

**HOXD1 inhibe la progresión tumoral al promover la  
diferenciación de las células madre de  
glioblastoma**

**Tesis**

**Entregada A La  
Universidad De Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De**

**Doctor en Biotecnología Molecular**

**Facultad De Ciencias**

**Por**

**Edelmira Fernández Caniulén**

**Diciembre, 2023**

**Directores de Tesis: Dr. Miguel Allende Connelly  
Y Dra. Verónica Palma Alvarado**

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

**Edelmira Fernández Caniulén**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Biotecnología Molecular, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día .....

Director de Tesis:  
Dr. Miguel Allende Connelly.....

Co-director de Tesis:  
Dra. Verónica Palma Alvarado.....

Comisión de Evaluación de la Tesis:  
Dra. Daniela Sauma Mahaluf.....

Dr. Martín Montecinos Leonard.....

Dr. Manuel Varas Godoy.....

# DEDICATORIA

# RESUMEN BIOGRÁFICO

# **AGRADECIMIENTOS**

# INDICE DE MATERIAS

<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>II</b>
<b>RESUMEN BIOGRÁFICO.....</b>	<b>III</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>IV</b>
<b>INDICE DE MATERIAS .....</b>	<b>V</b>
<b>INDICE DE TABLAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>INDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>IX</b>
Figuras.....	ix
Figuras Suplementarias .....	xi
<b>LISTADO DE ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA .....</b>	<b>XIII</b>
Abreviaturas.....	xiii
Nomenclatura .....	xvii
Genes y proteínas.....	xvii
<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
Glioblastoma.....	5
Clasificaciones moleculares de gliomas y GBM .....	6
Incidencia de gliomas y GBM .....	10
Células Madre Cancerígenas .....	11
Genes HOX .....	14
Genes HOX, cáncer y CSC .....	17
Genes HOX y terapias dirigidas a CSC .....	20
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>23</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>24</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>25</b>
Objetivo 1: Identificar genes HOX con potencial rol supresor tumoral en glioblastoma mediante aproximaciones bioinformáticas.....	25
Objetivo 2: Evaluar el potencial de un gen supresor tumoral candidato seleccionado para inducir diferenciación en el contexto del desarrollo del sistema nervioso y de células madre de glioblastoma.....	25

Objetivo 3: Determinar mediante aproximaciones <i>in vitro</i> los niveles de la expresión del potencial gen supresor tumoral en muestras de glioblastoma y evaluar el efecto de la inducción de su expresión en las células madre de glioblastoma.....	25
Objetivo 4: Determinar mediante aproximaciones bioinformáticas posibles mecanismos involucrados en el silenciamiento del potencial gen HOX supresor tumoral candidato en pacientes con glioblastoma .....	25
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
Objetivo 1: Identificar genes HOX con potencial rol supresor tumoral en glioblastoma mediante aproximaciones bioinformáticas .....	48
La expresión de HOXD1 es menor en pacientes con GBM en comparación con pacientes LGG y muestras cerebrales sanas.....	48
HOXD1 presenta mayor expresión en gliomas de mejor pronóstico .....	52
La disminución de la expresión de HOXD1 se asocia con un peor pronóstico de sobrevida.....	56
Objetivo 2: Evaluar el potencial de los genes supresores tumorales para inducir diferenciación durante el desarrollo del sistema nervioso y las células madre de glioblastoma.....	58
HOXD1 se asocia a un fenotipo diferenciado en tejido cerebral normal .....	58
HOXD1 se expresa en neuronas derivadas de hiPSC.....	65
HOXD1 se asocia a un fenotipo diferenciado en GBM .....	67
Objetivo 3: Determinar mediante aproximaciones <i>in vitro</i> los niveles de la expresión del potencial gen supresor tumoral en muestras de glioblastoma y evaluar el efecto de la inducción de su expresión en las células madre de glioblastoma.....	69
HOXD1 presenta diferentes niveles de expresión en líneas celulares y muestras de pacientes con GBM .....	69
HOXD1 presenta niveles de expresión similares en cultivos adherentes y cultivos de tumor-esfera de líneas celulares de GBM U87, U251 y T98G .....	71
La activación de la expresión de HOXD1 en GSC derivadas de líneas celulares de GBM reduce sus características troncales.....	73
Diseño de sistema Cre/LoxP para la expresión inducible de HOXD1 en GSC .....	74
Amplificación de los plásmidos retrovirales y lentivirales en la cepa de <i>E. coli</i> Stb13 .....	79
Generación de líneas estables de GBM para la expresión de HOXD1 en las GSC.....	82
Determinación de la concentración óptima de 4OHT para el tratamiento de las líneas de GBM .....	86

La Inducción de la expresión de HOXD1 reduce las características troncales en líneas celulares de GBM.....	90
<b>OBJETIVO 4: DETERMINAR MEDIANTE APROXIMACIONES BIOINFORMÁTICAS POSIBLES MECANISMOS INVOLUCRADOS EN EL SILENCIAMIENTO DEL POTENCIAL GEN HOX SUPRESOR TUMORAL CANDIDATO EN PACIENTES CON GLIOBLASTOMA .....</b>	<b>95</b>
Los re-arreglos genómicos no son el principal mecanismo de la expresión aberrante de <i>HOXD1</i> y otros genes del grupo genómico HOXD .....	95
La metilación no es el principal mecanismo de la expresión aberrante de <i>HOXD1</i> y otros genes del grupo genómico HOXD.....	99
Las marcas de histonas H3k4me3 y h3k27me3 no son los principales mecanismos asociados a la expresion ABERRANTE DE HOXD1 Y OTROS genes del grupo genómico hoxd .....	103
La desregulación de la expresión de miRNA en GBM es un potencial mecanismo asociado a la expresión aberrante de <i>HOXD1</i> .....	108
Resultados preliminares respecto al modelo <i>Danio rerio</i> para la validación <i>in vivo</i> de las aproximaciones bioinformáticas e <i>in vitro</i> .....	115
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>118</b>
Papel de los genes HOX en gliomas y desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas .....	118
<i>HOXD1</i> es un potencial gen supresor tumoral en gliomas y otros canceres cerebrales .....	120
<i>HOXD1</i> presenta mayores niveles de expresión en pacientes con gliomas de mejor pronóstico .....	122
La expresión de <i>HOXD1</i> se asocia a un fenotipo diferenciado en el contexto cerebral.....	123
La activación de la expresión de <i>HOXD1</i> en las GSC derivadas de líneas celulares de GBM, reduce sus características troncales .....	127
<i>HOXD1</i> actúa como un oncogén o gen supresor tumoral en otros contextos tumorales .....	132
Los miRNAs podrían estar asociados a la disminución de la expresión de <i>HOXD1</i> en GBM .....	133
<i>Danio rerio</i> como modelo <i>in vivo</i> para el estudio del efecto de la modulación de la expresion de HOXD1 en las GSC.....	136
<b>CONCLUSIÓN .....</b>	<b>137</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTARIO .....</b>	<b>138</b>
FIGURAS SUPLEMENTARIAS .....	138
Tablas versión completa.....	145
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>163</b>



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Partidores específicos que se utilizaron en el análisis de qPCR para la amplificación de distintos genes humanos.....	33
Tabla 2: Procesos biológicos enriquecidos a partir de genes que correlacionan positivamente con HOXD1 en pacientes con GBM.....	63
Versión completa.....	145
Tabla 3: Procesos biológicos enriquecidos a partir de genes que correlacionan negativamente con HOXD1 en pacientes con GBM.....	64
versión completa.....	157
Tabla 4: miRNAs que correlacionan negativamente con HOXD1, en datos de GBM de la base CGGA, y tienen el potencial de unirse al ARNm de HOXD1.....	111

# INDICE DE FIGURAS

## Figuras

Figura 1: Genes HOX, organización en el genoma y su expresión en el eje anteroposterior corporal en humanos.....	15
Figura 2: Mapa calórico que ilustra los principales roles funcionales de los genes HOX en gliomas y su valor pronóstico clínico.....	18
Figura 3: Resumen gráfico de la hipótesis de trabajo.....	23
Figura 4: HOXD1 presenta una menor expresión en pacientes con GBM en comparación a su expresión en pacientes con LGG.....	50
Figura 5: La expresión de HOXD1 es mayor en pacientes con gliomas de mejor pronóstico.....	55
Figura 6: A diferencia de otros genes del grupo genómico HOXD, una alta expresión de HOXD1 se asocia con un mejor pronóstico de supervivencia en pacientes con gliomas.....	57
Figura 7: HOXD1 se expresa en cerebro en desarrollo y cerebro adulto en humano. ....	61
Figura 8: HOXD1 se expresa en neuronas diferenciadas in vitro a partir de NSC derivadas de hiPS.....	66
Figura 9: A diferencia de otros genes del mismo grupo genómico, HOXD1 presenta	

una mayor expresión en zonas del tumor con baja expresión de marcadores troncales.....	68
Figura 10: HOXD1 presenta distintos niveles de expresión en líneas celulares y muestras de pacientes con GBM.....	70
Figura 11: El cultivo de tumor-esferas de líneas celulares de glioblastoma, U87, U251 y T98G, enriquece la población de GSC.....	72
Figura 12: No se observan cambios en los niveles de expresión de HOXD1 entre los cultivos adherentes y de tumor-esferas de líneas celulares de GBM.....	73
Figura 13: Vector retroviral pRetroQ.....	74
Figura 14: Vectores lentivirales para la expresión de HOXD1 y Stuffer en las GSC.....	77
Figura 15: Mecanismo de recombinación de secuencias loxP inducida por 4OHT.....	78
Figura 16: Digestión enzimática del vector retroviral pRetroQ-Cre-ERT2.....	80
Figura 17: Digestión enzimática del vector lentiviral pLVX-HOXD1.....	81
Figura 18: Digestión enzimática del vector lentiviral pLVX-Stuffer.....	81
Figura 19: No se observaron cambios morfológicos ni proliferativos luego de transducciones virales en las líneas derivadas de U87.....	84
Figura 20: No se observaron cambios morfológicos ni proliferativos luego de transducciones virales en las líneas derivadas de T98G.....	85
Figura 21: Estimación de la viabilidad celular mediante ensayo de MTT en líneas celulares de GBM tratadas con 10, 100, 1.000 y 10.000nM de 4OHT.....	88
Figura 22: Estimación de la viabilidad celular mediante ensayo de MTT en líneas celulares de GBM tratadas con 100, 300, 500 y 1.000 nM de 4OHT.....	89

Figura 23: La inducción de HOXD1 reduce el número y tamaño de las tumor-esferas en la línea T98G.....	93
Figura 24: La inducción de HOXD1 reduce el tamaño de las tumor-esferas en la línea U87.....	94
Figura 25: La alteración del número de copia no es el principal mecanismo asociado a la expresión aberrante de HOXD1 y otros genes del mismo grupo genómico.....	98
Figura 26: La metilación no es el principal mecanismo asociado a la disminución de la expresión de HOXD1 o a la expresión aberrante de otros genes del grupo genómico HOXD.....	102
Figura 27: Las marcas de histona H3K4me3 y H3K27me3 no son el principal mecanismo asociado a la expresión aberrante de HOXD1 y otros genes del grupo genómico HOXD.....	105
Figura 28: Análisis de marcas de histona H3K4me3 en HOXD1 y HOXD-AS1 en CSC en relación con líneas celulares de GBM cultivadas en condiciones FCS.....	107
Figura 29: miRNAs que interactúan con la región 3'UTR de HOXD1.....	111
Figura 30: Los miRNA pueden estar involucrados en la expresión aberrante de HOXD1 en GBM.....	113

## **Figuras Suplementarias**

Figura S 1: La expresión de HOXD1 es menor en muestras de GBM en comparación

con tejido normal.....	138
Figura S 2: Genes HOX descritos con rol supresor tumoral en gliomas presentan mayores niveles de expresión en GBM en relación con LGG.....	139
Figura S 3: HOXD8 presenta altos niveles de expresión en las líneas de GBM U87, U251 y T98G.....	140
Figura S 4: La expresión de SOX2 correlaciona negativamente con la expresión de HOXD1.....	141
Figura S 5: Inyección de células de GBM, U87 y U251, en el vitelo de pez cebra.....	142
Figura S 6: Visualización de células de GBM, U87 y U251 que migran hacia la cola del pez a través de vasos sanguíneos.....	143
Figura S 7: Inyección de células de la línea de GBM U87 en el cerebro del pez cebra.....	144

# LISTADO DE ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA

## Abreviaturas

°C: Grados celcius

1p/19q: Delección cromosómica común en gliomas

4OHT: 4-hidroxitamoxifeno

A<sub>550</sub>: Absorbancia en longitudes de onda de 550

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AR: Acido retinoico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ATCC: *American Type Culture Collection*

bFGF: Factor básico de crecimiento de fibroblastos

CGGA: *Chinese Glioma Genome Atlas*

ChIP: *Chromatin Immuno Precipitation.*

CICUA: Comité de Cuidados y Uso de Animales

CL: Fenotipo Clásico de Glioblastoma

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

Col.: Colaboradores

Ctrl: Condición experimental control

DAPI: 4'-6-diamino-2-fenilindol

DMEM: *Medio Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMEM F12: *DMEM Nutrient Mixture F-12*

DMEM HG: *DMEM high glucose*

DMSO: Dimetilsulfóxido

dNTP: *Deoxynucleotide triphosphate*

dpf: Días post fecundación

dpi: Días post-inyección

ECACC: *The European Collection of Authenticated Cell Cultures*

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

FBS: *Fetal bovine serum*

FGF: *Fibroblast growth factors*

g: gramos

GBM: Glioblastoma

GBM-Cre: Línea celular de GBM transducida con el vector pRetroQ-Cre-ERT2

GBM Cre-HOXD1: Línea celular de GBM transducidas con los vectores pRetroQ-Cre-ERT2 y pLVX-HOXD1.

GBM CRE-Stuffer: Línea celular de GBM transducidas con los vectores pRetroQ-Cre-ERT2 y pLVX-Stuffer.

GEO: *Gene Expression Omnibus*

GSC: *Glioblastoma Stem Cells*

H3K27me3: Tri-metilación de la lisina 27 en la histona 3.

H3K4me3: Tri-metilación de la lisina 4 en la histona 3.

hiPSC: *Human Induced Pluripotent Stem Cell*

IARC: *The International Agency for Research on Cancer*

IDH: Isocitrato Deshidrogenasa

IDHmut: IDH mutante

IDHwt: IDH tipo salvaje

IvyGAP: *Ivy Glioblastoma Atlas Project*

LB: Luria Broth

LGG: *Low Grade Glioma*

m/v: Masa/volumen

MES: Fenotipo Mesenquimal de Glioblastoma

MGMT: O<sup>6</sup> metilguanina DNA metil transferasa

min: Minutos

miRNA: Micro ARN

mL: Mililitros

mm: milímetros

MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

mV: Milivolt

NDM: medio de diferenciación neural

NEM: medio de expansión neural

ng: Nanogramos

NSC: *Neural Stem Cell*

ORF: *Open Reading Frames*

P/S: Penicilina/estreptomicina

p/v: peso/volumen

pb: Pares de base



PBS: Tampón fosfato salino

PBST: Tween-20 al 0,1 % en PBS

PN: Fenotipo Proneural de Glioblastoma

PTU: Feniltiourea

RCF: Fuerza centrífuga relativa

REMBRANDT: *Repository for Molecular Brain Neoplasia Data*

RISC: *RNA-induced silencing complex.*

RPM: Revoluciones por minuto

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

Seq: Secuenciación

SNC: Sistema Nervioso Central

SOC: Medio Súper Óptimo con Represión de Catabolitos

spc: semana post concepción

TCGA: *The Cancer Genome Atlas*

TMZ: Temozolomida

U: Unidad de actividad enzimática

UTR: *Untranslated Region*

v/v: volumen/ volumen

Wnt: Señalización Wnt

$\mu\text{F}$ : microfaradio, unidad de medida de capacidad eléctrica

$\mu\text{g}$ : Microgramos

$\mu\text{L}$ : Microlitros

$\mu\text{M}$ : Micromolar

$\Omega$ : ohm Resistencia Eléctrica

## Nomenclatura

### Genes y proteínas

- Murino: Los genes y proteínas murinas se denominarán con la primera letra en mayúscula. Irán en cursiva sólo cuando se refieran a genes o transcritos de esta especie.
- Humano: Los genes y proteínas humanas se denominarán completamente en mayúscula. Irán en cursiva sólo cuando se refieran a genes o transcritos de esta especie.

Ejemplo: gen humano *HOXD1*, gen ratón *Hoxd1*

## RESUMEN

El glioblastoma es el tumor cerebral más agresivo, invasivo e indiferenciado entre los gliomas, designado grado IV por la OMS. Hasta la fecha, no se han desarrollado terapias efectivas para su erradicación, por lo que el tiempo de supervivencia de los pacientes no supera los 15 meses. En la búsqueda de terapias más efectivas, las células madre cancerígenas (CSC), distintivas de este tipo de tumores, son un objetivo terapéutico prometedor. Estas células tienen potencial para autorrenovarse, diferenciarse y formar tumores con características similares al tumor primario. Por tanto, se asocian con aparición, progresión, invasión, resistencia al tratamiento y mal pronóstico clínico del tumor. Los genes HOX codifican una amplia familia de factores de transcripción que, además de desempeñar un papel central durante el desarrollo embrionario, se han asociado con el desarrollo y progresión de diferentes tipos de cáncer, incluido el glioblastoma. Los genes HOX pueden funcionar como moduladores tumorales desempeñando un papel supresor tumoral o un papel oncogénico. Su desregulación contribuye a la adquisición de un fenotipo CSC. Nuestra hipótesis es que la activación de la expresión de genes HOX supresores de tumores puede inducir la diferenciación de las células madre de glioblastoma (GSC). En el presente estudio, nuestro objetivo es identificar un gen HOX supresor tumoral con el potencial de inducir la diferenciación de GSC. Para ello, empleamos múltiples enfoques bioinformáticos, utilizando datos transcriptómicos y clínicos de pacientes con gliomas de diferentes grados tumorales, obtenidos de diferentes bases de datos

públicas como TCGA. Los resultados sugieren que *HOXD1* exhibe el perfil de expresión de un gen supresor tumoral, esta correlacionado con marcadores de pronóstico positivo y se asocia a un fenotipo diferenciado. Para validar estos resultados, realizamos varios enfoques *in vitro* utilizando diferentes modelos de líneas celulares de glioblastoma. Demostramos que la activación de la expresión de *HOXD1* reduce las características troncales en estas líneas celulares. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la activación de la expresión de *HOXD1* puede inducir la diferenciación de GSC, previniendo así la progresión de este tumor.

## **ABSTRACT**

Glioblastoma is the most aggressive, invasive, and undifferentiated brain tumor among gliomas, designated grade IV by the WHO. To date, effective therapies for its eradication have not been developed, as a consequence the survival time for patients does not exceed 15 months. In the quest for more effective therapies, cancer stem cells (CSCs), distinctive of these types of tumors, are a promising therapeutic target. These cells have the potential for self-renewal, differentiation, and form tumors with characteristics similar to the primary tumor. Therefore, they are associated with tumor emergence, progression, invasion, resistance to treatment, and poor clinical prognosis. The HOX genes encode a broad family of transcription factors that, in addition to playing a central role during embryonic development, have been associated with the development and progression of different types of cancer, including glioblastoma. HOX genes can function either as tumor modulators by playing a tumor suppressor role or have an oncogenic role. Their deregulation contributes to the acquisition of a CSC phenotype. We hypothesize that the activation of the expression of tumor suppressor HOX genes can induce glioblastoma stem cells (GSC) differentiation. In the present study, we aiming to identify a tumor suppressor HOX gene with the potential to induce the differentiation of GSCs. For this purpose, we employed multiple bioinformatic approaches, using transcriptomic and clinical data of patients with gliomas of different tumor grades,

from different public database such as TCGA. The results suggest that *HOXD1* exhibits the expression profile of a tumor suppressor gene, is correlated with positive prognostic markers and is associated with a differentiated phenotype. To validate these results, we conducted various *in vitro* approaches using different glioblastoma cell models. We demonstrated that the activation of *HOXD1* expression reduces stem-like characteristics in these cell lines. Taken together, our results suggest that the activation of *HOXD1* expression can induce the differentiation of GSCs, thus preventing the progression of this tumor.

