing the expression of the *MGMT* gene, comparing the expression of the *MGMT* gene in sensitive (A172) and resistant (T98G) glioblastoma cells. After this, it has been verified that the quality of the RNA is valid thanks to the data obtained and measured in Nanodrop from the cell pellets of the glioblastoma lines A172 and T98G. In addition, it has been shown that expression of *MGMT* is only present in the resistant line. In conclusion, the A172 cell line is sensitive to therapy and therefore does not express the *MGMT* gene and the T98G cell line is resistant to therapy and expresses the *MGMT* gene.

KEYWORDS: Personalized medicine, Glioblastoma, *MGMT*, Temozolomida

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad genética, causada por los cambios que se producen en los genes que controlan el funcionamiento de las células, en especial, cómo se forman y multiplican. Hay una gran variedad de cáncer existente y se identifica siempre de acuerdo a la parte del cuerpo en que aparece en primera instancia, aunque posteriormente se propague a otras áreas. Algunos ejemplos de cáncer son: el cáncer de útero, piel, próstata, riñón, tiroides, pulmón, etc. (Álvarez-Lemus & López-Goerne, 2012).

Algunos de los tratamientos más comunes para tratar el cáncer, utilizados a veces tras cirugía, pueden ser; la radioterapia, la terapia hormonal, la quimioterapia, la inmunoterapia, la terapia dirigida y la crioterapia. Y en algunos tipos de cáncer como el de próstata también se pueden emplear; la terapia biológica, el ultrasonido enfocado de alta intensidad y la hormonoterapia.

Para tratar de manera más precisa, específica y personalizada el cáncer en cada paciente dependiendo de su perfil genético, surgió la medicina personalizada. Este abordaje de tratamiento puede tener menos efectos secundarios que otros tipos de tratamientos y permite, además, prever el éxito del tratamiento en el paciente mediante el uso de marcadores moleculares. Algunos ejemplos de medicina personalizada son la terapia dirigida y la farmacogenómica.

Nuestro proyecto ha consistido en estudiar el papel de los procesos de reparación del ADN en respuesta a quimioterapia en Glioblastoma y tratar de prever de esta manera el efecto del fármaco en cada paciente en base a unos marcadores moleculares. La quimioterapia utilizada es un fármaco llamado Temozolomida, que actúa añadiendo grupos metilo al ADN, produciendo al tejido tumoral una muerte celular.

2. ANTECEDENTES/FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. Glioblastoma

El glioblastoma es un tipo de tumor de crecimiento rápido del sistema nervioso central que se forma a partir del tejido glial (de sostén) del cerebro y la médula espinal. Puede darse a cualquier edad, pero es más frecuente en adultos mayores. Provoca dolores de cabeza que empeoran progresivamente, náuseas, vómitos y convulsiones. Los tratamientos pueden ralentizar la evolución del cáncer y reducir los signos y síntomas. Sin embargo, el glioblastoma se asocia a un mal pronóstico (Camacho Alvarado & Taboada Mora, 2020).

Role of DNA repair processes in response to chemotherapy in glioblastoma

Los distintos tipos de gliomas incluyen astrocitomas, gliomas del tronco encefálico, ependimomas, gliomas mixtos (u oligogastrocitomas), oligodendrogliomas y gliomas del nervio óptico (Davis, 2016).

El glioblastoma es el grado más alto de tumor del tipo glioma (*grado IV*). Es la forma más maligna de astrocitoma, y es sinónimo de glioma de grado IV. En cuanto a la incidencia, aproximadamente el 50% de los gliomas son glioblastomas. Son más comunes en adultos de entre 45 y 65 años de edad, y afectan a más hombres que mujeres (Thakkar *et al.*, 2006).

Sin embargo, el pronóstico general de glioma sigue siendo pobre a pesar de los tratamientos agresivos, especialmente en pacientes con glioma de alto grado (glioblastoma), cuyo promedio de tiempo de supervivencia después de la cirugía es de sólo 12 a 15 meses para glioblastoma. Este pronóstico está estrechamente relacionado con la resistencia que muchos pacientes presentan al tratamiento (Wirsching & Weller, 2017).

2.2. Tratamiento: temozolomida.

El tratamiento frente a este tipo de tumores se afronta de manera multidisciplinar (Davis, 2016). En primer lugar, se realiza una resección quirúrgica, cuyo objetivo es extirpar la mayor cantidad posible del tumor. Pero dado que el glioblastoma crece en tejido cerebral normal, no es posible extraerlo por completo. Por este motivo, la mayoría de las personas reciben tratamientos adicionales después de la cirugía para atacar las células tumorales restantes. No obstante, la cirugía no siempre es posible, ya que depende de la zona en la que aparezca el tumor.