# INTRODUCCIÓN

## **Glioblastoma**

Los gliomas corresponden a los tumores más comunes del sistema nervioso central (SNC), y representan casi el 80% de todos los tumores cerebrales primarios malignos (Agnihotri et al., 2013; Messali et al., 2014; Schwartzbaum et al., 2006). El glioblastoma (GBM) es el tipo de glioma primarios más frecuente, representando más del 60% de todos los tumores cerebrales en adultos (Rock et al., 2012).

Según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), los gliomas pueden ser clasificados en cuatro grados (I, II, III y IV) en función del nivel de malignidad que se determina según los criterios histopatológicos y moleculares (Louis et al., 2007; Louis et al., 2016; Sejda et al., 2022; Torp et al., 2022). En relación con los criterios histopatológicos, se ha descrito que los gliomas de grado II y III presentan una alta actividad mitótica y anaplasia histológica (Sejda et al., 2022; Torp et al., 2022). Adicionalmente, los tumores de grado III se evidencia aumento de la densidad celular y mayor atipia nuclear. Inclusive en estos tumores es posible evidenciar células tumorales multinucleadas y mitosis anormales. Los tumores grado IV del SNC presentan necrosis y/o proliferación microvascular, además de las características descritas para los tumores de grado III. Cabe destacar que, los tumores grado IV también se caracterizan por una rápida evolución pre y post-operatoria con desenlace fatal (Louis et al., 2007). La clasificación más reciente

de los tumores de SNC, que considera características histopatológicas y moleculares, describe 6 grupos de gliomas (Sejda et al., 2022; Torp et al., 2022). El glioblastoma uno de los tres tipos de tumores que componen el grupo de gliomas difusos de tipo adulto, además de los oligodendrogliomas y los astrocitomas. En esta actualización, al igual que otras versiones previas, se destaca que el GBM es un glioma altamente invasivo e indiferenciado y ha sido designado grado IV por la OMS (Louis et al., 2007; Louis et al., 2016; Rock et al., 2012).

## **Clasificaciones moleculares de gliomas y GBM**

Previamente las clasificaciones de los gliomas se definían principalmente por las características histológicas del tumor, sin embargo, estas clasificaciones no representaban la heterogeneidad de los gliomas, incluyendo el GBM (Masui et al., 2016). Los avances en genética y transcriptómica han posibilitado caracterizar las variabilidades biológicas y clínicas de los gliomas, permitiendo describir nuevos tipos de clasificación en base a marcadores moleculares que se han incorporado desde la revisión del año 2016 (Louis et al., 2016). La última actualización de estas clasificaciones corresponde a la revisión del año 2021 (Sejda et al., 2022; Torp et al., 2022). En estas, se destacan marcadores como el estado del gen de la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH), estado de metilación del promotor *MGMT* y co-delección de los cromosomas 1p/19q. Otras clasificaciones relevantes asociadas al estudio del GBM, corresponden al subtipo molecular y al origen del tumor.

Una de estas clasificaciones más relevantes en glioma, incluyendo el GBM,



corresponde al estado de la enzima IDH, la cual puede estar en su forma nativa (IDHwt) o bien mutada (IDHmut) (Yan et al., 2009). Esta clasificación es importante en la determinación del pronóstico de vida los pacientes con gliomas, ya que pacientes con IDHmut tienen un pronóstico de vida más favorable (Balss et al., 2008; Taylor et al., 2013; Yan et al., 2009). Se ha descrito que la mutación de IDH induce un fenotipo muy particular en gliomas, conocido como fenotipo metilador de islas CpG (G-CIMP, por sus siglas en inglés *CpG island methylator phenotype*) (Noushmehr et al., 2010; Turcan et al., 2012). Esto ocurre debido a la acumulación de un oncometabolito 2-D-hidroxioglutarato (2HG) que interfiere con las hidroxilasas dependientes de hierro, incluida la familia TET de 5-metil citosina hidroxiladas. Las enzimas TET catalizan la eliminación de la metilación del ADN, por lo que su inhibición aumenta la metilación del ADN y genera un fenotipo G-CIMP (Figueroa et al., 2010; Lu et al., 2012; Turcan et al., 2012). Adicionalmente, el 2-HG inhibe las histonas desmetilasas, lo que contribuye aún más a este fenotipo (Lu et al., 2012). Los mecanismos detrás del mejor pronóstico del fenotipo G-CIMP aún no se han dilucidado completamente, no obstante, investigaciones han descrito que G-CIMP se asocia con una supresión general de la expresión génica, incluyendo genes que contribuyen a la progresión tumoral (Malta et al., 2018; Wick et al., 2013). Cabe destacar que, debido a la relevancia molecular y clínica asociada al marcador IDH, en la última actualización de las clasificaciones de tumores del SNC del año 2021, se definió que IDHwt es el marcador molecular específico para los glioblastomas. En consecuencia, los otros gliomas difusos, correspondientes a oligodendrogliomas y astrocitomas, presentan IDHmut (Sejda et al., 2022; Torp et al., 2022).

La identificación de los subtipos moleculares es otra clasificación destacada en el

estudio del GBM. Estudios basados en las características transcripcionales de los tumores identificaron tres subtipos moleculares: proneural (PN), clásico (CL) y mesenquimal (MES) (Verhaak et al., 2010; Wang et al., 2017). Se ha descrito que en los tumores de GBM pueden coexistir células tumorales con diferente subtipo molecular (Sottoriva et al., 2013; Wang et al., 2017) . Sin embargo, en pacientes con tumores de baja heterogeneidad se han descrito diferencias en la supervivencia asociada al tipo de subtipo molecular, dentro de los cuales pacientes con subtipo PN tienen un mejor pronóstico de supervivencia y pacientes con el subtipo MES tienen peor pronóstico (Huse et al., 2011; Sidaway, 2017; Z. Wang et al., 2021; Zheng et al., 2012). Con respecto a las características moleculares de estos subtipos, cabe destacar que el perfil de expresión de cada uno se asocia a perfiles de expresión celulares diferentes. Así, el subtipo PN asemeja al perfil de expresión de oligodendrocitos, el subtipo CL se asemeja al perfil de expresión de astrocitos y el subtipo MES se asocia un fenotipo mesenquimal (Verhaak et al., 2010; Wang et al., 2017). Se ha descrito que la mayoría de los GBM primarios muestra un cambio de subtipo molecular en la reincidencia del tumor, en donde el subtipo MES es el más estable. Este cambio de subtipo molecular es reconocido como un mecanismo de transición adaptativa hacia un fenotipo más resistente a radioterapias (Fedele et al., 2019; Ozawa et al., 2014; Sottoriva et al., 2013).

El origen del GBM es otra clasificación relevante para el estudio de este cáncer. Se ha descrito que los GBMs pueden emerger como tumores primarios o secundarios, que evolucionan a través de diferentes vías genéticas, afectan a pacientes de diferentes edades y tienen diferentes respuestas a tratamiento (Kleihues & Ohgaki, 2000; Ohgaki & Kleihues, 2013). Los GBM primarios, o de *novo*, representan el 80%

de los GBM y ocurren en pacientes mayores (edad promedio, 62 años). Los GBM secundarios se desarrollan a partir de astrocitomas u oligodendrogliomas de menor grado y ocurren en pacientes más jóvenes (edad promedio, 45 años) (Kleihues & Ohgaki, 2000; Ohgaki et al., 2004; Ohgaki & Kleihues, 2009).

Otras clasificaciones importantes en el pronóstico de los pacientes con gliomas, corresponden al estado de metilación del promotor de la O<sup>6</sup> metilguanina DNA metil transferasa (MGMT) y la integridad de los cromosomas 1 y 19 (Louis et al., 2016). El silenciamiento epigenético por metilación del promotor de *MGMT* es de interés clínico por su valor pronóstico y predictivo de respuesta a tratamiento con agentes alquilantes (Hegi et al., 2004; Hegi et al., 2005; Rivera et al., 2010). Esto se debe a que la enzima MGMT repara el daño en el ADN causado por los agentes alquilantes, como la Temozolomida (TMZ), que se usa para tratar pacientes con GBM, desempeñando un papel clave en la resistencia de las células tumorales al efecto citotóxico de los agentes alquilantes. Por su parte, la co-delección de los brazos cromosómicos 1p y 19q (1p/19q), han mostrado valores pronósticos y/o predictivos favorables en relación con pacientes con estos cromosomas intactos (Cairncross et al., 1998; Eckel-Passow et al., 2015; van den Bent et al., 2003). A pesar de su relevancia clínica, no se ha dilucidado por completo el mecanismo asociado a su beneficioso pronóstico (Yao et al., 2020). En la última revisión clínica se describió que la co-delección 1p/19q es un marcador molecular indicativo de oligodendrogliomas.

## **Incidencia de gliomas y GBM**

Las tasas de incidencia de glioma varían significativamente según el tipo histológico, la edad en el momento del diagnóstico, el sexo, la raza y el país. Adicionalmente, la falta de una definición consistente de glioma, así como las diferencias en las técnicas de recopilación de datos, pueden dificultar la comparación de las tasas de incidencia de diferentes fuentes. Las tasas generales de incidencia ajustadas por edad (ajustadas a la población nacional de cada estudio respectivo) para todos los gliomas oscilan entre 4,67 y 5,73 por 100 000 personas (Gousias et al., 2009; Larjavaara et al., 2007). En particular, la tasa de incidencia ajustada por edad para el GBM es de 0.59 a 3.69 por 100,000 personas, dependiendo del país/organización informante (Ostrom et al., 2015). Adicionalmente, se ha establecido que la incidencia más alta corresponde al rango etario de 75 a 84 años (Tamimi & Juweid, 2017). Datos analizados en GLOBOCAN, correspondiente a una base de datos de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), indican que la incidencia de tumores cerebrales y del SNC se duplicará dentro de los próximos 20 años. Considerando que los gliomas y el glioblastoma constituyen una gran proporción de los tumores cerebrales malignos, dicha proyección debería reflejar un aumento de la incidencia de estos tumores para el año 2040 (Ferlay et al., 2018). Por lo tanto, la baja tasa de supervivencia y el aumento de la incidencia de este cáncer posicionan al GBM como un importante problema de salud pública a nivel internacional.

A pesar de los avances en los tratamientos combinados que consisten en radiación y quimioterapia después de la resección quirúrgica, el pronóstico de los pacientes

afectados con esta enfermedad sigue siendo desalentador, ya que los pacientes que desarrollan este tipo de tumor poseen un tiempo de supervivencia que no supera los 15 meses (Nakada et al., 2007). Una mejor comprensión del mecanismo que subyace a la iniciación y progresión del GBM a nivel molecular y celular abrirá nuevas oportunidades para desarrollar estrategias terapéuticas más eficientes.

## **Células Madre Cancerígenas**

En la búsqueda para explicar la proliferación celular del cáncer, se estableció la hipótesis del modelo jerárquico que propone que un subconjunto de células dentro del tumor, células madre cancerígenas (CSC del inglés *Cancer Stem Cells*), tienen una capacidad de proliferación significativa (Reya et al., 2001). Además, estas células tienen la capacidad de generar nuevos tumores que se asemejan al tumor primario recapitulando características genéticas e histopatológicas (Reya et al., 2001; Singh et al., 2004). En cambio, las otras células que forman parte del tumor son células cancerígenas diferenciadas terminalmente. Así, la teoría jerárquica propone similitudes del desarrollo tumoral con el desarrollo embrionario, en el cual las células progenitoras dan origen a células diferenciadas (Couturier et al., 2020; Dell'Albani, 2008; Reya et al., 2001).

Las CSC fueron primeramente identificadas en Leucemia mieloide aguda (Bonnet & Dick, 1997) y hasta la fecha se han identificado en muchos diferentes tipos de tumores sólidos (Gupta et al., 2019; Visvader & Lindeman, 2008), incluyendo

tumores cerebrales como astrocitoma anaplásico (Ignatova et al., 2002), meduloblastoma, ependimoma (Hemmati et al., 2003; Singh et al., 2003) y glioblastoma (Galli et al., 2004; Hemmati et al., 2003).

Pese a que el porcentaje de CSC es bajo, con una variación de 1-25% de los tumores cerebrales (Singh et al., 2003), durante los últimos años, se han convertido en un interesante blanco terapéutico (Couturier et al., 2020; Prager et al., 2020; Z. Wang et al., 2021). Esto, debido a que numerosos estudios han demostrado que las CSC se asocian con iniciación tumoral, progresión, invasión, resistencia a tratamiento y pobre pronóstico clínico (Batlle & Clevers, 2017; da Silva-Diz et al., 2018; Meacham & Morrison, 2013; Z. Wang et al., 2021). Particularmente en GBM se ha demostrado que las CSC presentan un alto grado invasivo (Galli et al., 2004) y son resistentes a varios agentes quimioterapéuticos como la TMZ (Beier et al., 2012; Kang & Kang, 2007), agente quimioterapéutico estándar para el tratamiento de GBM. Esto permite que las células sobrevivan a la terapia, lo que lleva a la recurrencia de la enfermedad y a un pobre pronóstico (J. Chen et al., 2012; Lathia et al., 2011; Z. Wang et al., 2021).

Diversas investigaciones han establecido el origen de las CSC, indicando que éstas pueden originarse a partir de la transformación de una célula madre/progenitor residente en tejidos normales o por la reprogramación de células diferenciadas (Campbell & Polyak, 2007; Krivtsov et al., 2006). Se ha demostrado que en gliomas las CSC pueden generarse a partir células madre neurales normales (NSC del inglés *Neural Stem Cells*) (Dell'Albani, 2008; Lee et al., 2018; X. Wang et al., 2021), las cuales dan origen a los linajes de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Gage et al., 1995; Loeffler & Potten, 1997). Las NSC se encuentran en pequeñas

cantidades en regiones específicas del cerebro adulto como la zona subventricular (Eriksson et al., 1998) de los ventrículos laterales del cerebro anterior y en la circunvolución dentada del hipocampo [11]. También, se ha demostrado que las CSC pueden derivar del linaje glial, como los astrocitos, los cuales pueden comportarse como NSC en condiciones determinadas (Doetsch et al., 1999; Laywell et al., 2000; Nunes et al., 2003).

Las células madre de glioblastoma (GSC del inglés *glioblastoma Stem Cells*) y las NSC presentan varias similitudes. Entre ellas, destaca la expresión de marcadores de células madres neurales, como CD133 (glicoproteína de membrana presente en diversos tipos de célula madre) (Hemmati et al., 2003), SOX2 (factor de transcripción esencial en el mantenimiento de la auto-renovación de las células madre) (Hemmati et al., 2003), Nanog (factor de transcripción necesario para mantener la pluripotencia y suprimir factores de determinación de identidad celular) (Ben-Porath et al., 2008) y Nestina (una proteína de filamento intermedio tipo VI) (Tunici et al., 2004), entre otros (Z. Wang et al., 2021). Además, las NSC y las GSC poseen la capacidad de auto-renovarse, de diferenciarse y la capacidad de formar neuro-esferas/tumor-esferas (Schonberg et al., 2014; Vescovi et al., 2006; Vora et al., 2015).

En la búsqueda de nuevos tratamientos para el GBM, se han desarrollado distintas estrategias terapéuticas enfocadas en las GSC (Esparza et al., 2015; Muftuoglu & Pajonk, 2021; Zhang et al., 2015). Una de ellas es inducir la diferenciación de las células madre cancerígenas en tumores malignos seleccionados (Sell, 2006). El ácido retinoico (AR) es el agente diferenciador más común en la práctica clínica y se ha utilizado con éxito para tratar la leucemia promielocítica aguda, una neoplasia

maligna de células madre (Jurcic et al., 2007). La actividad antitumoral del AR se debe a la activación de un programa genético aun parcialmente definido que modula la proliferación, diferenciación y muerte celular (Mongan & Gudas, 2007). El AR activa los receptores retinoides nucleares, y los genes modulados contienen elementos sensibles a los retinoides (Langston & Gudas, 1994). Así, AR actúa en un conjunto de genes, incluyendo los genes HOX, que influyen en múltiples vías de señalización involucradas en el mantenimiento de células madre, la diferenciación de células específicas del linaje y la organogénesis durante el desarrollo (Hombria & Lovegrove, 2003). Se han descrito resultados mixtos con respecto a la eficacia de la terapia con AR en la mayoría de los tumores malignos sólidos, incluido el GBM (Milanovic et al., 2007; Milanović et al., 2014; Ying et al., 2011). Por lo tanto, se necesitan más estudios para comprender los mecanismos moleculares en respuesta al tratamiento con AR, lo cual permitirá el desarrollo de mejores estrategias terapéuticas para la diferenciación celular inducida.

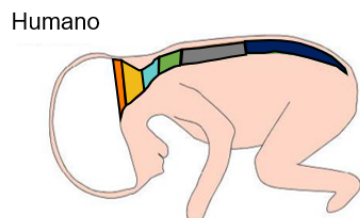
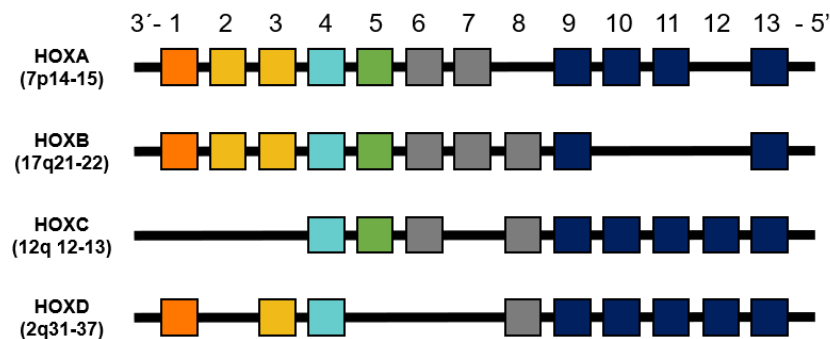
## **Genes HOX**

Los genes HOX, son un grupo de factores de transcripción que poseen un dominio conservado de unión al ADN, conocido como Homeodominio (Freund & McInnes, 1995). Estos factores de transcripción se descubrieron por primera vez en *Drosophila*, y posteriormente se demostró que están ampliamente distribuidos, presentes en todos los animales con simetría bilateral (Garcia-Fernandez, 2005). En humanos existe un total de 39 genes HOX que residen en cuatro complejos de



genes parálogos (A, B, C, D) los que se encuentran en cuatro cromosomas diferentes (HOXA en 7p14-15, HOXB en 17p21-22, HOXC en 12q12-13 y HOXD en 2q31-37) (Maconochie et al., 1996) (Figura 1 A).

Los genes HOX actúan como reguladores críticos del crecimiento y la diferenciación, del control de la identidad celular, comunicación celular, progresión del ciclo celular, hematopoyesis, además del establecimiento del patrón axial durante la embriogénesis (Hombria & Lovegrove, 2003). En este último punto, destaca la posición de los genes HOX dentro de su grupo, ya que su expresión, a lo largo del eje anterior-posterior corporal, sigue la dirección desde el lado 3' (anterior) al 5' (posterior) de cada complejo (Duboule, 2007) (Figura 1 B) . Su expresión temporal también está coordinada de tal manera que los genes HOX posicionados 3' en el grupo se expresan antes que aquellos en el 5' (Duboule, 2007). Además, se puede observar un fenómeno de dominancia posterior por el cual los genes posteriores son dominantes con respecto a los genes más anteriores, reprimiéndolos (Duboule & Morata, 1994).



**Figura 1: Genes HOX, organización en el genoma y su expresión en el eje anteroposterior corporal en humanos.** A. Se ilustran los cuatro grupos genómicos de genes HOX en humanos, detallando su posición en el genoma humano y especificando los genes parálogos de cada complejo. B. Se ilustra la expresión de los genes HOX parálogos en el eje anteroposterior del humano en desarrollo. (modificado de Lappin y col. (Lappin et al., 2006).