Además, se aplica radioterapia a los pacientes. La radioterapia usa haces de alta energía, como rayos X o protones, para eliminar las células tumorales. La radioterapia se suele recomendar después de la cirugía, y se puede combinar con quimioterapia. Para las personas que no se pueden someter a una cirugía, la radioterapia y la quimioterapia se pueden utilizar como tratamiento principal.

Por último, se aplica un tratamiento quimioterapéutico a los pacientes en combinación con la radioterapia. La quimioterapia consiste en el uso de fármacos para destruir las células cancerosas. En algunos casos, se pueden colocar obleas circulares delgadas que contienen medicamentos de quimioterapia en el cerebro durante la cirugía. Estas obleas se disuelven lentamente y liberan el medicamento para destruir las células cancerosas. Después de la cirugía, se suele utilizar el medicamento de quimioterapia temozolomida (Temodar), que se toma vía oral, durante y después del tratamiento de radioterapia.

Temozolomida (C₆H₆N₆O₂)

La temozolomida es un fármaco quimioterapéutico utilizado para tratar gliomas y otros tipos de tumores. Se administra por vía oral y puede preinscribirse como monoterapia o en combinación con radioterapia. La temozolomida pertenece a una clase de fármacos llamados agentes alquilantes, ya que actúa añadiendo grupos metil a las bases púricas del ADN. Entre los daños causados por la temozolomida, se encuentra la O6-metilguanina, que consiste en la adición de un grupo metil al oxígeno 6 de la guanina. Los daños causados por la temozolomida producen la detención del crecimiento de las células tumorales, lo que conduce en la mayoría de casos a la muerte celular (Zhang *et al.*, 2012). Sin embargo, muchos pacientes presentan resistencia a esta terapia, lo que da lugar a la baja tasa de supervivencia. La resistencia se debe, en parte, a la actuación de los mecanismos de reparación del ADN que eliminan los daños causados por este tratamiento.

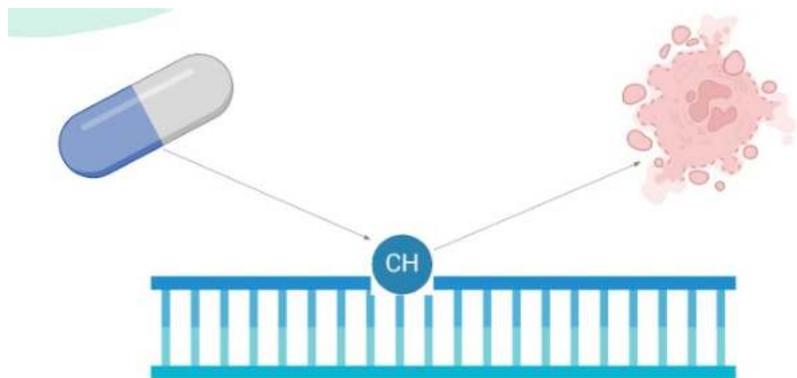


Imagen 1. Introducción de un grupo metil por la temozolomida al ADN.

2. 3. Reparación de ADN por MGMT

La enzima de reparación O6-metilguanina-metiltransferasa (MGMT) repara el ADN a través de la eliminación directa de un grupo alquilo del átomo O6 de la guanina en el ADN de las células expuestas a agentes alquilantes, como es la temozolomida.

Uno de los daños causados por la TMZ es la O6-metilguanina. En este caso, MGMT sería la enzima responsable de la reparación de este daño (Ferri *et al.*, 2020). Por lo tanto, podemos suponer que:

- Si no se expresa, MGMT no repara el daño causado por la temozolomida al no eliminar el grupo metil de la guanina. Por tanto, las células, serían sensibles al tratamiento con TMZ.
- Al contrario, si se expresa MGMT, los daños producidos por la temozolomida serían reparados, y por tanto las células serían resistentes a la terapia con TMZ.