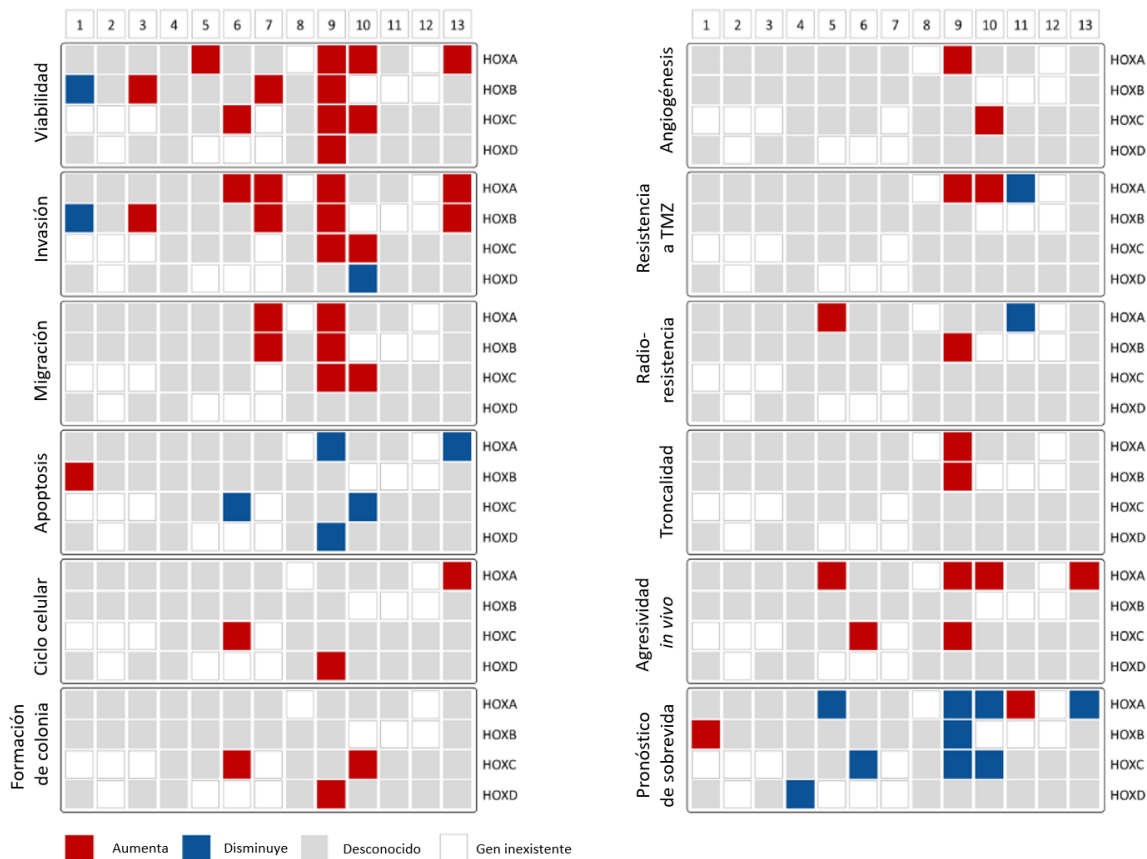
La expresión coordinada de los genes HOX está regulada por señales clave de desarrollo dentro del embrión, incluidos los ligandos Wnt, el AR y la familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Montavon & Soshnikova, 2014; Young & Deschamps, 2009). Adicionalmente, se han descrito parámetros estructurales y epigenéticos que contribuyen a la regulación de la expresión de genes HOX. Estos incluyen elementos reguladores en cis (potenciadores y ARN no codificantes), modificaciones de histonas y nivel de compactación de la cromatina (Noordermeer & Duboule, 2013). Así, por ejemplo, durante el desarrollo, la determinación del destino celular y el establecimiento de la memoria epigenética de células diferenciadas se logra mediante la metilación de los residuos de histona H3 por las proteínas del grupo Trithorax (TrxG) y Polycomb (PcG), que establecen las marcas H3K4me3 activas y H3K27me3 represivas, respectivamente. (Ehrlich & Lacey, 2013; Ringrose & Paro, 2007).

## Genes HOX, cáncer y CSC

La fidelidad de la expresión de genes HOX en las células madre y sus progenies diferenciadas es importante para la homeostasis del tejido normal. En consecuencia, la alteración de la expresión normal de genes HOX puede desempeñar un papel crítico en el desarrollo del cáncer (Bondos et al., 2020; Shah & Sukumar, 2010). En este sentido, diversos estudios han demostrado que los genes HOX están involucrados en el desarrollo de cáncer de mama (Lee et al., 2015; Zheng et al., 2018), de pulmón (Clemenceau et al., 2018; Liu et al., 2018), de ovario (Idaikkadar et al., 2019; Li et al., 2009), pancreático (Kuo et al., 2019; Tsuboi et al., 2017) hepático (He et al., 2021; Quagliata et al., 2018) y GBM (Abdel-Fattah et al., 2006; Gonçalves et al., 2020), entre otros (Feng et al., 2021). Se ha demostrado que los genes HOX que se desregulan pueden funcionar como moduladores tumorales al desempeñar tanto un rol supresor tumoral como un rol oncogénico, donde los genes con rol supresor tumoral participan estableciendo la identidad celular, y los pro-tumorales están normalmente silenciados en células diferenciadas (Abate-Shen, 2002; Bhatlekar et al., 2018). Por lo tanto, la participación de los genes HOX en cáncer es compleja, ya que los mecanismos de desregulación de genes HOX específicos difieren entre los distintos tipos de cáncer (Shah & Sukumar, 2010).

En GBM, Abdel-Fattah y col. [111] analizaron la expresión de genes HOX en astrocitos normales y astrocitos neoplásicos. Ellos demostraron que los genes HOX en estado silente en astrocitos normales (*A6, A7, A9, A13, B13, D4, D9, D10, y D13*)

son regulados positivamente en diferentes muestras de astrocitomas y GBM, sugiriendo un rol de estos genes en tumorigénesis cerebral (Abdel-Fattah et al., 2006). Investigaciones posteriores en gliomas suman evidencia de la desregulación del perfil normal de expresión de los cuatro grupos genómicos que contemplan los genes HOX (A. M. Buccoliero et al., 2009; Costa et al., 2010; Duan et al., 2015; Okamoto et al., 2007; Tabuse et al., 2011; Wang et al., 2019; Xu et al., 2018; Yang et al., 2019; Zhao et al., 2017). Estos estudios demuestran que la mayoría de los genes HOX tienen un rol oncogénico en gliomas (Gonçalves et al., 2020) (Figura 2). En el presente, los únicos genes HOX descritos como potenciales genes con rol supresor tumoral son *HOXB1* (Han et al., 2015), *HOXD10* (Hu et al., 2013) y *HOXA11* (Se et al., 2017). Sin embargo, el rol de *HOXD10* y *HOXA11* es controversial (Duan et al., 2015; Li et al., 2021).



**Figura 2: Mapa calórico que ilustra los principales roles funcionales de los genes HOX en gliomas y su valor pronóstico clínico.** La regulación de la viabilidad celular, invasión, migración, apoptosis, ciclo celular, formación de colonias, angiogénesis, resistencia a TMZ y a radioterapia, y troncalidad están asociados con malignidad *in vitro* e *in vivo*. Los colores rojo y azul en el mapa de calor indican efectos aumentados y disminuidos, respectivamente, tras la expresión del gen HOX correspondiente. El color gris indica efectos desconocidos. Las celdas vacías representan la ausencia del parálogo respectivo en ese grupo (modificado de (Gonçalves et al., 2020)).

El papel de los genes HOX en el mantenimiento de la identidad celular limita la capacidad de las células para la transición entre diferentes fenotipos. Así, la desregulación de la normal expresión de genes HOX conduce a la adquisición de la plasticidad fenotípica lo que puede hacer que las células vuelvan a adquirir la capacidad de auto-renovación y el fenotipo de las células madre, contribuyendo al inicio del tumor (Abate-Shen, 2002; Bhatlekar et al., 2014, 2018). Adicionalmente, la regulación epigenética aberrante, descrita en las células cancerígenas, puede alterar la expresión de los genes HOX, contribuyendo a la plasticidad de CSC (Rodrigues et al., 2016; Shah & Allegrucci, 2013; Wainwright & Scaffidi, 2017). En este sentido, se ha demostrado que la desregulación de la expresión normal de genes HOX en GBM conduce a la adquisición de un fenotipo de células madre. Se ha reportado que la expresión aberrante de *HOXA9*, *HOXA10* y *HOXB9* mantiene

la troncalidad de GSC (Fang et al., 2014; Gallo et al., 2013; Murat et al., 2008). También, se ha descrito una mayor expresión de *HOXC9* y *HOXD9* en CSC obtenidas de muestras de pacientes con GBM (Okamoto et al., 2007; Tabuse et al., 2011).

## **Genes HOX y terapias dirigidas a CSC**

La focalización terapéutica de CSC es un área de investigación en crecimiento, y pese a que los genes HOX son un interesante blanco terapéutico, el diseño de una terapia con enfoque en estos genes presenta también un gran desafío (Harris et al., 2012; Smith et al., 2019). Por ejemplo, pese a que el tratamiento con AR es efectivo en modular la expresión de genes HOX e inducir diferenciación de CSC, se han reportado resultados mixtos con esta terapia en GBM. Esto se debe a que el AR induce la expresión de genes HOX indistintamente, aumentando la expresión de genes con rol oncogénico, como *HOXB7*, generando efectos contrarios a los deseados [32, 33]. Frente a esta problemática, una alternativa posible es activar específicamente la expresión de los genes HOX que tengan un rol supresor de tumor con el potencial para inducir diferenciación de GSC. A este respecto, sería interesante evaluar si los genes HOX que promueven la diferenciación de las NSC, pueden actuar como genes supresores de tumores e inducir diferenciación de las GSC a un fenotipo más diferenciado y menos agresivo. No obstante, y debido a que los genes HOX se expresan ampliamente en el embrión, históricamente ha sido

difícil evaluar su rol en el desarrollo del SNC (Philippidou & Dasen, 2013), por lo cual se conoce poco sobre su rol en el desarrollo del cerebro. Hasta la fecha se ha reportado que los genes HOX, particularmente los genes parálogos HOX1-HOX5, están involucrados con el desarrollo de estructuras del cerebro posterior, y que mutaciones en diferentes componentes de estos genes parálogos (*HOXA1*, *HOXA2*, *HOXA3*, *HOXB1*, *HOXB2*, *HOXB3*, *HOXD1* y *HOXC3*) exhiben defectos en la segmentación del cerebro posterior provocando una especificación errónea, desorganización y proyecciones anormales de las neuronas motoras (Gavalas et al., 2003; Gouti & Gavalas, 2008; McNulty et al., 2005; Philippidou & Dasen, 2013; Louise V. Wolf et al., 2001). Por otro lado, existe evidencia controversial que sugiere que algunos genes HOX podrían expresarse en diversas zonas cerebrales durante el desarrollo (Louise V. Wolf et al., 2001) e inclusive se ha reportado la expresión de genes HOX en distintas zonas cerebrales de organismos adultos (Hutlet et al., 2016; Takahashi et al., 2004). Si bien la expresión de genes HOX en estructuras cerebrales sugiere un rol importante de estos genes en la homeostasis cerebral, la función de estos genes en este contexto, aun no se ha dilucidado. Por lo tanto, se desconoce si en el proceso de diferenciación de NSC a otros tipos celulares, como neuronas, astrocitos u oligodendrocitos, están involucrados los genes HOX.

Si bien en GBM no se ha explorado inducir diferenciación de las GSC mediante la manipulación de los genes HOX, esta estrategia si se ha evaluado en otros tipos de cáncer (Klein et al., 2013; Manohar et al., 1996; Wang et al., 2001). Por ejemplo, se ha demostrado que diferentes genes HOX con rol supresor tumoral, como *HOXA5* (Teo et al., 2016) *HOXC8* (Shah et al., 2017) y *HOXD10* (Carrio et al., 2005), son determinantes para inducción de la diferenciación en cáncer de mama.

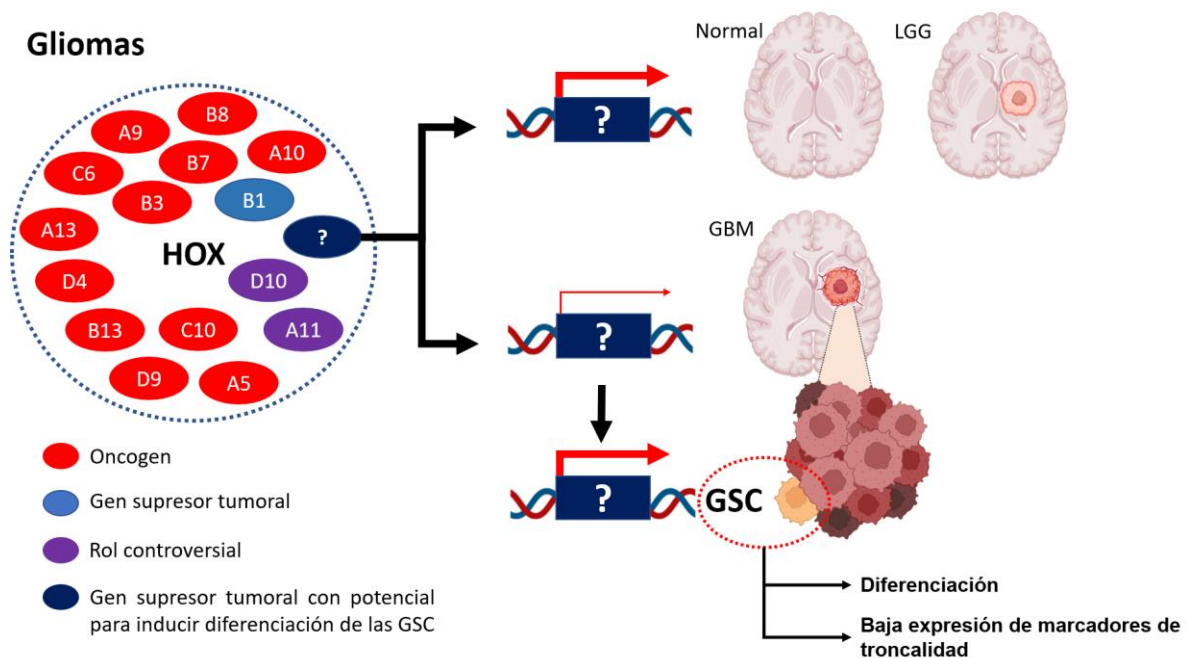
De igual manera, se ha inducido diferenciación de CSC de un modelo celular de leucemia, mediante la inducción de la expresión de *HOXB1* (Petrini et al., 2013). En consecuencia, estos estudios sugieren que el restablecimiento de la expresión de genes HOX con rol supresor tumoral y potencial rol diferenciador de las GSC, sería una interesante estrategia terapéutica para el GBM.

En relación con los antecedentes aportados hasta aquí, podemos formular una hipótesis de trabajo y una serie de objetivos que conducirán a un mejor entendimiento del rol de los genes HOX en la biología del GBM. A este respecto, nos hemos propuesto evaluar datos transcriptómicos de pacientes con gliomas de distintos grados tumorales, disponibles en distintas bases de datos públicas. Nuestro objetivo es aprovechar estos valiosos recursos para dilucidar si algún gen HOX, cuyo rol no se haya descrito en la literatura, tiene el perfil de expresión-desregulación descrito para los genes con rol supresor tumoral. Pretendemos desarrollar diferentes aproximaciones bioinformáticas, que han sido ampliamente usadas en el estudio de los genes HOX y su rol en cáncer, para elegir un gen HOX con potencial supresor tumoral y estudiar su relación con el fenotipo de GSC.



# HIPÓTESIS

La inducción de la expresión de genes HOX supresores de tumores en células madre de glioblastoma conduce a su diferenciación, reduciendo la agresividad del glioblastoma.



**Figura 3: Resumen gráfico de la hipótesis de trabajo.** El proyecto de tesis plantea que la inducción de la expresión de genes HOX supresores tumorales, los cuales presentan una baja expresión en GBM en comparación con tejido cerebral normal o LGG, puede inducir diferenciación de las GSC.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar mediante aproximaciones bioinformáticas un potencial gen HOX supresor tumoral que pueda inducir diferenciación de las células madre de glioblastoma, y validar su función mediante aproximaciones *in vitro*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**Objetivo 1: Identificar genes HOX con potencial rol supresor tumoral en glioblastoma mediante aproximaciones bioinformáticas**

**Objetivo 2: Evaluar el potencial de un gen supresor tumoral candidato seleccionado para inducir diferenciación en el contexto del desarrollo del sistema nervioso y de células madre de glioblastoma**

**Objetivo 3: Determinar mediante aproximaciones *in vitro* los niveles de la expresión del potencial gen supresor tumoral en muestras de glioblastoma y evaluar el efecto de la inducción de su expresión en las células madre de glioblastoma**

**Objetivo 4: Determinar mediante aproximaciones bioinformáticas posibles mecanismos involucrados en el silenciamiento del potencial gen HOX supresor tumoral candidato en pacientes con glioblastoma**

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Metaanálisis en pacientes con glioma

Para la búsqueda de un potencial gen HOX con rol supresor tumoral, se analizaron datos genómicos de GBM de diferentes bases de datos. Adicionalmente, se examinaron datos de cerebro en desarrollo y cerebro de individuos adultos. Todas estas bases de datos contenían diferentes cohortes de muestras normales o de pacientes, las cuales son independientes entre sí. La información utilizada en este estudio, disponible en cada base de dato, se detalla a continuación:

- ***The Cancer Genome Atlas (TCGA)***: Esta base de datos pública del cáncer se generó a partir de un esfuerzo conjunto de las instituciones *National Cancer Institute*, *National Human Genome Research Institute*, *National Institutes of Health*, y de *Department of Health and Human Services*. Esta colaboración ha permitido la recopilación y generación de datos genómicos de 200 tipos de cáncer, entre ellos gliomas de diferentes grados, incluyendo al GBM. Para los gliomas, encontramos disponibles datos de expresión génica de RNA-Seq, datos de número de copia, de miRNA y de metilación. Además, encontramos datos clínicos, tales como como el tiempo de sobrevida y clasificaciones según diferentes tipos de marcadores moleculares. El universo de pacientes contempla 519 pacientes con gliomas

de bajo grado ( LGG del inglés low grade gliomas), incluyendo grado II y III, y 173 pacientes con GBM.

La descarga de los datos se realizó a partir de cBioportal, disponible en <https://www.cbioportal.org/>, o desde Xenabrowser, disponible en <https://xenabrowser.net/>

- **Chinese Glioma Genome Atlas (CGGA):** Esta es una base de datos exclusiva de gliomas, la cual surgió de la colaboración de diferentes instituciones chinas, las cuales son *Beijing Neurosurgical Institute, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, China National Clinical Research Center for Neurological Diseases, Center of Brain Tumor y Beijing Institute for Brain Disorders*. Esta base almacena datos de expresión génica de RNA-seq y microarrays, datos de miRNA y datos clínicos junto con la caracterización de marcadores moleculares clásicos en el estudio del GBM. El universo de pacientes contempla 184 pacientes con LGG y 140 pacientes con GBM.

La descarga de los datos se realizó desde el siguiente enlace <http://www.cgga.org.cn/>

- **Repository for Molecular Brain Neoplasia Data (REMBRANDT):** Esta es otra base de datos exclusiva de gliomas, y se generó a partir de la colaboración de *National Cancer Institute y Nacional Institute of Neurological Disorders and Stroke*. Esta contiene datos de expresión de microarray de 161

pacientes con LGG y 179 pacientes con GBM. Además, posee datos clínicos de los pacientes mediante los cuales se determinaron los tiempos de supervivencia asociados a la expresión de los genes de interés.

La descarga de los datos se realizó desde el siguiente enlace (<https://caintegrator.nci.nih.gov/rembrandt/>).

- **Ivy Glioblastoma Atlas Project (IVYGAP):** Esta base de datos es exclusiva de pacientes con GBM y se generó mediante la colaboración entre *Ivy Foundation*, *Allen Institute for Brain Science* y *Ivy Center for Advanced Brain Tumor Treatment*. Esta posee datos de expresión de RNA-Seq de 34 tumores de pacientes con GBM. Además, esta base posee datos de expresión de 148 microdisecciones de tumores de GBM, caracterizadas por la expresión de marcadores para la identificación de putativos grupos de GSC.

Datos disponibles en el siguiente enlace:

<https://glioblastoma.alleninstitute.org/static/home>

- **ALLEN BRAIN MAP:** Esta base de datos pertenece a *Allen Institute* y contiene datos de RNA-Seq de 8-16 muestras de estructuras cerebrales de cerebro humano en desarrollo y cerebro humano de individuos adultos. Además de la herramienta en línea para la visualización de los datos, es posible la descarga de estos en el siguiente enlace. <https://portal.brain-map.org/>

- **Oncomine:** Esta base de datos contemplaba datos de expresión de microarrays de diferentes tipos de cáncer, entre ellos datos de gliomas de distinto grado. Esta web estaba destinada a ser un recurso de consulta en línea a través de su sitio web <https://www.oncomine.org/>, el cual lamentablemente dejó de funcionar en enero del año 2022.

El manejo de los datos se realizó mediante el software RStudio. Los diferentes paquetes utilizados en los diferentes tipos de análisis se detallan a continuación.

- *Heatmap.2:* para la generación de mapa de calor
- *Tidyverse:* para el cálculo de Z score y manejo general de los datos
- *Hmisc:* para análisis de correlación de Spearman.
- *Survival:* para el análisis de sobrevida.

### **Análisis de enriquecimiento**

Se consideraron los genes que correlacionaban positivamente con HOXD1 aquellos cuyo coeficiente de correlación de Spearman era superior a 0,3 con un valor  $p < 0,05$ . De igual manera, se consideraron como genes que correlacionan negativamente con HOXD1 aquellos cuyo coeficiente de correlación de Spearman fue menor a -0,3 con un valor  $p < 0,05$ . El análisis de enriquecimiento de Gene Ontology se realizó mediante la herramienta PANTHER, disponible en línea en el enlace <http://geneontology.org/>.

### **Muestras tumorales de glioblastoma**

En el marco de una colaboración de la Dra. Palma con la Dra. Pilar Sanchez,  
integrante de la unidad de Neurooncología del instituto de Salud Carlos III (ISCIII-  
UFIEC) de España, se obtuvieron como donación ADNc de muestras de pacientes con glioblastoma.

### **Cultivo celular de líneas de astrocito y GBM**

Se utilizaron las líneas celulares de glioblastoma U87 MG (ECCAC, catálogo #89081402), T98G (ECCAC, catálogo #92090213) y U251 MG (ECCAC, # catálogo 09063001). Las células se cultivaron a 37°C en 5% CO<sub>2</sub> con medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) suplementado con penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) y suero fetal bovino al 10%. Además, se utilizó la línea de astrocitos fetales humanos SVGp12 (ATCC, catálogo #CRL8621) la cual se utilizó como control de célula glial no tumoral.

### **Ensayo de formación de tumor-esferas**

Células de las líneas de glioblastoma U87, T98G y U251 Ctrl, se cultivaron en medio DMEM/F12 suplementado con 20 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (EGF; Invitrogen), 20 ng/mL de factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF; Gibco), y 1X B-27 Supplement (Gibco). Las células se cultivaron a una densidad celular de 10<sup>4</sup> células/ml en placas de 100 mm a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 7 días de cultivo, las esferas se colectaron mediante centrifugación a 1000 RCF por 3 min, y se almacenaron a -80 con Trizol para la posterior extracción de ARN.



## **Diferenciación de NSC derivadas de células pluripotentes inducidas humanas (hiPSC) a cultivos neuronales maduros**

NSC derivadas de hiPSC de 3 sujetos sanos fueron donadas por el Dr. Stevens Rehen del Instituto D'Or y la Universidad Feredal de Río de Janeiro, en el marco de una colaboración existente con las Dra. Palma y la ejecución de un proyecto Fondecyt regular. La diferenciación de hiPSC a NSC se realizó como se publicó anteriormente (Casas et al., 2018). El establecimiento de hiPSC y la derivación de las líneas NSC se realizaron de acuerdo con los estándares internacionales y con la aprobación del Consejo de Ética en Investigación (32385314.9.0000.5249). La diferenciación de NSC a redes neuronales maduras se realizó adaptando un protocolo de Shi y colaboradores (Shi et al., 2012). Las NSC se descongelaron y sembraron en placas de plástico recubiertas con Geltrex de 60 mm y se mantuvieron en medio de expansión neural (NEM; DMEM/F12 y medio Neurobasal (1:1) con suplementos de inducción neural (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EE. UU.)) hasta que alcanzaron 80-100 % de confluencia. A continuación, las NSC se despegaron de la placa con acutasa (7 min/37 °C), se centrifugaron a 300 RCF durante 4 min y se resuspendieron en NEM más 10 µM de inhibidor Rock (Y 27632; Merck). Se sembraron  $1 \times 10^6$  células en placas de petri de 35 mm recubiertas con poli L-ornitina/laminina (10 µg/mL y 2,5 µg/mL, respectivamente). Después de 48 h, el medio se reemplazó por medio de diferenciación neural (NDM; DMEM/ F12 y medio Neurobasal (1:1) suplementado con N2 1x, B27 1x, 2-Mercaptoetanol 100µM). El NDM se cambió cada dos días. Luego de 14-16 días después del cultivo en placa, las células se separaron de la placa con acutasa y se pasaron en una

proporción de 1:3 a placas revestidas con poli L-ornitina/laminina de 35 mm. Los cambios de medio se realizaron cada 2 días. Alrededor del día 30, las células se pasaron a su placa de 35 mm recubierta final, en una proporción de 1:4 (alrededor de 500.000 células por placa de Petri de 35 mm). Las células se mantuvieron en NDM, con cambios de medio en días alternos, durante 60 días más y se suplementaron con inhibidor de Rock 10  $\mu$ M durante 48 h, después de cada pase.

### **Extracción de ARN y síntesis de ADNc**

La extracción de ARN mensajero se realizó utilizando Trizol Reagent (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se realizó la síntesis de ADNc mediante la utilización de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Para este procedimiento se utilizó para cada reacción: mix 1 compuesto de 1 $\mu$ g de ARN, 250ng de Random Primers, 1 $\mu$ L de mix dNTP (10 mM) y mix 2 compuesto de 4 $\mu$ L de 5X First-Strand Buffer, 2 $\mu$ L de 0.1 M DTT y 1 $\mu$ L de RNaseOUT™ (40 U/ $\mu$ L). La reacción se incubó según el programa recomendado por el fabricante: incubación del mix 1 a 65 °C por 5 min y luego enfriar en hielo. Posteriormente, se le agregó el mix 2 y se incubó a 37°C por 2 min. Se le agregó la enzima M-MLV y se incubó por 50 min a 37 °C. Finalmente, la enzima se inactivó por calor calentando el mix a 70°C por 15 min. El ADNc se almacenó a -20 °C hasta posterior su uso.

### **RTqPCR**

Los análisis por qPCR se realizaron utilizando el kit Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, catálogo #600828) y un sistema de PCR en

tiempo real Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies). Se utilizaron partidores específicos para la amplificación de los genes de interés (Tabla 1). El protocolo de amplificación incluye una activación de HotStart durante 15 min a 95 °C, desnaturalización a 95 °C durante 15 s, alineamiento a 60 °C por 20 s y una etapa de extensión durante 10 s a 72 °C. La especificidad de los productos obtenidos se confirmó a mediante la electroforesis de un gel de agarosa (2% v/v) y un análisis de curva de melting. El análisis de la amplificación se realizó utilizando el Software MxPro (Stratagene) y la cuantificación relativa será calculada usando el método  $\Delta\Delta CT$ . Como control se utilizarán  $\beta$ -actina y GAPDH.

**Tabla 1:** Partidores específicos que se utilizaron en el análisis de qPCR para la amplificación de distintos genes humanos.

Target	Secuencia anterior	Secuencia reversa
<i><math>\beta</math>-actina</i>	5'-AAGGATTCCTATGTGGGCGAC-3'	5'-CGTACAGGGATAGCACAGCC-3'
<i>GAPDH</i>	5'-CAAGAAGGTGGTGAAGCAGGC-3'	5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'
<i>Nestina</i>	5'-ACACATGGAGACGTCGCTG-3'	5'-GAGCGATCTGGCTCTGTAGG-3'
<i>CD133</i>	5'-CGCGGGATGGTGCCTTGAGTGAA-3'	5'-TCTGTGGATGAAGGCTGCCCTCCT-3'
<i>SOX2</i>	5'-AGCTACAGCATGATGCAGGA-3'	5'-GAGTAGGACATGCTGTAGGT-3'
<i>OCT4</i>	5'-AGGTATTCAGCCAACGACCA-3'	5'-TCGATACTGGTTCGCTTTCTC-3'
<i>HOXD1</i>	5'-CCTACCCCAAGTCCGTCTCT-3'	5'-GCTGAAATTCGTGCGGATCG-3'
<i>HOXD8</i>	5'-TCCGTGGATGAGACCACAAG-3'	5'-GCGTGGGAAACCTCGATTCT-3'

## **Inmunofluorescencia**

A los 60 días de la diferenciación neuronal las células se fijaron con paraformaldehído al 4 %, se impregnaron con Triton-X (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) al 0,2 %, se bloquearon con BSA (albúmina de suero bovino) al 5 % en solución de PBST (tween-20 al 0,1 % en PBS) y se incubaron durante la noche a 4 °C con anti-tau1 (ratón: #MAB3420 Millipore), anti-sinaptofisina (ratón: #101011, Synaptic Systems), anti--MAP2 (conejo: #AB5622, Millipore), anti-homer-1 (conejo; #160002 Synaptic Systems). Posteriormente, las células se incubaron con anticuerpos secundarios (cabra anti-ratón Alexa 488, cabra anti-conejo alexa 555, Invitrogen). Los núcleos fueron teñidos con 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI) 1µg/mL por 5 min. Las imágenes se registraron con un microscopio confocal bifotónico Zeiss LSM 710

## **Plásmidos**

Para la inducción de *HOXD1* en las GSC de las líneas celulares de GBM, se diseñó una estrategia basada en el sistema Cre/loxP. Se utilizó la combinación de dos vectores, un vector retroviral portador de la secuencia de la recombinasa Cre-ERT2, y un vector lentiviral portador de la secuencia de *HOXD1* y de los sitios loxP. A continuación, se detallan las características de los vectores virales.

## **Vector Retroviral**

Se utilizó el vector retroviral pRetroQ-Cre-ERT2 (Addgene, plasmid #59701) para la expresión de la proteína recombinasa Cre-ERT2, bajo el promotor fuerte de citomegalovirus (Figura13). Entre los elementos génicos, destacamos los genes de resistencia a ampicilina y a puomicina, utilizados para la selección de bacterias

transformantes y de células de glioblastoma eficientemente transducidas con este vector retroviral, respectivamente.

### **Vectores Lentivirales**

Los vectores lentivirales para la expresión inducible de HOXD1 en las GSC, y su correspondiente control, se diseñaron en base al plásmido pLVX (Addgene). En el vector pLVX-HOXD1 la expresión de *HOXD1* está regulada por el promotor troncal SOX2 (Figura 14 A). Entre ambos elementos génicos se encuentra la secuencia de terminación de la transcripción que está flanqueada por secuencias loxP. En consecuencia, la expresión de *HOXD1* se induce mediante el tratamiento con 4-hidroxitamoxifeno (4OHT), que induce la internalización de Cre-ERT2 al núcleo y por lo tanto la recombinación de las secuencias loxP. Diseñamos el vector lentiviral control pLVX-Stuffer que, en lugar de tener la secuencia del gen de HOXD1, lleva una secuencia peptídica sin actividad biológica reportada que denominamos “Stuffer” (Figura 14 B). Otros elementos génicos relevantes para esta investigación son el gen de resistencia a ampicilina y a Higromicina B, los cuales se utilizaron para la selección de bacterias transformantes y células de glioblastoma transducidas eficientemente con estos vectores lentivirales, respectivamente.

### **Transformación de células quimio-competentes de *E. coli* Stb13**

Para la amplificación del plásmido pRetroQ-Cre-ERT2 (8870 pb) se utilizó la cepa quimio-competente de *E. coli* Stb13 (Invitrogen, catálogo #C737303). Para su transformación se siguió el protocolo recomendado por el fabricante. Los viales con bacterias se descongelaron en hielo y a cada uno se les agregó 100 ng de ADN del

vector interés, mezclando cuidadosamente. Posteriormente, las células se incubaron en hielo por 30 min, para luego inducir shock térmico mediante una primera incubación a 42 °C por 45 s y una segunda incubación en hielo por 2 min. Luego, a cada vial de transformación se les agregó 250 µL de medio SOC y se incubaron 1 h a 37 °C en agitación. Finalmente, Las bacterias se sembraron en placas de selección de transformantes positivas, placas agar LB (Luria Broth) suplementadas con ampicilina, se incubaron a 37 °C por 16 h y se almacenaron a 4 °C.

#### **Obtención de bacterias *E. coli* Stbl3 electro-competentes**

Se generó un cultivo inicial de *E. coli* de la cepa Stbl3, las cuales se crecieron a 37°C por 16 h. Posteriormente, se generó un segundo cultivo de 1L de LB el cual se inoculo con 1/100 del cultivo inicial. Este segundo cultivo se creció a 37°C en agitación fuerte (170 RPM) hasta alcanzar una absorbancia  $A_{550} = 0,5-0,8$ . Luego, el cultivo se enfrió en hielo por 30 min y se centrifugó a 4000 RCF por 15 min a 4 °C. El pellet celular se resuspendió en 1 L de agua destilada estéril fría y se centrifugó nuevamente a 4000 RCF por 15 min a 4 °C. Posteriormente, el pellet celular se resuspendió en 500 mL de agua destilada estéril y se centrifugó en las mismas condiciones previamente detalladas. El pellet bacteriano se resuspendió en 20 mL de glicerol 10% frío y se centrifugó en las condiciones previamente mencionadas. Finalmente, el pellet celular se resuspendió en 3 mL de glicerol 10% frío, volumen a partir del cual se generaron alícuotas de 50 µL que se almacenaron a -80°C.

### **Transformación de bacterias *E. coli* Stbl3 mediante electroporación**

Para la amplificación de los plásmidos pLVX-HOXD1 (11572 pb) y pLVX-Stuffer (10693 pb) se utilizaron bacterias electrocompetentes de la cepa Stbl3 (invitrogen, catálogo # C737303). Se utilizó una alícuota de bacterias descongeladas en hielo por cada muestra de ADN plasmidial. Luego de 5 min se agregó 100 ng del plásmido correspondiente, el cual se homogenizó con las bacterias cuidadosamente. La mezcla se dejó en hielo por 1 min y se introdujo en cubetas de electroporación de 0,2 cm de ancho (Bio-Rad) previamente enfriadas en hielo. Los parámetros de electroporación fueron: resistencia 200  $\Omega$ , capacitancia 25  $\mu$ F y voltaje de 2.5 mV, ajustados previamente en el electroporador (Bio-34 Rad, EE.UU.). Se activó el pulso eléctrico con un tiempo promedio de 8 ms y se adicionaron lentamente 600  $\mu$ L de medio LB líquido a la muestra. Las células se incubaron a 37 °C durante 1 h, se sembraron en placas con medio selectivo y se incubaron a 37 °C durante 16 h.

### **Purificación de plásmidos**

#### **Purificación de plásmidos a escala Mini preparativa**

Para la purificación de los plásmidos a escala mini preparativa se utilizó el kit E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini kit II (Omega). Para este propósito se siguió las recomendaciones del fabricante. Se inocularon colonias de bacterias individuales en cultivo de 15 mL de medio LB líquido, suplementado con el antibiótico de selección ampicilina en una concentración de 50  $\mu$ g/mL, y se incubaron a 37 °C con agitación durante 16 h. Se tomaron los 10 mL del cultivo y se centrifugaron durante 10 min a 5.000 RCF. El precipitado celular se resuspendió en 500  $\mu$ L de solución I

que contiene RNAsa y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación, se le añadieron 500 µL de solución II, se agitó suavemente por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se añadieron 700 µL de solución III, se agitó suavemente por inversión, y se centrifugó 10 min a 13.000 RCF. Se extrajo el sobrenadante, se transfirió a la columna HiBind DNA Mini Column II y se centrifugó a 13000 RCF por 1 min. Luego, la columna se lavó con 500 µL del tampón HBC y se centrifugo a 13.000 RCF por 1 min. Se realizó un segundo lavado con 500 µL del tampón DNA Wash y se centrifugo a la misma velocidad que el paso anterior. Posteriormente, la columna se secó mediante centrifugación a 13.000 RCF por 2 min y se agregó 80 µL del tampón de elución y se incubó a temperatura ambiente por 1 min. Finalmente, la columna se centrifugo a 13.000 RCF por 1 min, el ADN se cuantificó en Nanodrop se almacenó a -20°C.

### **Purificación de plásmidos a escala Midi preparativa**

Para la purificación de los plásmidos a escala midi preparativa se utilizó el kit NucleoBond Xtra Midi ((MACHEREY-NAGEL, catálogo # 740412). Para este propósito se siguió las recomendaciones del fabricante. Se inoculó una colonia en 300 mL de medio LB suplementado con el antibiótico de selección correspondiente, y se incubó a 37 °C con agitación durante 16 h. El cultivo se centrifugó a 6.000 RCF durante 15 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 8 mL de tampón RES. A la suspensión celular se le adicionaron 8 mL de solución LYS, se mezcló por inversión y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, se adicionaron 8 mL de la solución NEU, se mezcló por inversión, y el lisado celular se cargó en la columna NucleoBond® Xtra Column



Filter, previamente equilibrada con el tampón EQU. Luego de 2 lavados con el tampón WASH, se descartó el filtro de papel, quedando solamente la columna con la matriz que retiene el ADN. Se extrajo el ADN plasmidial desde la columna mediante la adición de 5 mL del tampón de elución, ELU. Posteriormente, se agregó 3,5 mL de isopropanol, se mezcló mediante agitación fuerte y se centrifugó a 13.000 RCF durante 30 min a 4 °C. El precipitado obtenido se lavó dos veces con etanol al 70% y centrifugando a 13.000 RCF por 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN plasmidial purificado se resuspendió en 100µL de agua libre de nucleasas, se cuantificó en Nanodrop y se almacenó a -20°C.

### **Digestión enzimática de ADN plasmídico**

Para la digestión enzimática se utilizó como material de partida ADN plasmídico a una concentración final entre 50 y 100 ng/µL, y se emplearon enzimas de restricción a razón de 1UI por µg de ADN. Las soluciones tampón, el BSA, la temperatura de reacción, así como otros requerimientos adicionales fueron específicos para cada tipo de enzima según las recomendaciones del fabricante (Catálogo New England BioLabs). Para cada reacción se añadió de forma secuencial el ADN, la solución tampón específica y BSA, se adicionó agua estéril hasta completar el volumen final de la reacción y finalmente se añadió la enzima respectiva. Luego del tiempo de incubación, la digestión se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v.

### **Generación de partículas retrovirales**

Las partículas retrovirales se generaron en la línea celular Phoenix Ampho (ATCC,

catálogo #CRL3213. Esta corresponde a una línea celular modificada, generada a partir de la línea HEK (del inglés Human Embryonic Kidney), la cual contiene la secuencia génica para las proteínas de empaquetamiento y envoltura de las partículas retrovirales (Swift et al., 2001). El medio de mantención de esta línea celular consistió en DMEM High Glucose (Hyclone), suero fetal bovino (FBS del inglés fetal bovine serum) 10% (Hyclone), 1% penicilina/estreptomicina (P/S). Para la producción viral se sembraron  $1 \times 10^6$  células en placas de 100 mm. Al alcanzar una confluencia del 70%, se realizó la transfección con cloruro de calcio (Kingston et al., 2003; Kwon & Firestein, 2013). Cada transfección se realizó con 10  $\mu$ g del plásmido pRetroQ-Cre-ERT2. Luego de 16 h post-transfección se cambió el medio de cultivo y se reemplazó por el medio de producción viral que corresponde a DMEM High Glucose (Hyclone), 1% FBS (Hyclone). Cuando se completaron las 60 horas post-transfección, se colectó el medio de cultivo, se centrifugó a 1000 RPM por 5 min, se filtró con filtro de 0,45  $\mu$ m y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de 1 mL.