Role of DNA repair processes in response to chemotherapy in glioblastoma

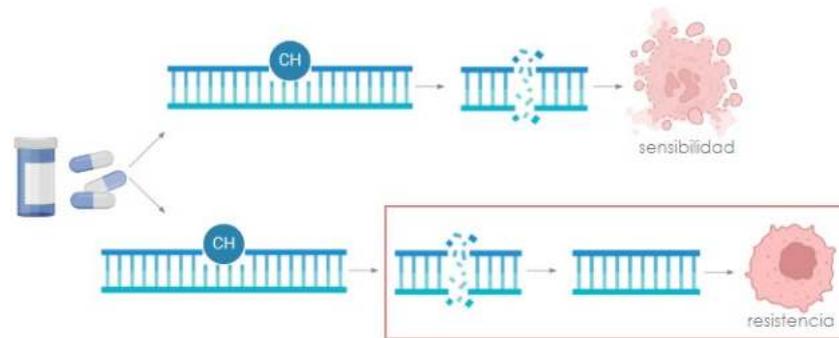


Imagen 2. Mecanismo de reparación de MGMT

2.4. PCR

La PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es una técnica utilizada comúnmente para la amplificación de fragmentos de ADN. La amplificación permite aumentar la cantidad de material para poder hacer análisis posteriores. En este caso, queremos amplificar el gen que codifica la enzima MGMT para analizar su presencia o ausencia en células de glioblastoma.

La PCR implica el uso de fragmentos cortos de ADN sintético (cebadores) para seleccionar el segmento del genoma que se amplificará; que en este caso seleccionarán el gen MGMT, y múltiples ciclos de síntesis de ADN para amplificar el segmento.

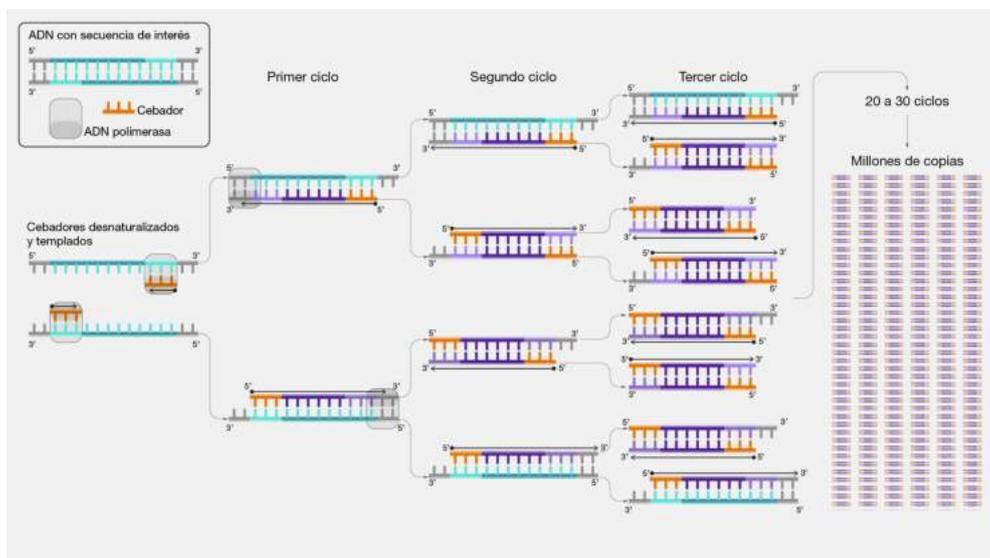


Imagen 3. Fundamento de la PCR.

2.5. Electroforesis

La electroforesis es una técnica que se utiliza para separar moléculas de ADN, ARN o proteínas en función de su tamaño y carga eléctrica; las de carga negativa se mueven hacia el ánodo y las positivas hacia el cátodo. Se usa una corriente eléctrica para desplazar las moléculas a través de un gel. Los poros del gel actúan como un tapiz, permitiendo que las moléculas más pequeñas se desplacen más rápido que otras más grandes. Para determinar el tamaño de las moléculas de una muestra, se usan marcadores estándares conocidos que se separan en el mismo gel y luego se comparan con la muestra.



Imagen 4. Separación de moléculas de ADN mediante una electroforesis en gel de agarosa.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como ya sabemos, la reparación del ADN ocurre cuando MGMT se expresa en la célula. Si esto es así, nuestra hipótesis se basa en que el tratamiento por quimioterapia no será efectiva en presencia de MGMT, dando lugar a células resistentes al tratamiento. Por otro lado, si no hay expresión de la proteínas MGMT, la célula no podrá reparar el daño que se produzca en el ADN y por tanto obtendremos células sensibles al tratamiento pudiendo así eliminar las células tumorales.

Hemos estudiado dos diferentes líneas celulares; una resistente, línea T98G, y otra sensible, línea A172. Por lo tanto, el objetivo principal de nuestro proyecto es comprobar la expresión de MGMT tanto en células resistentes como sensibles, teniendo así los siguientes objetivos secundarios:

- Purificar el ARNm de dos líneas celulares de glioblastoma.
- Obtener el ADNc mediante retrotranscripción.
- Amplificar mediante PCR el gen MGMT.
- Analizar la expresión del gen MGMT.