### **Generación de partículas lentivirales**

Las partículas lentivirales se generaron en la línea celular Lenti-X™ 293T Cell Line (HEK293T) (Takara Bio, catálogo # 632180), las cuales se cultivaron en medio. Se sembraron  $1 \times 10^6$  células HEK293T en placas de 100 mm. Cuando se alcanzó una confluencia de ~70%, se realizaron transfecciones mediante el método de cloruro de calcio (Kingston et al., 2003; Kwon & Firestein, 2013). Cada transfección incluyó 8  $\mu$ g totales del plásmido de interés (pLVX-HOXD1 o pLVX-Stuffer), en conjunto con 8  $\mu$ g del vector psPAX2 (Addgene, catálogo # 12260) y 4  $\mu$ g del vector VSVG (Addgene, catálogo # 8454). Estos últimos plásmidos son claves para la formación

de las partículas lentivirales ya que confieren los genes de empaquetamiento y envoltura, respectivamente (Kalidasan et al., 2021). Transcurridas 16 h post-transfección se cambió el medio de cultivo y se reemplaza por el medio de producción de partículas lentivirales, DMEM High Glucose (Hyclone), 1% FBS (Hyclone), y se mantuvieron hasta completar las 60 h post-transfección. Posteriormente, se colectó el medio de cultivo, se centrifugo a 1000 RPM por 5 min y se filtró utilizando filtros de 0,45µm. El último paso consistió en concentrar las partículas virales. Para eso, el medio de cultivo se ultra-centrifugó a 100.000 RCF por 1,30 h. El pellet celular se resuspendió con agitación lenta, a 4 °C y con 300 µL de PBS. Luego de 4 h, el medio enriquecido en partículas lentivirales y se almaceno a -80°C en alícuotas de 50µL.

### **Transducción de líneas celulares de GBM con retrovirus**

En placa de 12 pocillo se sembraron  $2 \times 10^4$  células/ pocillo, de las líneas de glioblastoma, para el vector de interés y para el control sin transducir. Cuando las células alcanzaron un 40 % de confluencia se retiró el medio de cultivo y se agregó el medio de transducción retroviral que consiste en 500 µL de medio de cultivo fresco, DMEM HG 10% FBS, 1% P/S, y 500 µL del medio de cultivo con partículas retrovirales. Para el control, se utilizó 500uL de DMEM HG 10% FBS, 1% y 500 µL de DMEM HG 1% FBS. Tanto al control como al pocillo de transducción viral se le agregó polibreno en una concentración final de 8 µg/mL. Este compuesto es un polímero catiónico que se utiliza para mejorar el rendimiento de las transducciones virales (Davis et al., 2002). A las 48 h de transducción, se renovó el medio del control y el medio con partículas retrovirales. Transcurridas 72 h post-transducción, se retiró

el medio de transducción y se agregó el medio de cultivo de mantención. Al alcanzar una confluencia ~ del 80% el medio de cultivo se suplemento con el antibiótico de selección, para este caso puromicina en una concentración de 2 µg/mL. La selección se consideró completa una vez que las células del pocillo control sin transducir murieron.

### **Transducción de líneas celulares de GBM con lentivirus**

La transducción con el vector lentiviral se realizó mediante un protocolo similar al de la transducción retroviral. Se sembraron células de glioblastoma en una densidad de  $2 \times 10^4$  células/ pocillo, para el control sin transducir y para cada vector lentiviral. Cuando el cultivo de las células de glioblastoma alcanzó una confluencia de ~40%, se agregó medio de cultivo fresco y se agregó 15 µL de cada vector lentiviral concentrado en su pocillo correspondiente. Para el pocillo control se agregó 15 µL de PBS. Se agregó polibrero en una concentración de 8 µg/mL. Luego de 72 h de transducción lentiviral, se agregó medio de cultivo fresco. Cuando el cultivo celular alcanzó una confluencia cercana al 80%, el medio de cultivo se suplemento con el antibiótico de selección, para ambos casos Higromicina B 500 µg/mL. La selección de las células transducidas mediante el uso de antibiótico se realizó hasta observar la muerte total del control.

### **Preparación de 4OHT y tratamiento**

Para los diferentes tratamientos con 4OHT (Cayman, catálogo #17308) se preparó un stock general concentrado, disuelto en etanol 100 %. Se consideró la solubilidad de 4OHT reportada en etanol 100% la cual corresponde a 20 mg/mL equivalente a

50 mM. Además, se consideró que para cada tratamiento el volumen total de etanol 100 % no excediera el 0,1 % v/v con respecto al medio de cultivo, esto para evitar la toxicidad celular por este solvente. Por lo tanto, se preparó 4OHT 3,87 mg/mL equivalente a 10 mM. Una vez preparado, el stock se filtró mediante filtros de 0,22 µm, de este se generaron alícuotas que se almacenaron a -20 °C protegido de la luz. En cada tratamiento se verificó que la alícuota utilizada no superara las 6 semanas desde su preparación (Felker et al., 2016) . Para la determinación de la concentración de 4OHT adecuada para las líneas celulares de GBM, que no evidenciara muerte celular, se probaron diferentes concentraciones desde 100 nM hasta los 10 mM. El tiempo y la concentración adecuada para los tratamientos con 4OHT se determinó mediante los reportes en literatura y los diferentes ensayos de toxicidad realizados en las líneas de GBM.

### **Determinación de la actividad metabólica mediante ensayo MTT**

El ensayo MTT es un método colorimétrico para evaluar la actividad metabólica celular. Este se basa en la reducción del compuesto soluble bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, más conocido como MTT, en el compuesto insoluble formazán (Kumar et al., 2018; Sylvester, 2011). Este ensayo se utilizó para la determinación de la toxicidad de tratamientos con diferentes concentraciones de 4OHT y para la determinación de la proliferación celular. Para el primer caso, se sembraron células de las líneas de GBM en placas de 96 pocillos, en una densidad de 7000 células/pocillo. Luego de 24 h se renovó el medio de cultivo el cual se suplementó con 4OHT en concentraciones de 10-10.000 nM. Se realizaron tratamientos a diferentes tiempos, 48, 72 y 96 h. Una vez cumplido el tiempo de

tratamiento se cambió el medio de cultivo por DMEM sin rojo fenol 10 % FBS. Adicionalmente, a cada pocillo se agregó 10  $\mu$ L de MTT 10X, y la placa se incubó a 37 °C por 2 h, para permitir la formación de los cristales de formazán. Posteriormente, los cristales de formazán se solubilizaron. Para este propósito, en cada pocillo se eliminó 85  $\mu$ L del medio con MTT, se agregó 50  $\mu$ L de Dimetilsulfóxido (DMSO) y la placa se incubó a 37°C por 10 min. Entonces, se determinaron los valores de absorbancia, proporcionales a la actividad metabólica, mediante la medición de la absorbancia a 570 nm usando un espectrofotómetro (Sunrise<sup>TM</sup>, Tecan). Para la determinación de la proliferación celular se sembraron células de las líneas de GBM en placas de 96 pocillos en una densidad de 5000 células/pocillo. Se sembró una placa por tiempo de proliferación celular analizado, correspondientes a 24, 48, 72 y 96 h. Transcurrido el tiempo en cuestión, se cambió el medio por DMEM sin rojo fenol 10% FBS. A continuación, a cada pocillo se le agregó 10  $\mu$ L de MTT 10X para la formación de los cristales de formazán. La solubilización de los cristales y el registro de los valores de absorbancia se realizó como se describió previamente. Cabe mencionar que, tanto para la determinación de la toxicidad celular, así como para la determinación de la curva de proliferación, se utilizó como blanco pocillos sin células que se trataron idénticamente a los pocillos experimentales.

### **Datos de ChIP-Seq y su procesamiento**

Los datos de ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con secuenciación (ChIP-seq) para los perfiles H3K4me3 y H3K27me3 se obtuvieron de la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO). Las muestras pertenecientes al

estudio de Le Boiteux E, Court F, Guichet PO, y col. corresponden a las siguientes: GSC (H3K4me3: GSM4907322, GSM4907326. H3K27me3: GSM4907323, GSM4907327). Las muestras pertenecientes al estudio de Rheinbay, Esther y col. corresponden a las siguientes: GBM (H3K4me3: GSM1121865, GSM1121875, GSM1121888. H3K27me3: GSM1121862, GSM1121872, GSM1121885) y muestras de GSC (H3K4me3: GSM1121860, GSM1121870, GSM1121882. H3K27me3: GSM1121857, GSM1121867, GSM1121879). El protocolo o pipeline utilizado para el procesamiento de los archivos fastq corresponde a “ChIP-seq de histonas ENCODE 3”. De manera resumida, las lecturas de ChIP-seq se asignaron al genoma humano (hg19 para los datos de Rheinbay y col., y hg 38 para los datos de Le Boiteux) utilizando Bowtie2 (v2.2.6) con parámetros ChIP-seq “paired-end”. La llamada de peaks se realizó utilizando MACS2 usando los respectivos Inputs como controles (disponibles también en GEO). Los archivos Bed y Bigwig se visualizaron en Integrative Genomics Viewer (IGV).

### **Líneas de Pez Cebra**

Los trabajos con larvas de pez cebra se realizaron de acuerdo con los estándares internacionales y con la aprobación del Comité de Cuidados y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile (certificado n°: 20406– FCS – UCH). Se utilizaron las cepas de Pez cebra Tab5 (silvestre), Tg (fli1: EGFP), las que se mantuvieron en medio E3 (5mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.33 mM MgSO<sub>4</sub>, y 0.1% azul de metileno) a 28°C con fotoperiodos de 14 h de luz y 10 h de oscuridad o 34°C en condiciones de oscuridad (en el caso de los peces

xenotrasplantados).

Tg (fli1: EGFP), línea transgénica en la cual el promotor del marcador endotelial fli1 impulsa la expresión específica de EGFP en los vasos sanguíneos. Esto permite la visualización y, por lo tanto, el análisis de la vasculatura durante el desarrollo embrionario del pez cebra.

### **Preparación de las larvas e implantación de las células tumorales**

Los embriones de pez cebra se trataron con feniltiourea (PTU), un inhibidor de la pigmentación, para mantener la transparencia de las larvas Tg (fli1: EGFP), para facilitar el análisis de microscopio y seguimiento de las células. Estas fueron marcadas previamente con el trazador transitorio Mitotracker red CMXRos (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. A los dos días post-fecundación (dpf), los embriones se decorionaron y microinyectaron con la línea celular de GBM. Estas células en suspensión se cargaron en microcapilares de vidrio de borosilicato adaptados como agujas de inyección y se inyectaron en el vitelo (X. J. Yang et al., 2013) o entre el cerebro medio y posterior (Welker et al., 2017). Para facilitar el acceso a ambas estructuras del pez durante la inyección, las larvas se montaron, en agarosa de bajo punto de fusión a una concentración de 1% m/v (diluida en medio E3). El seguimiento de los tumores se realizó hasta 5 días post inyección para la inyección del vitelo y 7 días post inyección (dpi) en el caso de los peces inyectados en cerebro.

### **Análisis estadístico**

Los datos se analizaron a través del software estadístico Prism 8. Se realizó la



prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para corroborar la normalidad de los datos. Para el análisis de datos paramétricos se realizó la prueba estadística ANOVA, y post test Tukey, para evaluar la diferencia entre 3 o más grupos. Para la comparación de datos paramétricos de 2 grupos se utilizó la prueba t-test. Al considerar datos no paramétricos, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis, post test Dunn's, para evaluar las diferencias entre 3 o más grupos. Para la comparación de 2 grupos se empleó la prueba de Mann-Whitney. Para el reporte de los valores p se determinó el estilo GraphPad que informa cuatro dígitos después del punto decimal con un cero a la izquierda: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

## RESULTADOS

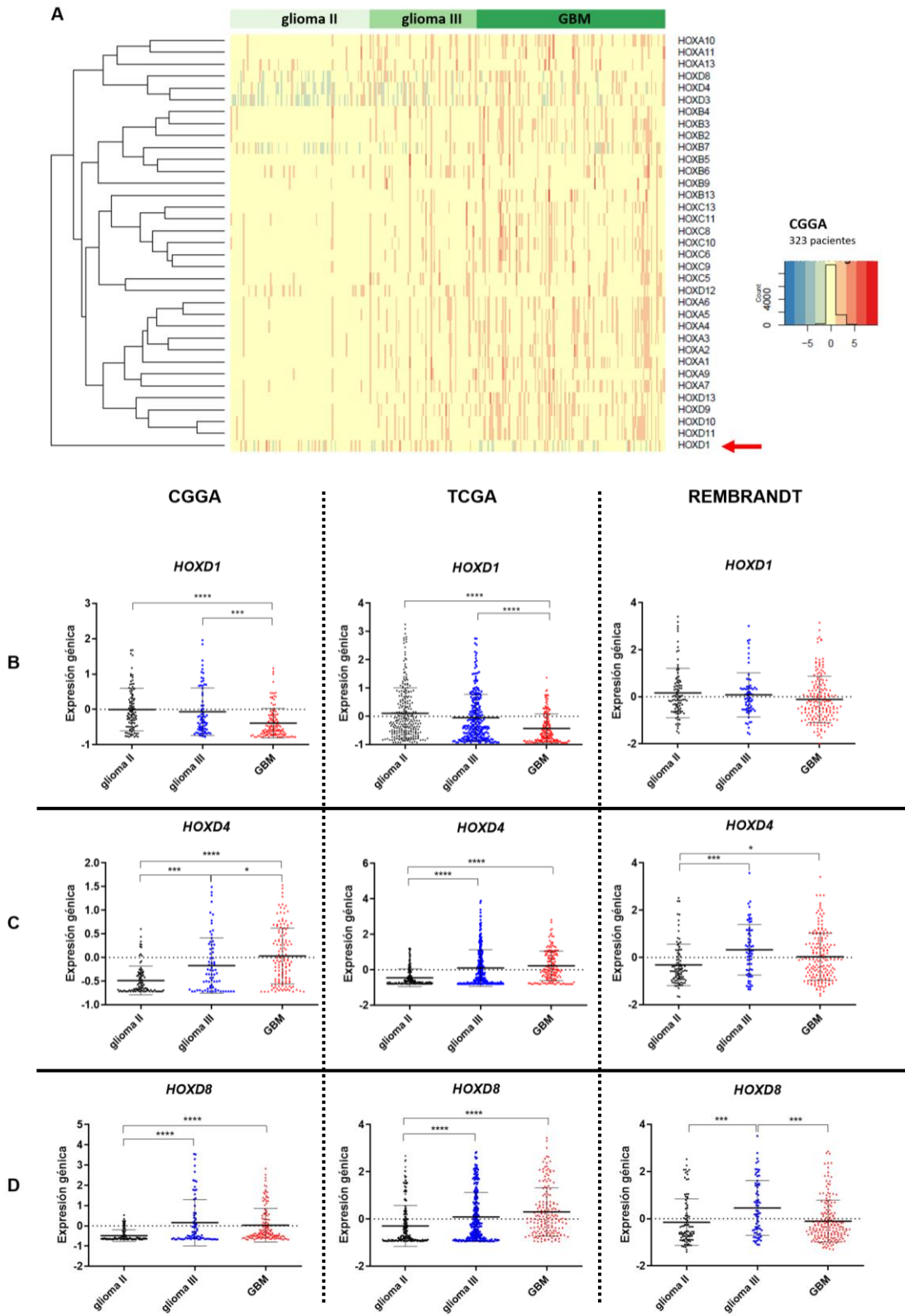
### **Objetivo 1: Identificar genes HOX con potencial rol supresor tumoral en glioblastoma mediante aproximaciones bioinformáticas**

#### **La expresión de HOXD1 es menor en pacientes con GBM en comparación con pacientes LGG y muestras cerebrales sanas**

Para la búsqueda de genes con potencial rol supresor tumoral, analizamos la expresión de los cuatro grupos genómicos de los genes HOX en datos de pacientes con gliomas de distinto grado almacenados en las bases de datos TCGA (con datos de 519 pacientes con LGG y 173 pacientes con GBM), CGGA (con datos de 184 pacientes con LGG y 140 pacientes con GBM) y REMBRANDT (con datos de 161 pacientes con LGG y 179 pacientes con GBM). Comparamos la expresión de los genes de los grupos HOXA, HOXB, HOXC y HOXD en pacientes con LGG, grado II y III, versus la expresión en pacientes con GBM. En general, encontramos que la mayoría de los genes HOX presenta una expresión mayor en pacientes con GBM en comparación con LGG (Figura 4 A). Así, por ejemplo, genes de diferentes grupos genómicos como *HOXA10*, *HOXB13*, *HOXC10* y *HOXD9* siguen esta tendencia en la cual su expresión es mayor en GBM. Esto es consistente con lo reportado en la literatura para estos genes, los cuales tienen un rol oncogénico en gliomas (Huang

et al., 2021; Isaev et al., 2021; Li et al., 2018; Tabuse et al., 2011; Wang et al., 2019). En la literatura se describe que, a diferencia de los genes HOX con rol oncogénico, los genes HOX con rol supresor tumoral disminuyen su expresión en cáncer en relación con su expresión en tejido normal, y que esta diferencia de expresión se acentúa con el avance del grado tumoral. En nuestros análisis de expresión destacamos a *HOXD1*, cuya expresión en pacientes con gliomas es diferente a los genes HOX con rol oncogénico. La expresión de *HOXD1* es mayor en pacientes con gliomas de bajo grado y disminuye con el grado tumoral, es decir, su expresión es menor en GBM. Este cambio de expresión es consistente en las tres bases de datos que analizamos (Figura 4 B) y sugiere que este gen podría tener un rol supresor tumoral.

Al comparar la expresión de *HOXD1* con el resto de los genes HOXD, encontramos que *HOXD1* presenta una expresión diferente al resto de los genes del mismo grupo genómico. Así, por ejemplo, *HOXD4* y *HOXD8* presentan una expresión mayor en pacientes con mayor grado tumoral (Figura 4 C y D), lo cual sugiere que *HOXD1* es un gen que tiene un perfil de expresión independiente a los otros genes de su mismo grupo.



**Figura 4:** *HOXD1* presenta una menor expresión en pacientes con GBM en comparación a su expresión en pacientes con LGG. A. Mapa de calor jerárquico

representativo de los análisis realizados en las distintas bases de datos de gliomas. Se ilustra la expresión de los genes HOX en pacientes con gliomas de distinto grado, obtenidos de la base CGGA, y se destaca la expresión de HOXD1, el cual presenta una distribución de la expresión diferente al resto de los genes HOX. B. C. y D. Los gráficos representan la distribución de la expresión de *HOXD1*, *HOXD4* y *HOXD8*, respectivamente. Estos se generaron a partir de los datos de expresión obtenidos desde las bases TCGA (con datos de 519 pacientes con LGG y 173 pacientes con GBM), CGGA (con datos de 184 pacientes con LGG y 140 pacientes con GBM) y REMBRANDT (con datos de 161 pacientes con LGG y 179 pacientes con GBM). Se observa que *HOXD1* tiene una menor expresión en GBM en comparación a otros gliomas de menor grado y este perfil de expresión es diferente a otros genes del mismo grupo genómico, como lo son *HOXD4* y *HOXD8*. La expresión génica corresponde a los z-score calculados a partir de los datos de expresión en FPKM. Para el análisis estadístico se utilizó el test ANOVA y post test Tukey. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

De manera adicional, utilizamos la base Oncomine que posee datos de microarrays de diferentes estudios de expresión génica de diferentes tipos de cáncer. Al igual que en las otras bases de datos previamente mencionadas, la expresión de *HOXD1* disminuye en muestras derivadas de pacientes con GBM en comparación con muestras de pacientes con LGG o muestras de tejido cerebral normal (Figura S 1). Cabe mencionar que no encontramos otro gen HOX cuya expresión disminuyera con el avance tumoral en pacientes con GBM, y que esta disminución de la expresión fuera consistente en las 3 bases de datos analizadas (TCGA, CGGA y

REMBRANDT). Como se detalló previamente, se han sugerido otros genes HOX como potenciales genes con rol supresor, los cuales son *HOXB1* (Han et al., 2015), *HOXD10* (Hu et al., 2013) y *HOXA11* (Se et al., 2017), sin embargo existe evidencia controversial respecto al rol de estos dos últimos (Duan et al., 2015; Li et al., 2021). En las publicaciones donde se sugiere tanto a *HOXB1*, *HOXA11* y *HOXD10*, el análisis del perfil de expresión de los respectivos genes se realiza con bases de datos más pequeñas o solo mediante el análisis de expresión en líneas celulares de glioblastoma. Nuestro análisis de la distribución de la expresión de *HOXB1*, *HOXA11* y *HOXD10* muestra que, a diferencia de lo esperado, los niveles de expresión de estos genes aumentan con el grado tumoral (Figura S 2). Estos resultados sugieren que estos genes HOX, descritos como supresores tumorales en gliomas, presentan más bien un perfil de expresión asociado a genes HOX con rol oncogénico. Por lo tanto, es necesario un mayor análisis para dilucidar cual es el rol de *HOXB1*, *HOXA11* y *HOXD10* en el desarrollo de los gliomas.