4. PLANIFICACIÓN DE LAS SESIONES

Se trabajó durante cuatro sesiones:

Sesión 1 16/02/22: la primera sesión fue la más teórica. Se nos explicó en qué consistía el trabajo y conceptos básicos para poder entender el cómo llevarla a cabo

Sesión 2 16/03/22: obtuvimos el ARNm de cada línea celular mediante la purificación del ARN. A partir de este ARNm obtenemos el ADN copia para poder amplificar el gen en la PCR. También calculamos la concentración de ARNm con el Nanodrop.

Sesión 3 30/03/22: realizamos un gel de agarosa para separar el producto de la PCR del ADNc y comprobamos la expresión de MGMT en A172 y T98G

Sesión 4 20/04/22: elaboración del póster

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cultivos celulares.

Partimos de dos líneas celulares de glioblastoma. La línea A172, aislada del tejido cerebral de un paciente masculino de 53 años con glioblastoma. Y la línea celular T98G, aislada del cerebro de un paciente masculino de 61 años de edad con glioblastoma multiforme (Camacho Alvarado & Taboada Mora, 2020).

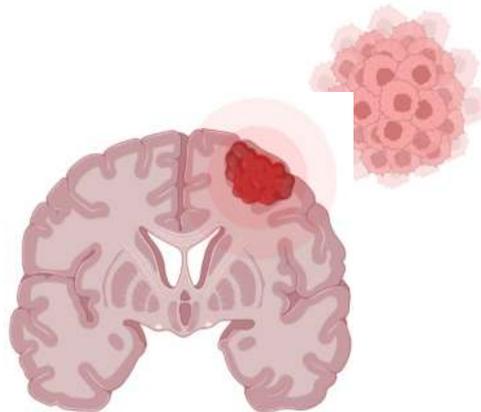


Imagen 5. Aislamiento de las líneas celulares del tejido cerebral.

Role of DNA repair processes in response to chemotherapy in glioblastoma

Ambas son líneas adherentes, por lo que crecen en monocapa en frascos de cultivo. A partir de los mismos, se obtienen los pellets celulares levantando y centrifugando las células.

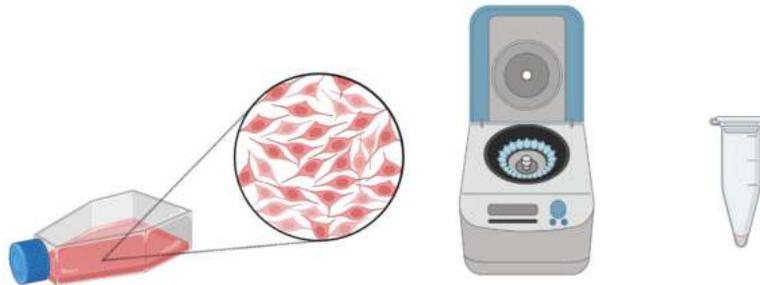


Imagen 6. Obtención del pellet celular, mediante centrifugación.

5.2. Purificación de ARNm y medida en NanoDrop.

Para la purificación del ARN mensajero (ARNm) de las células tumorales partimos de los pellets de ambas líneas, y utilizamos el kit comercial RNeasy Mini Kit (Qiagen) que consiste en diferentes reactivos y en el paso de la muestra por una columna de sílice.

En primer lugar, se agregan 350µl de RTL al pellet celular y se pipetea varias veces para suspender el pellet y obtener una mezcla homogénea. A continuación, se añaden 350µl de etanol 70% y se transfiere todo el volumen (700µl) a la columna para su posterior centrifugación 30 segundos a 8.000g. Después de este proceso se descarta el sobrenadante.

Una vez se descarta el sobrenadante, se agregan 700µl de RW1 a la columna y se centrifugan 30 segundos a 8.000g. Por último, se descarta el sobrenadante. Se repite este proceso con 400µl del reactivo RPE.

Se agregan 12µl de ADNasa a la columna y se incuba a temperatura ambiente 15 minutos. A continuación, se añaden 300µl del reactivo RPE a la columna y se centrifuga 1 minuto a 8.000g descartando el sobrenadante.

Una vez hecho esto, se pasa la columna a un tubo nuevo desechando el anterior, se agrega a la columna 40µl de agua y se incuba a temperatura ambiente 2 minutos. Se centrifuga una última vez 2 minutos a 8.000g y se desecha la columna, quedando en el tubo el ARN. Por último, se almacena el ARN a -80°C.

Role of DNA repair processes in response to chemotherapy in glioblastoma

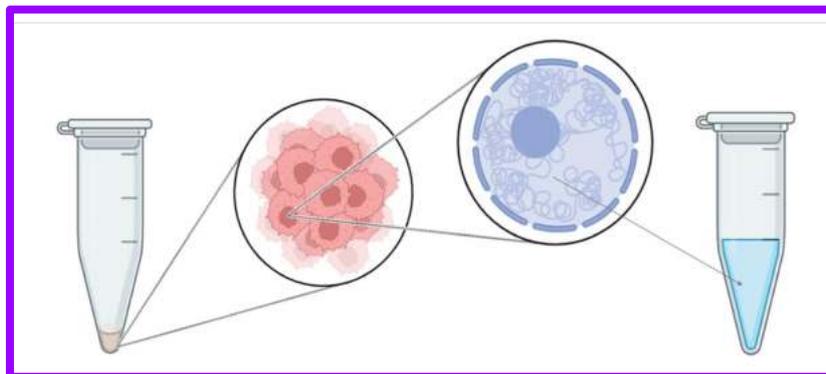


Imagen 7. Esquema de la purificación del ARNm

Para conocer la concentración de ARNm de cada muestra y su calidad, usaremos NanoDrop (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific).

Una vez se inicia el programa, se escoge la opción “Nucleic Acid”, y se pipetea 1µl de agua en el nanodrop para limpiar. En el programa, se hace blanco con el agua, presionando la opción “Blank”. Se escoge la opción de medida de ARN.

A continuación, se homogeniza con vórtex la muestra a medir, se toma 1µl de esta y se pipetea en el pedestal del NanoDrop. Después, se mide presionando la opción “Measure”.

Por último, se apuntan las ratios 260/280 y 230/260, que nos indicarán la calidad del ARN, así como la concentración en ng/µl.

Durante el proceso, se mide dos veces cada muestra, así, se puede asegurar la veracidad del resultado.

	260/280	260/230	CONCENTRACIÓN
A172	1,985	1,63	185,8 ng/µl
T98G	2,04	1,61	470,85 ng/µl

Tabla 1. Resultados de las medidas tomadas en Nanodrop de las muestras de ARN.

5.3. Retrotranscripción a ADNc.

El ARNm se somete a una retrotranscripción para obtener el ADN copia (ADNc) de ambas líneas celulares.

En primer lugar, se añade a un tubo 4µl de la mix del kit comercial qScript cDNA Synthesis (Quanta Biosciences), 1000ng de ARNm (según la concentración del ARNm obtenida en NanoDrop) y por último, se agrega agua hasta un total de 20µl.

A continuación, se introducen los tubos en el termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad), y se programan 15min a 37°C y posteriormente 5min a 85°C. Por último, y para la conservación de la muestra, se mantiene a 4°C.

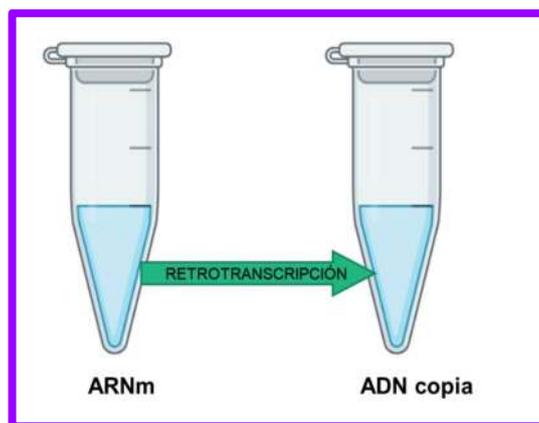


Imagen 8. Esquema de la retrotranscripción

5.3.1. PCR

Para amplificar en las muestras el gen MGMT, realizamos una PCR a tiempo final. Para ello, se consideró GAPDH como gen control, ya que es constitutivo y se expresa en todas las células. Se utilizaron las siguientes parejas de cebadores:

Gen	Secuencia
GAPDH (Forward)	TGTCCCACTGCCAACGTGTCA
GAPDH (Reverse)	AGCGTCAAAGGTGGAGGAGTGGGT
MGMT (Forward)	CCTGGCTGAATGCCTATTTTC
MGMT (Reverse)	GATGAGGATGGGGACAGGATT

Tabla 2. Tabla de cebadores y sus secuencias.