En consecuencia, seleccionamos a *HOXD1* como candidato supresor tumoral, cuyo rol en GBM aún no se ha descrito.

### ***HOXD1* presenta mayor expresión en gliomas de mejor pronóstico**

A continuación, relacionamos la expresión de *HOXD1* con diferentes marcadores de pronóstico y clasificaciones descritas para gliomas, como el estado IDH, estado de metilación MGMT y, para pacientes con GBM, el subtipo molecular y su origen. Encontramos que la expresión de *HOXD1* es mayor en pacientes con gliomas de mejor pronóstico.

Como ya se mencionó previamente, el estado del gen IDH es una de las clasificaciones más importantes en el estudio de los gliomas. En la última clasificación de tumores del SNC del año 2021, destaca el estado de IDH como un marcador molecular clave para la distinción de gliomas difusos (IDHmut) y GBM (IDHwt). Nuestros resultados indican que la expresión de *HOXD1* es mayor en muestras de pacientes con IDHmut en comparación con IDHwt. Desde la base de datos de TCGA analizamos la expresión de *HOXD1* en pacientes con IDHwt e IDHmut, sumando un total de 663 pacientes con gliomas de diferentes grados. En esta comparación se observa una mayor expresión de *HOXD1* en el grupo IDHmut (Figura 5 A). Realizamos el mismo análisis, utilizando datos de 325 pacientes con gliomas de diferentes grados almacenados en CGGA, y los resultados son consistentes con nuestros resultados previos, ya que encontramos una expresión significativamente mayor de *HOXD1* en el grupo IDHmut (Figura 5 B). Para este análisis, además quisimos incluir datos de RNA-seq de Le Boiteux y col. (Le Boiteux et al., 2021) el cual incluye muestras de 13 pacientes con glioma IDHwt o IDHmut y 3 muestras de cerebro normal, particularmente del cuerpo caloso (2) y la corteza frontal (1). Se observa que la expresión de *HOXD1* se expresa en muestras de cerebro sano, cuyos niveles de expresión tienden a disminuir en GBM (Figura 5 C). Cabe destacar que, otros genes del grupo genómico HOXD, como *HOXD4* y *HOXD8*, no se expresan en tejido normal y tienden a aumentar su expresión en GBM, observándose mayores niveles en el grupo IDHwt (Figura 5 D y E).

El origen del GBM es otro factor relevante en la estimación del tiempo de supervivencia de los pacientes con GBM. Es más frecuente que este cáncer se desarrolle como un tumor primario y en ocasiones menos recurrentes el GBM puede derivar de

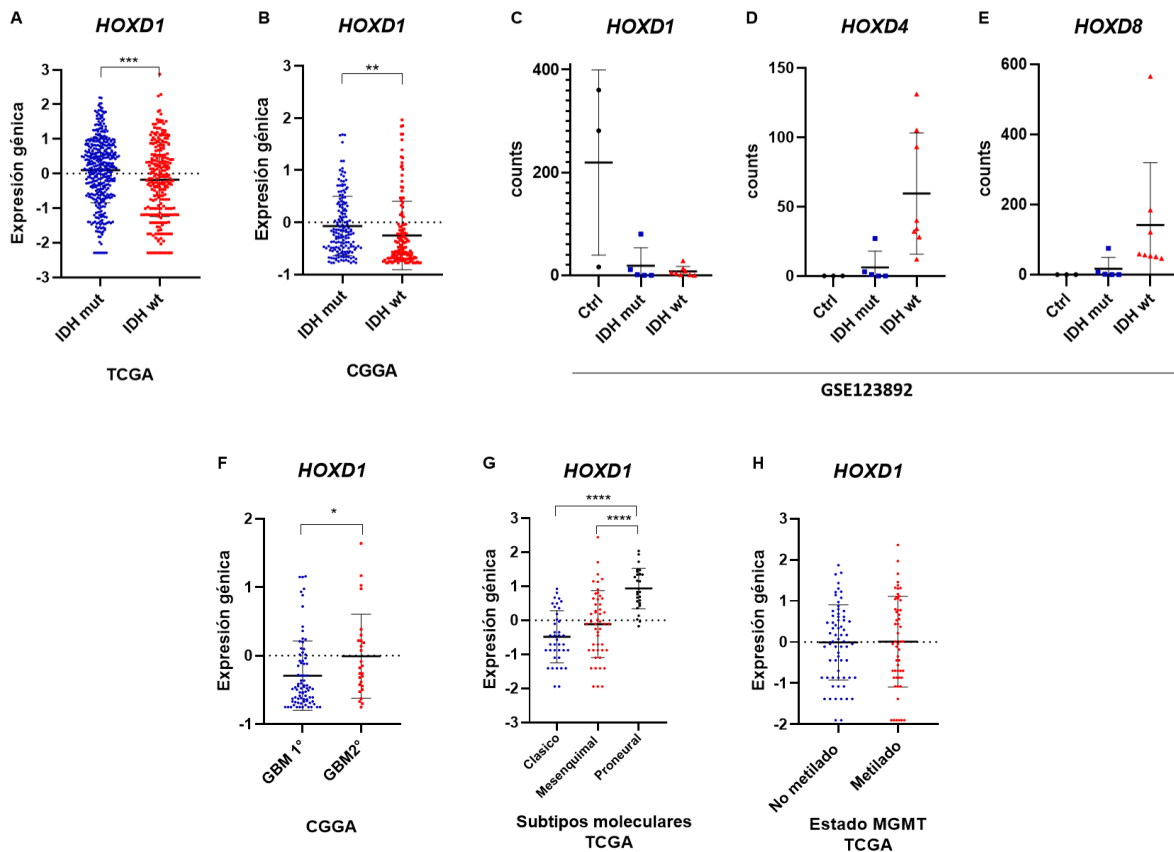
gliomas de menor grado (Kleihues & Ohgaki, 2000; Ohgaki & Kleihues, 2013). Pese que en general los pacientes con GBM tienen un bajo pronóstico de sobrevida, el GBM secundario tiene un pronóstico relativamente más favorable (Kleihues & Ohgaki, 2000; Louis et al., 2016). Buscamos información sobre el origen de los GBM en las bases de datos, consultadas en los análisis previos, y encontramos esta información solo en la base CGGA. Nuestros resultados sugieren que la expresión de *HOXD1* es mayor en pacientes con GBM secundario en relación con pacientes con GBM primario (Figura 5 F).

La clasificación de subtipos moleculares está basada en el perfil transcriptómicos de los pacientes con GBM. Como ya se mencionó previamente, se han descrito tres subtipos moleculares los cuales son Proneural (PN), Clásico (CL) y Mesenquimal (MES) (Verhaak et al., 2010; Wang et al., 2017), dentro de los cuales el subtipo PN tienen un mejor pronóstico de sobrevida (Sidaway, 2017; Z. Wang et al., 2021). Nuestros resultados del análisis de la expresión de *HOXD1* en los subtipos moleculares sugiere que *HOXD1* es mayor en el subtipo PN (Figura 5 G). Esto es consistente con los resultados que sugieren que la expresión de *HOXD1* es mayor en los pacientes con GBM secundario, ya que se ha descrito que los GBM secundarios presentan en su mayoría un subtipo PN. Además, cabe destacar que la expresión de *HOXD1* es menor en el subtipo MES, el cual tiene peor pronóstico de sobrevida.

Por último, dentro de las clasificaciones utilizadas para predecir el pronóstico de los pacientes, se encuentran el estado de metilación de *MGMT* y la co-delección 1p/19q (Louis et al., 2016; Masui et al., 2016). La metilación del promotor de *MGMT* se asocia a una baja transcripción de la enzima DNA-metil transferasa, cuya expresión



se asocia a resistencia a tratamiento (Hegi et al., 2005). A su vez, la co-delección de los brazos cromosómicos 1p/19q se asocia a mejor pronóstico (Eckel-Passow et al., 2015; van den Bent et al., 2003). Nuestro análisis de la expresión de *HOXD1* en relación con el estado de metilación de *MGMT* (Figura 5 H) y a la co-delección 1p/19q (Datos no mostrados), no mostraron diferencias significativas.



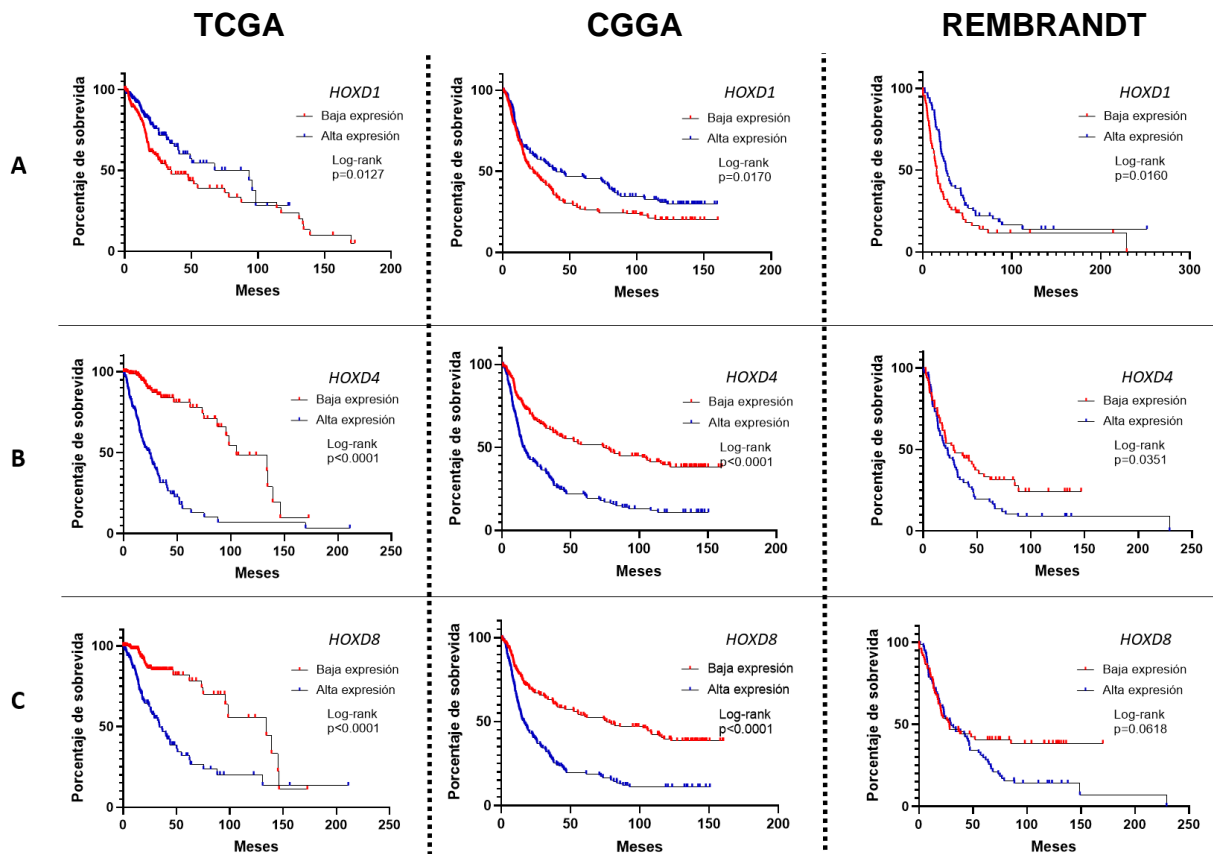
**Figura 5: La expresión de *HOXD1* es mayor en pacientes con gliomas de mejor pronóstico.** Analizamos la expresión de *HOXD1* en relación con diferentes marcadores de pronóstico y clasificaciones de gliomas. Con respecto a la clasificación IDH, encontramos que la expresión de *HOXD1* es mayor en paciente es con IDHmut, en comparación con pacientes IDHwt. A. B. y C. Estos análisis se

generaron a partir de datos de expresión de 663 pacientes con gliomas de diferentes grados de la base TCGA, datos de 325 pacientes con gliomas de CGGA y datos de 13 pacientes con gliomas y 3 muestras de cerebro sano del estudio GSE123892, respectivamente. D. y E. Otros genes del grupo genómico HOXD, *HOXD4* y *HOXD8*, presentan un patrón de expresión contrario a *HOXD1*, los cuales tienden a presentar una mayor expresión en el grupo de pacientes IDHwt. También, analizamos la expresión de *HOXD1* en relación con origen del GBM el subtipo molecular, para lo cual se utilizaron datos de 117 pacientes de TCGA y 115 pacientes de CGGA, respectivamente. F. y G. Encontramos que *HOXD1* se expresa en mayor grado en GBM de origen 2° y en el subtipo molecular PN. H. Con respecto a otros marcadores, como el estado de metilación de *MGMT*, no se observan diferencias en la expresión de *HOXD1* en los grupos de comparación. La expresión génica corresponde a los z-score calculados a partir de los datos de expresión en FPKM. Para el análisis estadístico en el cual se compararon dos grupos se utilizó la prueba estadística t-test. Para la comparación de tres grupos se utilizó la prueba ANOVA y post test de Tukey. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### **La disminución de la expresión de *HOXD1* se asocia con un peor pronóstico de sobrevida**

Seguidamente evaluamos la significancia clínica de la expresión de *HOXD1* y de otros genes del grupo genómico HOXD, en relación con el tiempo de sobrevida de los pacientes. Utilizamos datos de expresión y datos clínicos disponibles en las

bases de datos previamente mencionadas, TCGA (692 pacientes con gliomas) CGGA (325 pacientes con gliomas) y REMBRANDT (340 pacientes con gliomas). Se construyeron curvas Kaplan-Meier para determinar el tiempo de sobrevida de pacientes con una alta o baja expresión de los genes en cuestión. Los resultados obtenidos indican que pacientes con una alta expresión de *HOXD1* tienen una sobrevida significativamente mayor que los pacientes con una baja expresión de dicho gen (Figura 6 A). Por el contrario, el análisis de sobrevida en pacientes con alta expresión de otro gen del grupo genómico HOXD, tales como *HOXD4* o *HOXD8*, muestran un menor tiempo de sobrevida en comparación con pacientes con una baja expresión de este gen (Figura 6 B y C). Estos resultados son consistentes con los resultados previamente mencionados y también sugieren que *HOXD1*, a diferencia de los otros genes del grupo genómico HOXD, es un potencial gen supresor tumoral en gliomas.



**Figura 6: A diferencia de otros genes del grupo genómico HOXD, una alta expresión de *HOXD1* se asocia con un mejor pronóstico de sobrevida en pacientes con gliomas.** Análisis de la curva de sobrevida de Kaplan-Meier de datos de glioma obtenidos de TCGA (692 pacientes con glioma, CGGA (325 pacientes con glioma) y REMBRANDT (340 pacientes con glioma). A. Los resultados son consistentes en las tres bases de datos y muestran que pacientes con alta expresión de *HOXD1* presentan una sobrevida prolongada en comparación con pacientes con niveles bajos de expresión de *HOXD1*. B. y C. Pacientes con una alta expresión de *HOXD4* o *HOXD8*, respectivamente, presentan menor sobrevida que pacientes con una baja expresión de estos genes. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba estadística de Log Rank, cuyo valor p se indica en cada gráfico.

**Objetivo 2: Evaluar el potencial de los genes supresores tumorales para inducir diferenciación durante el desarrollo del sistema nervioso y las células madre de glioblastoma**

***HOXD1* se asocia a un fenotipo diferenciado en tejido cerebral normal**

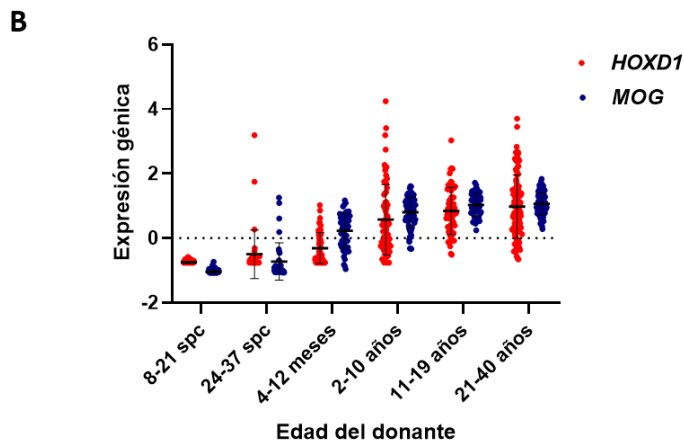
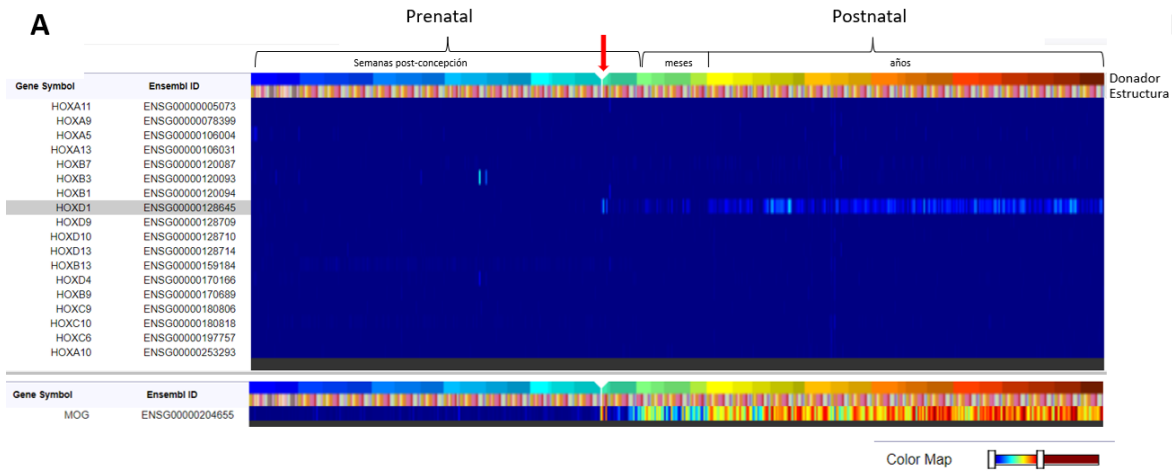
En la literatura se ha propuesto que los genes HOX con rol supresor tumoral son genes que establecen la identidad celular (Abate-Shen, 2002; Bhatlekar et al., 2018). Así, en un contexto tumoral, la disminución de su expresión puede conducir

a una mayor plasticidad fenotípica y, por lo tanto, contribuir en la adquisición de troncalidad (Bhatlekar et al., 2014; Smith et al., 2019). En base a los resultados presentados anteriormente, se sugiere a *HOXD1* como un potencial gen supresor tumoral. Sin embargo, es preciso establecer si la expresión de este gen se asocia con diferenciación y establecimiento de la identidad celular en cerebro.

En la literatura se encuentran algunas publicaciones que sugieren que *HOXD1* se expresa en cerebro de organismos vertebrados en desarrollo (McNulty et al., 2005; L. V. Wolf et al., 2001), así como también se evidencia su expresión en algunas zonas cerebrales de organismos adultos (Hutlet et al., 2016; Takahashi et al., 2004). Sin embargo, aún no se ha descrito su función en estas estructuras. Con relación al rol de *HOXD1* en los subtipos celulares cerebrales, Booth y col. demostraron, a partir de cultivo primario de células gliales mixtas obtenidas de ratón recién nacido, que *Hoxd1* se expresa en oligodendrocitos de distintos grados de maduración. Este grupo de investigación además demostró que la glicoproteína de la mielina de oligodendrocitos (MOG) sería un blanco transcripcional de *Hoxd1*, sugiriendo un rol de *Hoxd1* en la diferenciación y/o maduración del linaje oligodendroglial (Booth et al., 2007). Cabe destacar que, esta es la única publicación que describe un potencial rol de *HOXD1* en cerebro y se desconoce si este posible rol es conservado entre especies, incluyendo al humano.