También se ha utilizado un Termociclador: T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) y la polimerasa es iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad).

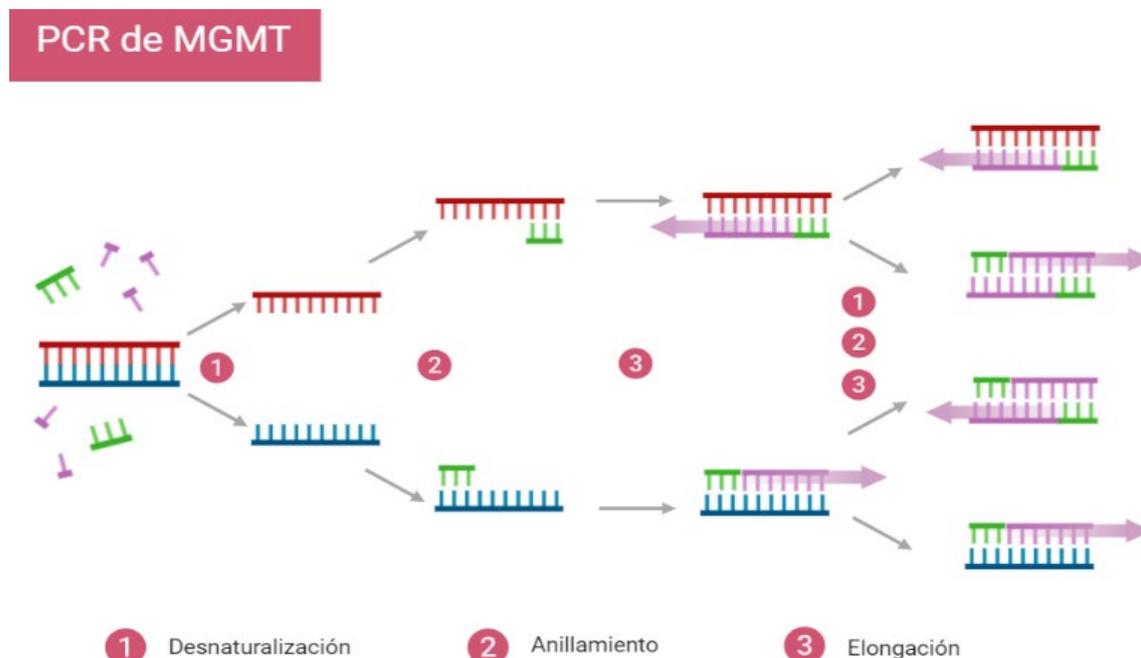


Imagen 9. PCR realizada en el gen MGMT para su amplificación.

Luego se han cogido dos tubos con ADN copia de las células; uno de ellos con los primers específicos de MGMT (Forward con la secuencia: CCTGGCTGAATGCCTATTTTC y Reverse con la secuencia: GATGAGGATGGGGACAGGATT) y el otro con los primers de GAPDH (Forward con la secuencia: TGTCCCCACTGCCAACGTGTCA y Reverse con la secuencia: AGCGTCAAAGGTGGAGGAGTGGGT), el cuál es un gen que se expresa en todas las células y usamos como control positivo y los otros dos con agua, los cuales tienen un control negativo para cada par de primers (conteniendo los mismos reactivos cambiando únicamente el ADN por agua). A continuación, se han rotulado los tubos de PCR según la muestra y se han añadido a cada tubo los reactivos: Buffer 10x, dNTPs 2mM, MgCl₂, Primer MGMT Fw 5µM, agua, ADN copia y polimerasa siendo el volumen final de 10µl.

A continuación, se han colocado los tubos en el termociclador programando unos ciertos ciclos y posteriormente se han congelado a 4°C para cargar el gel de agarosa (Espín Villacrés, 2002).

5.4. Electroforesis

Se ha realizado un gel de agarosa para separar el producto de la PCR de ADN copia, y visualizar los resultados en el transiluminador, comparando la expresión del gen MGMT en células de glioblastoma sensibles (A172) y resistentes (T98G).

Para ello se ha realizado una electroforesis utilizando el producto de la PCR de la sesión anterior, unos reactivos que son el TAE, agarosa, buffer de carga, agua y marcador de peso molecular. Luego, se ha usado una cubeta cama y peine para poner el gel y por último una fuente de alimentación para darle voltaje a la cubeta.