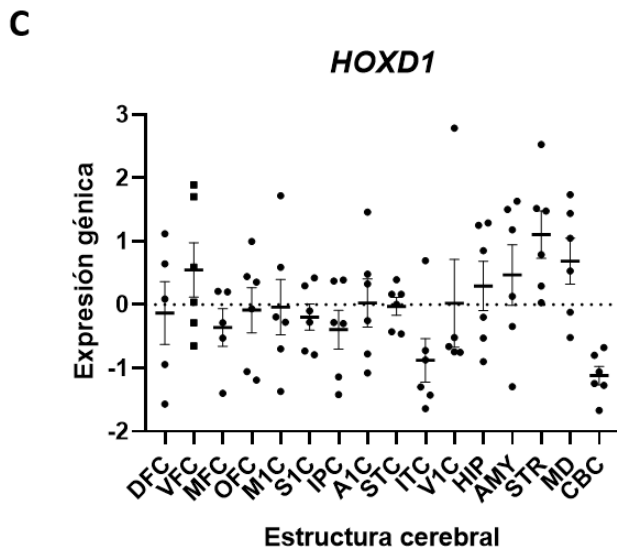
En consecuencia, evaluamos la expresión de *HOXD1* en el desarrollo de cerebro humano. Para esto utilizamos datos de expresión de RNA-Seq obtenidos de Allen Brain MAP, desarrollado por el Instituto Allen. Estos datos se obtuvieron de 8-16 muestras de estructuras cerebrales de diferentes estados del desarrollo humano. En base a los datos analizados, se observa que *HOXD1* comienza a expresarse de

manera significativa a partir de la semana 24 post concepción (spc) (Figura 7 A y B). La expresión de este gen se mantiene a lo largo del desarrollo, aumentando su expresión en etapas posteriores a la semana 24 psc, e inclusive se evidencia su expresión en distintas estructuras de cerebro adulto (Figura 7 C). Adicionalmente, analizamos la expresión de *MOG* y encontramos que presenta un patrón similar a la expresión de *HOXD1* (Figura 7 A y B). En estos datos, ambos genes presentan una correlación positiva (coeficiente Spearman 0,89,  $p < 0,0001$ ) durante el desarrollo. Estos resultados sugieren que la regulación transcripcional de *MOG* por parte de *HOXD1* sería conservada entre humano y ratón, y que *HOXD1* podría jugar un importante rol en la maduración y/o diferenciación de oligodendrocitos en humanos. Cabe destacar que, estos resultados son consistentes con los resultados que indican que la expresión de *HOXD1* es mayor en pacientes con GBM con subtipo PN, cuyo patrón transcripcional es similar al patrón de expresión de oligodendrocitos (Verhaak et al., 2010; Wang et al., 2017).



Test Kuskal Wallis (ANOVA)	Valor p <0,0001
Prueba de comparaciones múltiples de Dunn	Diferencia de rango medio
8-21 spc vs. 24-37 spc	-107,1
8-21 spc vs. 4-12 meses	-189,2
8-21 spc vs. 2-10 años	-269,4
8-21 spc vs. 11-20 años	-306,4
8-21 spc vs. 20-40 años	-311,0
24-37 spc vs. 2-10 años	-162,2
24-37 spc vs. 11-20 años	-199,3
24-37 spc vs. 20-40 años	-203,9
4-12 meses vs. 2-10 años	-80,19
4-12 meses vs. 11-20 años	-117,3
4-12 meses vs. 20-40 años	-121,9

Correlación de Spearman <i>HOXD1</i> & <i>MOG</i>	
r	0,889
Valor-p	< 0,0001



Corteza prefrontal dorsolateral	DFC
Corteza prefrontal ventrolateral	VFC
Corteza cingulada anterior (rostral)	MFC
Corteza frontal orbitaria	OFC
Corteza motora primaria	M1C
Corteza somatosensorial primaria	S1C
Corteza parietal posteroventral (inferior)	IPC
Corteza auditiva primaria (núcleo)	A1C
Corteza temporal superior posterior (caudal)	STC
Corteza temporal inferolateral	ITC
Corteza visual primaria (corteza estriada)	V1C
Hipocampo (formación del hipocampo)	HIP
Complejo amigdalóide	AMY
Cuerpo estriado	STR
Núcleo medio dorsal del tálamo	MD
Corteza cerebelosa	CBC

Figura 7: *HOXD1* se expresa en cerebro en desarrollo y cerebro adulto en

**humano.** A. Mapa calórico que representa la expresión de genes HOX durante el desarrollo y en cerebro adulto normal. Se incluyen genes HOX cuyo rol ha sido descrito en GBM. La mayoría de estos tienen un rol oncogénico a excepción de *HOXA11*, *HOXB1* y *HOXD10* que se asocian a genes supresores tumorales. Entre todos estos genes se destaca la expresión de *HOXD1* que a diferencia de los demás genes se expresa en cerebro en desarrollo y cerebro adulto normal. B. Gráfico agrupado que ilustra la expresión de *HOXD1* y su blanco transcripcional *MOG*, en muestras de cerebro de donadores de distintas edades. La expresión de *HOXD1* comienza a partir de la semana 24 post concepción y se mantiene en tejido cerebral adulto. *MOG* presenta un perfil de expresión similar a *HOXD1*, con una alta correlación positiva. C. En cerebro adulto se evidencia una amplia distribución en la expresión de *HOXD1* en estructuras cerebrales de donador adulto sano. El mapa calórico se generó en la página de consulta en línea <https://www.brainspan.org/rnaseq/searches>. La expresión génica corresponde a los z-score calculados a partir de los datos de expresión en RPKM. Para el análisis estadístico se utilizó el test Kruskal–Wallis y post test de Dunn. Junto a los gráficos se detalla el valor p de las comparaciones entre grupos que mostraron significancia.

Evaluamos en datos de pacientes con GBM si la expresión de *HOXD1* se asocia con diferenciación. Para esto, utilizamos los datos de expresión de pacientes con GBM, obtenidos de la base de datos de TCGA (173 pacientes), y determinamos los procesos biológicos enriquecidos a partir de genes que correlacionan significativamente con *HOXD1*. El enriquecimiento en la base Gene Ontology mostró que los genes que correlacionan positivamente con *HOXD1* se asocian en



general con procesos del desarrollo del sistema nervioso, en donde destacan la diferenciación neuronal y la diferenciación de células gliales (Tabla 2).

**Tabla 2:** Procesos biológicos enriquecidos a partir de genes que correlacionan positivamente con *HOXD1* en pacientes con GBM. Seleccionamos los procesos biológicos de interés para nuestro estudio. (La versión completa se adjunta en el material suplementario)

<b>GO biological process complete</b>	<b>Homo sapiens - REFLIST (20589)</b>	<b>Fold enrichment</b>	<b>raw P-value</b>	<b>FDR</b>
central nervous system myelination (GO:0022010)	23	3.98	1.53E-04	7.38E-03
axon ensheathment in central nervous system (GO:0032291)	23	3.98	1.53E-04	7.36E-03
oligodendrocyte development (GO:0014003)	42	3.43	1.34E-05	8.76E-04
oligodendrocyte differentiation (GO:0048709)	66	3.07	2.52E-06	2.04E-04
regulation of nervous system process (GO:0031644)	144	2.55	4.14E-08	4.84E-06
ensheathment of neurons (GO:0007272)	112	2.34	1.76E-05	1.12E-03
axon ensheathment (GO:0008366)	112	2.34	1.76E-05	1.11E-03
positive regulation of neuron differentiation (GO:0045666)	91	2.23	2.55E-04	1.11E-02
glial cell development (GO:0021782)	110	2.14	1.89E-04	8.83E-03
central nervous system neuron differentiation (GO:0021953)	169	2.13	4.00E-06	3.12E-04
regulation of neuron differentiation (GO:0045664)	190	2.07	3.34E-06	2.66E-04
neuron differentiation (GO:0030182)	1018	2.05	4.18E-27	1.31E-23
neuron development (GO:0048666)	819	2.04	1.12E-21	9.76E-19
neuron migration (GO:0001764)	126	2.03	2.92E-04	1.25E-02

generation of neurons (GO:0048699)	1081	2.02	1.75E-27	6.86E-24
regulation of neuron projection development (GO:0010975)	432	2.02	1.64E-11	3.43E-09
axonogenesis (GO:0007409)	350	2.00	3.11E-09	4.42E-07
cell morphogenesis involved in neuron differentiation (GO:0048667)	422	2.00	5.27E-11	1.01E-08
neurogenesis (GO:0022008)	1223	1.96	2.34E-28	1.22E-24
glial cell differentiation (GO:0010001)	169	1.94	1.18E-04	5.92E-03
regulation of nervous system development (GO:0051960)	437	1.92	7.35E-10	1.15E-07
positive regulation of nervous system development (GO:0051962)	268	1.91	1.92E-06	1.62E-04
regulation of neurogenesis (GO:0050767)	358	1.88	6.86E-08	7.74E-06
gliogenesis (GO:0042063)	219	1.79	1.21E-04	6.05E-03
nervous system development (GO:0007399)	2081	1.78	1.26E-34	1.97E-30
positive regulation of neurogenesis (GO:0050769)	220	1.76	2.43E-04	1.08E-02

En contraste, encontramos que los procesos biológicos enriquecidos a partir de genes cuya correlación con *HOXD1* es negativa, se relacionan a la mantención de la troncalidad y proliferación de progenitores neurales (Tabla 3). Estos resultados sugieren que *HOXD1* se asocia a procesos de diferenciación neural.

**Tabla 3:** Procesos biológicos enriquecidos a partir de genes que correlacionan negativamente con *HOXD1* en pacientes con GBM. Seleccionamos los procesos biológicos de interés para nuestro estudio. (La versión completa se adjunta en el material suplementario)

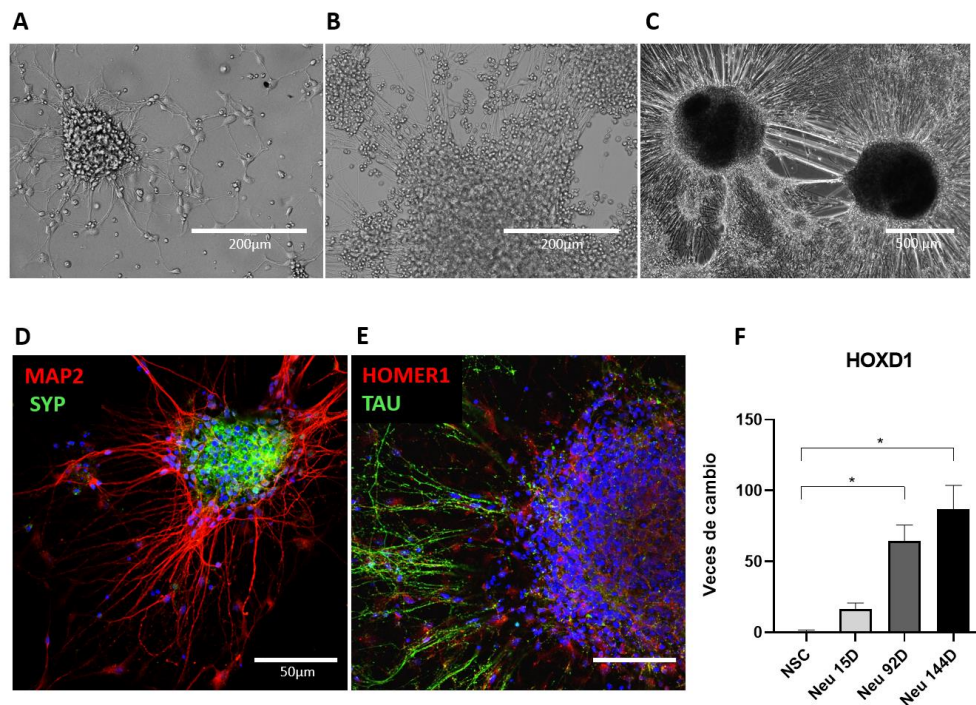
GO biological process complete	Homo sapiens -	Fold enrichment	raw P-value	FDR
--------------------------------	----------------	-----------------	-------------	-----

	<b>REFLIST (20589)</b>			
positive regulation of neural precursor cell proliferation (GO:2000179)	53	3.58	6.02E-05	4.45E-03
regulation of neural precursor cell proliferation (GO:2000177)	88	3.37	1.46E-06	1.92E-04
regulation of stem cell differentiation (GO:2000736)	88	2.70	2.23E-04	1.32E-02
stem cell population maintenance (GO:0019827)	111	2.35	8.34E-04	3.65E-02
negative regulation of cell differentiation (GO:0045596)	662	1.49	8.11E-04	3.59E-02

### ***HOXD1* se expresa en neuronas derivadas de hiPSC**

En relación con los procesos biológicos enriquecidos a partir de los genes que correlacionan positivamente con *HOXD1*, en datos de expresión de pacientes con GBM, destacamos los procesos de diferenciación neural. Está ampliamente reportado en la literatura que las neuronas y células gliales, derivan de una célula tronca neural común (NSC, por sus siglas en inglés neural stem cell) (Hirabayashi & Gotoh, 2010; Namihira & Nakashima, 2013; Yao et al., 2016). Por lo tanto, es probable que el potencial rol de *HOXD1* en la diferenciación no solamente se limite al linaje glial y también participe en la generación de neuronas. En consecuencia, mediante RTqPCR evaluamos de manera exploratoria la expresión de *HOXD1* un modelo *in vitro* de la diferenciación de NSC a neuronas de la corteza cerebral (Figura 8 A-C). Estas neuronas se diferenciaron a partir de NSC obtenidos a partir de células madre pluripotentes humanas (hiPSC, por sus siglas en inglés human induced pluripotent stem cells) inducidas a partir de células somáticas de un donante

sano. Encontramos que *HOXD1* no se expresa en NSC, pero si en neuronas de distintos tiempos de diferenciación (Figura 8 F). Además, la expresión de *HOXD1* es mayor en neuronas cuyo tiempo de diferenciación es superior a los 60 días, estado en el cual se evidencia la expresión de marcadores neuronales y sinápticos (Figura 8 D y E). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que *HOXD1* podría tener un rol en la diferenciación neural, lo cual, evidentemente, debe ser corroborado por futuras investigaciones.



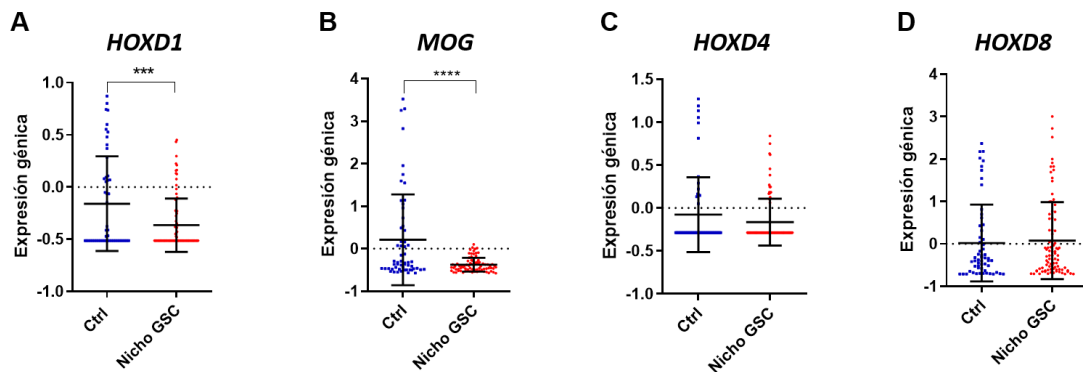
**Figura 8: *HOXD1* se expresa en neuronas diferenciadas *in vitro* a partir de NSC derivadas de hiPS. A. B. y C. Imágenes representativas de neuronas y agregados neuronales de 30, 70 y 100 días de diferenciación, respectivamente. D. y E. En neuronas de 60 días de diferenciación se realizó la inmunodetección del marcador dendrítico MAP2 (D) y marcador axonal TAU (E). Adicionalmente, se realizó la**

inmunodetección del marcador pan presináptico sinaptosina (SYP) (D), y el marcador postsináptico HOMER1 (E). La tinción nuclear de DAPI se muestra en azul. F. Análisis de expresión de *HOXD1* mediante RTqPCR. Se observa que este gen aumenta su expresión en neuronas con mayores tiempos de diferenciación, presentando niveles significativamente superiores en neuronas maduras de 92 y 144 días. Datos obtenidos VP lab en el marco de una colaboración (Puvogel, Blanchard y cols, 2022).

### ***HOXD1* se asocia a un fenotipo diferenciado en GBM**

A continuación, evaluamos la expresión de *HOXD1* y su relación con la expresión de marcadores troncales en muestras de GBM. Para estos análisis, utilizamos datos de expresión de RNA-Seq de la base de datos IVYGAP. En esta base, se identificaron putativos grupos de GSC en muestras de GBM, las cuales se aislaron mediante microdissección con láser. La identificación de los putativos nichos de GSC se realizó mediante hibridación *in-situ*, con el uso de 17 sondas validadas para la identificación de GSC. Así, desde 34 tumores de GBM se generaron 148 muestras en total, clasificando muestras con alta expresión de marcadores troncales como putativos nichos GSC, y zonas con baja expresión de estos marcadores como zonas control. Consistentemente, nuestros análisis muestran que la expresión de *HOXD1* es mayor en muestras tumorales con baja expresión de marcadores troncales (Figura 9 A). Adicionalmente, evaluamos la expresión de *MOG*, blanco transcripcional de *HOXD1*, la cual presentó una mayor expresión también en el grupo control con baja expresión de marcadores troncales (Figura 9 B). Estos

resultados sugieren que la expresión de *HOXD1* es mayor en zonas más diferenciadas del tumor, o con menor expresión de marcadores troncales. Cabe mencionar que no se encontró diferencias significativas en la expresión de otros genes del grupo genómico HOXD, *HOXD4* y *HOXD8*, entre las muestras con alta o baja expresión de marcadores troncales (Figura 9 C y D).



**Figura 9: A diferencia de otros genes del mismo grupo genómico, *HOXD1* presenta una mayor expresión en zonas del tumor con baja expresión de marcadores troncales.** Se analizaron datos de RNA-seq de la base IVYGAP, que posee datos de expresión de 148 muestras de GBM las cuales se clasificaron como putativos nichos de GSC o zonas control, que contienen una baja expresión de genes troncales. A. La expresión de *HOXD1* es mayor en zonas con baja expresión de marcadores troncales en comparación a su expresión en putativos grupos de GSC. B. *MOG*, un blanco transcripcional de *HOXD1* y expresado en oligodendrocitos, presenta también una mayor expresión en zonas del tumor con baja expresión de marcadores troncales. C y D. Otros genes del grupo genómico, como *HOXD4* y *HOXD8*, no presentan diferencias significativas en estas dos zonas tumorales comparadas. La expresión génica corresponde a los z-score calculados

a partir de los datos de expresión en FPKM. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba estadística t-test. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

En conjunto, nuestros resultados sugieren que *HOXD1* es un gen con un potencial rol supresor tumoral que puede inducir diferenciación en el contexto del desarrollo del sistema nervioso y de las células madre de glioblastoma.

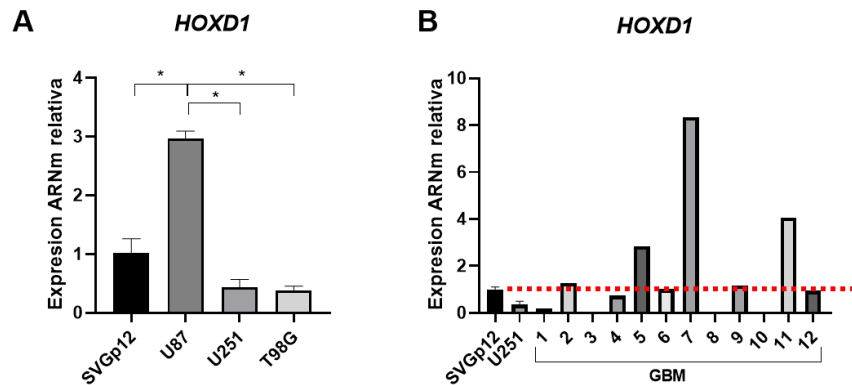
**Objetivo 3: Determinar mediante aproximaciones *in vitro* los niveles de la expresión del potencial gen supresor tumoral en muestras de glioblastoma y evaluar el efecto de la inducción de su expresión en las células madre de glioblastoma**

***HOXD1* presenta diferentes niveles de expresión en líneas celulares y muestras de pacientes con GBM**

Analizamos la expresión de *HOXD1* en tres líneas celulares y 12 muestras de pacientes con GBM, mediante RTqPCR. Establecimos como control la línea celular de astrocitos fetales humanos SVGp12, luego de confirmar la expresión de *HOXD1* en esta línea celular. Los resultados indican que la expresión de este gen presenta diferentes niveles de expresión en las muestras analizadas (Figura 10). En relación con las líneas celulares de GBM, encontramos que las líneas U251 y T98G

presentan una menor expresión de *HOXD1* en comparación con la línea de astrocitos control. Por otro lado, la línea U87 presenta una mayor expresión que las células SVGp12 (Figura 10 A). De manera complementaria, analizamos la expresión de *HOXD8* en estas líneas celulares. Comprobamos que, a diferencia de *HOXD1*, la expresión de *HOXD8* es significativamente mayor en las tres líneas de GBM en comparación con el control (Figura S 3), lo cual es consistente con nuestros resultados bioinformáticos.