Se han partido de tres tubos, uno con agua (control negativo), otro con el producto de la PCR de la sesión anterior con GAPDH y otro con el producto de la PCR de MGMT. Se realizará un gel de agarosa en TAE. Para eso, se ha pesado la agarosa en la balanza y se ha medido la cantidad del TAE que se ha usado y posteriormente añadida a una matraz Erlenmeyer junto a la agarosa que ha sido agitada y puesta en el microondas para que hierva. Después se ha cogido una cama y un peine donde se vertido el gel tras haberla precintado para evitar que el gel se salga y mientras se solidificaba se han preparado los tubos añadiendo agua y buffer a cada tubo, además de eso, se ha preparado un marcador de peso molecular que será el indicador de tamaño del amplicón de cada pareja de primers en la PCR.

Una vez solidificado el gel, se ha quitado el precinto y metido en la cubeta. A continuación se ha cargado en un pocillo del gel los 10µl resultantes de la muestra+buffer de carga+agua y se le ha dado voltaje. Una vez finalizado el voltaje se ha sacado el gel de la cubeta y se ha colocado en una bandeja del transiluminador, cerrado la tapa y programado la luz UV a 1,5s. Por último, se ha guardado la imagen del gel indicando todos los datos en el título.

5.5. Diseño experimental

A partir de las líneas celulares A172 y T98G aisladas de pacientes con glioblastoma multiforme, se ha obtenido un pellet celular mediante centrifugación. Para su purificación, se añaden diferentes reactivos a una columna con filtro.

A continuación, se usa NanoDrop para conocer la concentración y la calidad de cada muestra de ARNm. Al finalizar esta prueba, se debe someter al ARNm a una retrotranscripción para la obtención del ADNc de ambas líneas celulares.

Posteriormente, se realiza una PCR para la amplificación del gen MGMT del ADN copia de las células, mediante los primers específicos.

Por último, se ha realizado una electroforesis en gel de agarosa para separar el producto de la PCR del ADN copia. Esta prueba se realiza para comparar la expresión del gen MGMT en las células del glioblastoma sensible (A172) y resistente (T98G).

6. RESULTADOS

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en la tabla 1 sobre de la medición en Nanodrop de los ARN procedentes de los pellets celulares de las líneas de glioblastoma A172 y T98, hemos obtenido una concentración de 185,8 ng/ μ l en la línea celular A172 y de 470,85 ng/ μ l en la línea celular T98G. Por lo tanto, una vez realizada esta prueba de calidad, demostramos que la técnica de extracción de ARNm funcionó correctamente.

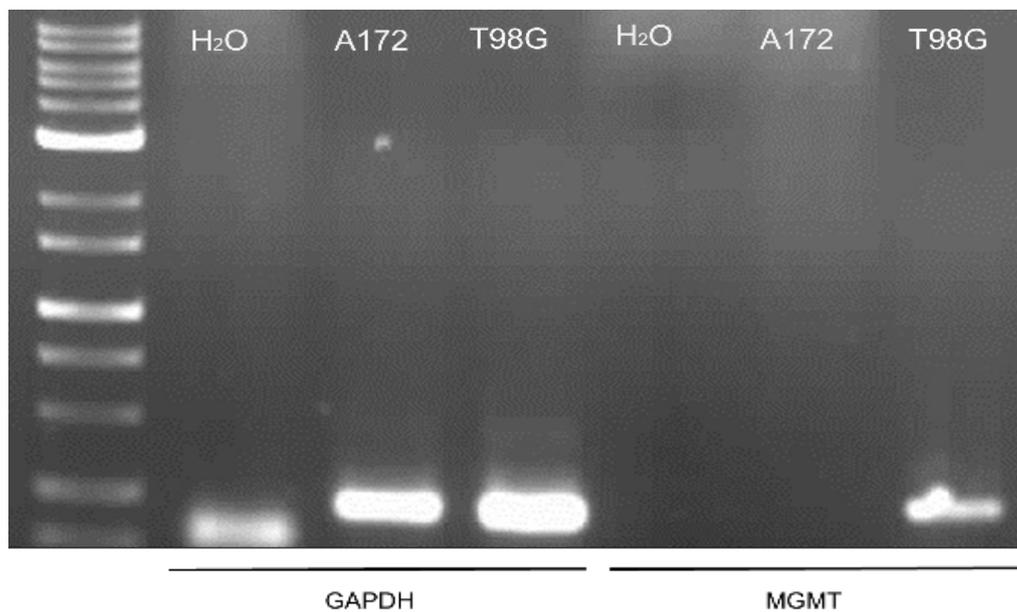


Imagen 10. Resultado de electroforesis gel de agarosa

En base a la imagen 10, podemos afirmar que la expresión del gen MGMT sólo está presente en la línea resistente (T98G). En el primer carril se encuentra la muestra de agua con cebador de GAPDH. En el segundo y tercer carril las líneas celulares que han sido trabajadas, A172 y T98G, con cebador de GAPDH. En el cuarto carril se dispone una muestra de agua con cebador de MGMT. En el quinto carril se observa la línea celular A172 con un cebador de MGMT, el cual no se expresa debido a la sensibilidad de dicha línea celular hacia el gen. Finalmente, en el carril 6 se muestra la línea celular T98G con cebador de MGMT, donde sí se expresa.

7. CONCLUSIÓN

En base a los resultados obtenidos en nuestro proyecto, establecemos las siguientes conclusiones:

- La técnica de extracción de ARNm funcionó correctamente.
- La línea celular A172 no expresa MGMT. Por lo tanto no tiene capacidad de reparación de la O6-metilguanina causada por el tratamiento con temozolamida. De esta manera, estas células son **sensibles** por tanto el tratamiento específico con el fármaco temozolamida y sería efectivo.

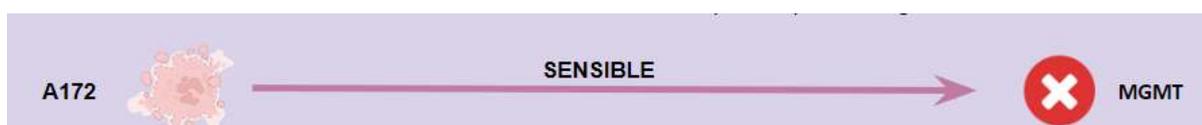


Imagen 11. Línea sensible

- Por otro lado, la línea T98G sí expresa MGMT. Por lo tanto, las células repararán el daño inducido por temozolamida en el ADN y el tratamiento no sería efectivo. En este caso, las células son **resistentes** a dicho fármaco.

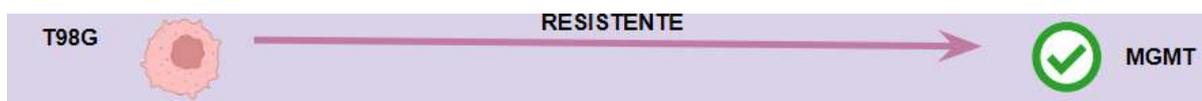


Imagen 12. Línea resistente

8. AGRADECIMIENTOS

Queríamos dar las gracias a todas las personas e instituciones que han hecho posible la realización de este trabajo. Sobre todo al IES Fidiana y al CES Lope de Vega por ofrecernos esta oportunidad, entre ellos a las profesoras de IES Fidiana, Elena y María del Mar, y del CES Lope de Vega, Marcos por orientarnos y ayudarnos en todo momento. También agradecer a la investigadora que nos ha ayudado en todo nuestro proceso, Ariadna, por su dedicación hacia nosotros y el proyecto. Y por último a todo el esfuerzo que hemos puesto en realizar este proyecto

9. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez-Lemus, M., & López-Goerne, T. (2012). Nanotecnología y cáncer: aplicación al tratamiento de tumores cerebrales. *Archivos de Neurociencias*, 17(2), 102-10.
- Camacho Alvarado, M. & Taboada Mora, D. (2020). Glioblastomas: clasificación, caracterización molecular y vías de señalización comúnmente alteradas. *Ciencia & Salud*, 4(4), 106-115.
- Davis ME (2016). Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin J Oncol Nurs*. 2016 Oct 1;20(5 Suppl):S2-8. doi: 10.1188/16.CJON.S1.2-8. PMID: 27668386; PMCID: PMC5123811.
- Espín Villacrés, V. (2002). Fundamentos en la práctica médica de la genética molecular y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *VozAndes*, 14(1), 56-59.
- Ferri, A.; Stagni, V. & Barila, D. (2020). Targeting the DNA damage response to overcome cancer drug resistance in glioblastoma. *International Journal of Molecular Science*, 21(14), 4910.
- Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, Villano JL. (2014). Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 2014;23:1985–1996. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0275
- Wilson TA, Karajannis MA, Harter DH (2014). Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surgical Neurology International*. 2014;5:64–62. doi: 10.4103/2152-7806.132138.
- Wirsching, HG., Weller, M. (2017). Glioblastoma. In: Moliterno Gunel, J., Piepmeier, J., Baehring, J. (eds) *Malignant Brain Tumors*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49864-5_18
- Zhang, J., FG Stevens, M., & D Bradshaw, T. (2012). Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Current molecular pharmacology*, 5(1), 102-114.