Los resultados del análisis de la expresión de *HOXD1* en las muestras GBM derivadas de pacientes indica que la mayoría de estas muestras presentan una expresión igual o menor a la línea SVGp12, y solo cuatro de ellas tienen una mayor expresión de este gen (Figura 10 B).



**Figura 10: *HOXD1* presenta distintos niveles de expresión en líneas celulares y muestras de pacientes con GBM.** Analizamos la expresión de *HOXD1* en líneas celulares y muestras tumorales de pacientes con GBM mediante RTqPCR. A. Observamos que, en relación con la expresión de la línea de astrocitos fetales humana SVGp12 establecida como control, *HOXD1* presenta mayor expresión en

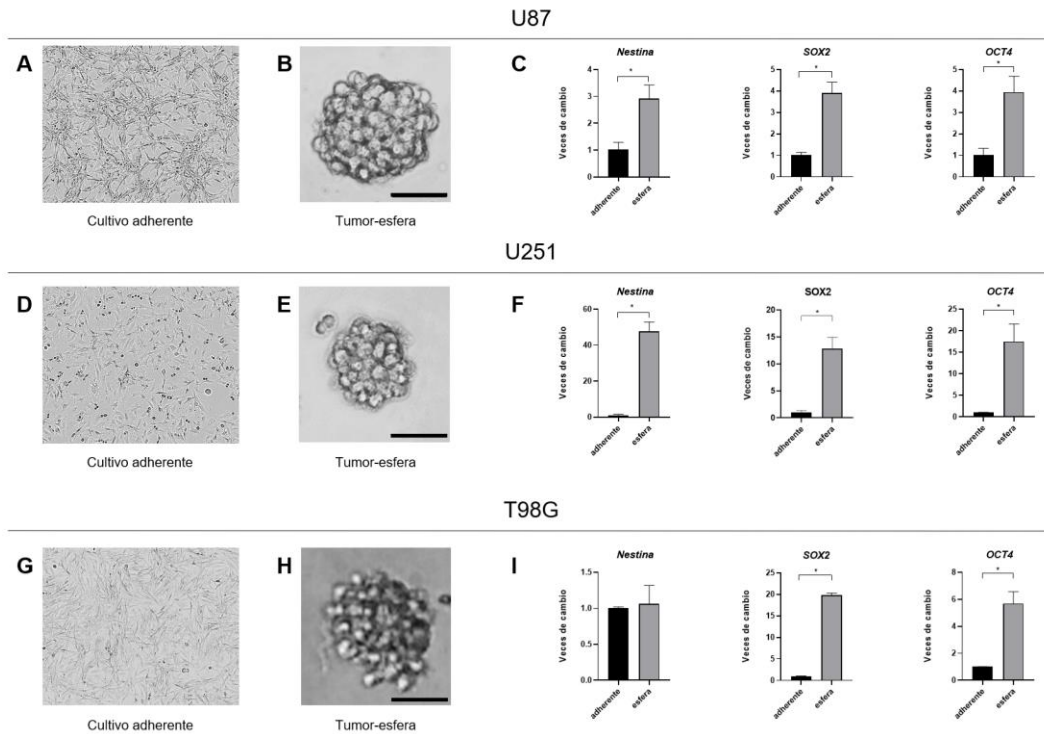


la línea U87. En cambio, las líneas de GBM U251 y T98G presentan menor expresión que *HOXD1* en relación con el control. B. El análisis muestras tumorales de pacientes con GBM (N = 1), se muestra que hay una gran variabilidad en los niveles de expresión de este gen en las muestras de pacientes. Sin embargo, la mayoría de estas presentan niveles de expresión similares o inferiores al control. Para el análisis estadístico se utilizó el test Mann Whitney (one-tailed). \*  $p < 0,05$ .

### ***HOXD1* presenta niveles de expresión similares en cultivos adherentes y cultivos de tumor-esfera de líneas celulares de GBM U87, U251 y T98G**

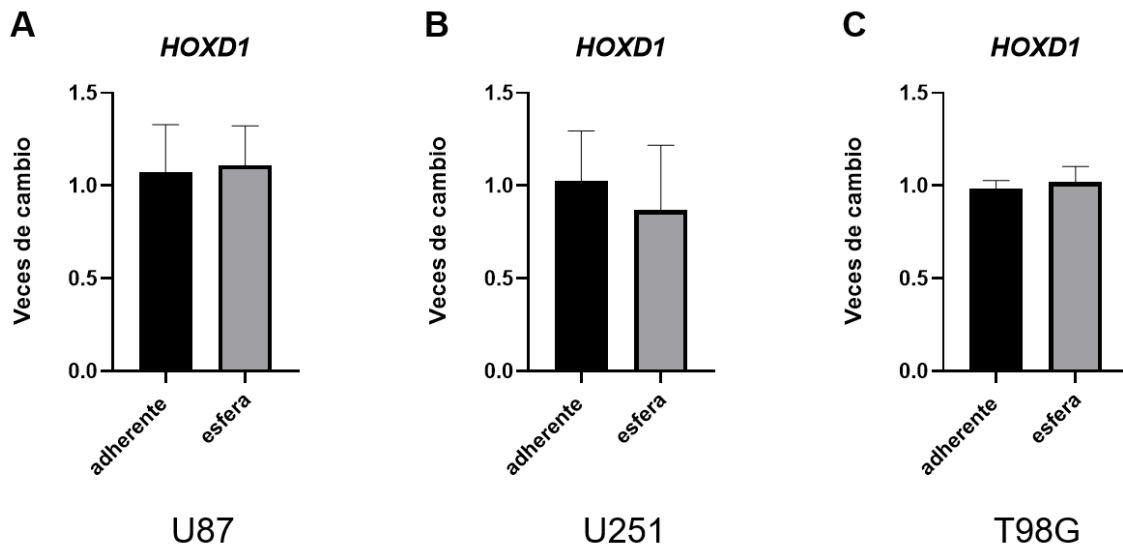
Adicionalmente, evaluamos la expresión de *HOXD1* en tumor-esferas de cultivo de líneas celulares de glioblastoma. Previamente, verificamos que nuestros cultivos de tumor-esfera enriquecían la población de GSC (Figura 11). Para este propósito realizamos cultivo de tumor-esferas de las líneas U87, U251 y T98G de las cuales se purifico ARNm. A partir de estas muestras analizamos, mediante RTqPCR, la expresión de algunos de los marcadores troncales validados para GSC, como son *Nestina*, *SOX2* y *OCT4*. En general, para las líneas celulares encontramos una mayor expresión de marcadores troncales en las tumor-esferas generadas, en comparación con el cultivo adherente (Figura 11 C, F e I). Particularmente, para la línea T98G, observamos que la expresión de *Nestina* no cambia en las tumor-esferas con respecto al cultivo adherente, sin embargo, la expresión de los otros dos marcadores troncales *SOX2* y *OCT4* aumentan significativamente. Luego de confirmar el enriquecimiento de las GSC, evaluamos la expresión de *HOXD1* en las tumor-esferas de las líneas de GBM previamente mencionadas. No encontramos

diferencias significativas en la expresión de *HOXD1* en las tumor-esferas en comparación con el cultivo adherente (Figura 12 A-C).



55

**Figura 11: El cultivo de tumor-esferas de líneas celulares de glioblastoma, U87, U251 y T98G, enriquece la población de GSC.** A. D. y G. Cultivos adherentes de las líneas celulares U87, U251 y T98G, respectivamente. B. E. y H. Imágenes representativas de tumor-esferas generadas a partir de las líneas U87, U251 y T98G respectivamente. Barra de escala: 50µm. C. F. y I. Análisis de la expresión de marcadores de troncalidad *Nestina*, *SOX2* y *OCT4*, en los cultivos de tumor-esferas de las líneas celulares de GBM. Se observa que hay un aumento de los niveles de los marcadores de troncalidad validados para GSC, lo que indica que hay un enriquecimiento de esta subpoblación de células de GBM en el cultivo. Para el análisis estadístico se utilizó el test Mann-Whitney (one tailed). \*  $p < 0,05$ .



**Figura 12: No se observan cambios en los niveles de expresión de *HOXD1* entre los cultivos adherentes y de tumor-esferas de líneas celulares de GBM.**

A. B. y C. Mediante RTqPCR se analizó la expresión de *HOXD1* en células de cultivo adherente y de tumor-esfera de células de GBM U87, U251 y T98G, respectivamente. El análisis estadístico Mann Whitney no mostró diferencias significativas en los niveles de expresión de *HOXD1* entre estos tipos de cultivo.

**La activación de la expresión de *HOXD1* en GSC derivadas de líneas celulares de GBM reduce sus características troncales**

## Diseño de sistema Cre/LoxP para la expresión inducible de *HOXD1* en GSC

Con el objetivo de comprobar si *HOXD1* tiene el potencial de inducir diferenciación en las GSC, diseñamos una combinación de transducciones virales, basados en la tecnología Cre/LoxP, para inducir la expresión de *HOXD1* particularmente en las GSC derivadas de las líneas de GBM.

Para la primera transducción viral utilizamos un vector retroviral pRetroQ-Cre-ERT2 (addgene, plasmid #59701) para la expresión de la proteína recombinasa Cre modificada, unida a la forma mutante T2 del dominio de unión al ligando del receptor de estrógeno (Figura 13). La transducción eficiente de este vector retroviral en modelos celulares conlleva a la expresión constitutiva de Cre-ERT2, regulado por el promotor de citomegalovirus (CVM). La recombinación específica mediada por Cre-ERT2 es regulada en base a una inducción química por 4-hidroxitamoxifeno (4OHT) (Feil et al., 1997; Felker et al., 2016), metabolito de tamoxifeno que presenta alta afinidad por el dominio de unión al ligando del receptor de estrógeno (Felker et al., 2016; Robertson et al., 1982). Así, en ausencia de 4OHT, Cre-ERT2 se retiene en el citoplasma. Por el contrario, en presencia de 4OHT, Cre-ERT2 transloca de manera transiente al núcleo para realizar la recombinación (Donocoff et al., 2020; Feil et al., 1997; Felker et al., 2016; Robertson et al., 1982).



Vector Retroviral



**Figura 13: Vector retroviral pRetroQ.** Vector retroviral utilizado para la generación de líneas de GBM que expresan la proteína recombinasa CRE-ERT2 de forma estable. En el esquema se destacan algunos elementos génicos relevantes como el promotor utilizado para la expresión de CRE-ERT2, y el gen de selección de resistencia a puromicina, PuroR.

Continuando con nuestro objetivo para la inducción de la expresión de *HOXD1* en las GSC, diseñamos dos vectores lentivirales basados en el plásmido pLVX (Figura 14). El primero de estos, pLVX-HOXD1 (Figura 14 A), posee el gen codificante de *HOXD1* cuya expresión está regulada por el promotor de SOX2. La elección del promotor de SOX2 se debe a varios motivos que se describen a continuación. El primero de ellos se relaciona a los reportes bibliográficos que validan a SOX2 como uno de los principales marcadores troncales en las GSC (Caglar & Duzgun, 2023; Garros-Regulez et al., 2016; Lopez-Bertoni et al., 2022; Song et al., 2016), y como un importante blanco terapéutico para reducir esta subpoblación de células tumorales (Gangemi et al., 2009; Garros-Regulez et al., 2016). Adicionalmente, dispusimos seleccionar un marcador troncal que presente una correlación negativa con HOXD1. Así, utilizando las bases de datos transcriptómicos de GBM, realizamos un análisis de correlación entre la expresión de los diferentes marcadores troncales validados para GSC y *HOXD1*. Encontramos de manera consistente que la expresión de SOX2 se correlaciona de manera negativa con *HOXD1* en las bases de datos consultadas (Figura S4). Otro factor importante en la elección del marcador troncal es comprobar el aumento de su expresión en el cultivo de tumor-esfera de las tres líneas de GBM. Como ya se mencionó previamente,

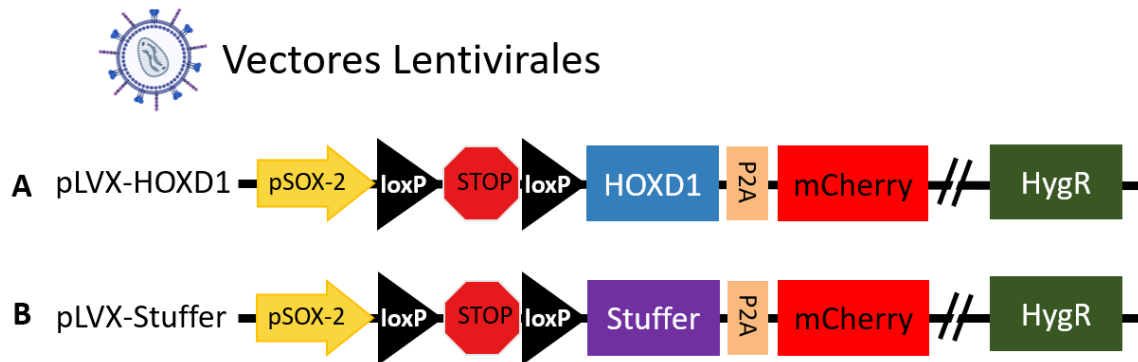
confirmamos el aumento de la expresión de SOX2 en el cultivo de tumor-esfera en la línea U87, U251 y T98G, en relación con su expresión en cultivo adherente (Figura 11). En consecuencia, consideramos una buena estrategia la elección del promotor de SOX2 para activar la expresión de *HOXD1* específicamente en las GSC derivadas de las líneas de GBM.

Continuando con el diseño de nuestros vectores lentivirales, para la regulación temporal de la expresión de *HOXD1*, entre el promotor de *SOX2* y *HOXD1* agregamos el codón de terminación de la traducción (STOP), el cual se encuentra flanqueado por sitios loxP (Figura 14 A). Por lo tanto, en ausencia de la recombinación mediada por la recombinasa Cre, *HOXD1* no se expresa ya que el proceso de traducción termina río arriba de la secuencia de *HOXD1* (Figura 15 C). En cambio, en presencia de 4OHT, que provoca la traslocación nuclear de Cre-ERT2 (Figura 15 B), se induce la recombinación de los sitios loxP eliminando el elemento STOP (Figura 15 D). Así, mediante la adición de 4OHT inducimos la expresión de *HOXD1* específicamente en las GSC.

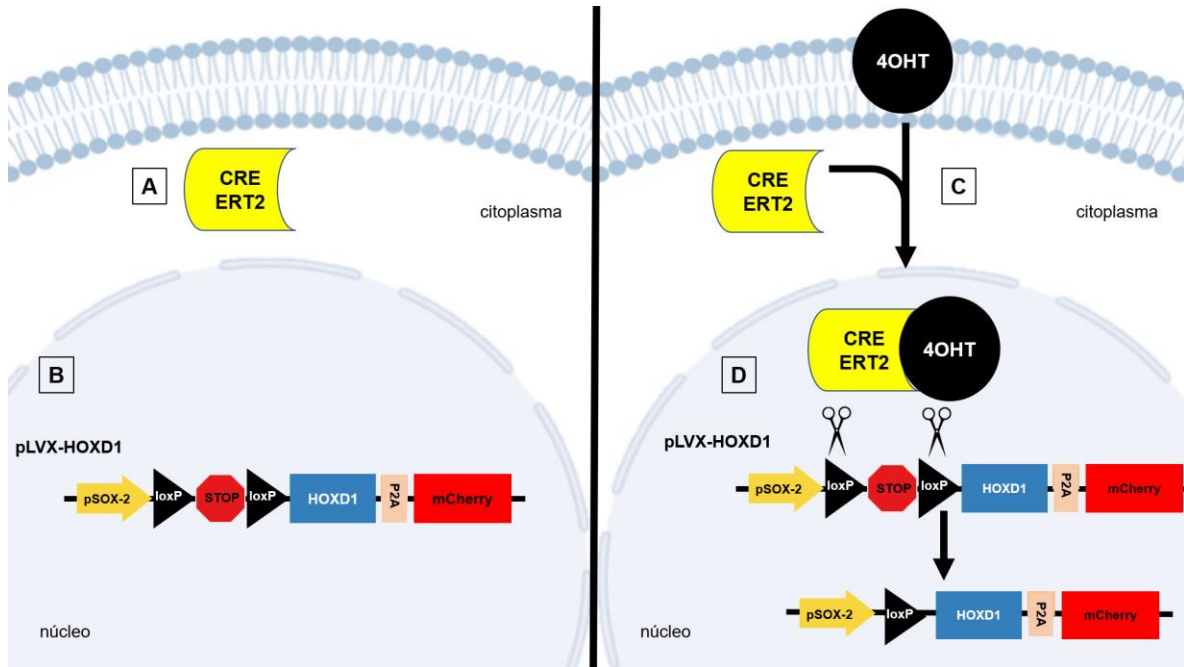
El segundo vector lentiviral que diseñamos corresponde a pLVX-Stuffer (Figura 14 B). El diseño es similar al vector pLVX-HOXD1, pero en lugar de contener la secuencia de *HOXD1*, agregamos la secuencia de un péptido sin función biológica conocida que denominamos Stuffer. En consecuencia, Stuffer se expresará luego de la recombinación de los sitios loxP.

Finalmente, cabe mencionar que en el diseño de pLVX-HOXD1 y pLVX-Stuffer, agregamos un elemento genético reportero de la expresión de ambas secuencias.

Elegimos la proteína mCherry, la cual se ha usado ampliamente como elemento reportero en diferentes modelos de estudio *in vitro* e *in vivo* (Chen et al., 2020; Li et al., 2022; Sun et al., 2022; Zhao et al., 2019). En consecuencia, mCherry se expresará bajo el mismo marco de lectura que *HOXD1* y *Stuffer* (Fig. 14 A y B).



**Figura 14: Vectores lentivirales para la expresión de HOXD1 y Stuffer en las GSC.** A. y B. Vectores lentivirales basados en el plásmido pLVX para la expresión de HOXD1-mCherry y el control, Stuffer-mcherry, respectivamente. La secuencia génica de ambas proteínas quimeras está regulada por el promotor de SOX2 para asegurar la expresión específica en GSC. Adicionalmente, se agregó un elemento para la regulación temporal de la expresión de ambas proteínas quimeras. Ambos vectores presentan el elemento de la secuencia STOP de terminación de la transcripción flanqueado por secuencias loxP, y posicionado entre el promotor de SOX2 y la secuencia de las proteínas quimeras. Solo mediante la presencia del inductor químico 4OHT se producirá la recombinación entre los sitios loxP y la expresión de las proteínas quimeras. Adicionalmente, en el esquema se destacan otro elemento génico relevante el cual corresponde al gen de selección de resistencia a higromicina B, HygR.



**Figura 15: Mecanismo de recombinación de secuencias loxP inducida por 4OHT.** A. En ausencia de 4OHT, la recombinasa modificada Cre-ERT2 es mantenida en el citoplasma. B. Secuencia génica de interés diseñada para la expresión de *HOXD1* regulada por el promotor de SOX2. Entre estos elementos génicos se encuentra la secuencia de terminación de la transcripción (“STOP”) flanqueada por las secuencias loxP que interrumpe la expresión de *HOXD1*. C. Al ingresar a la célula, 4OHT se une al dominio ERT2, permitiendo que la recombinasa Cre-ERT2 se internalice al núcleo celular. D. En el núcleo celular, Cre-ERT2 induce la recombinación de las secuencias loxP, eliminando así la secuencia STOP y permitiendo la expresión de *HOXD1*.

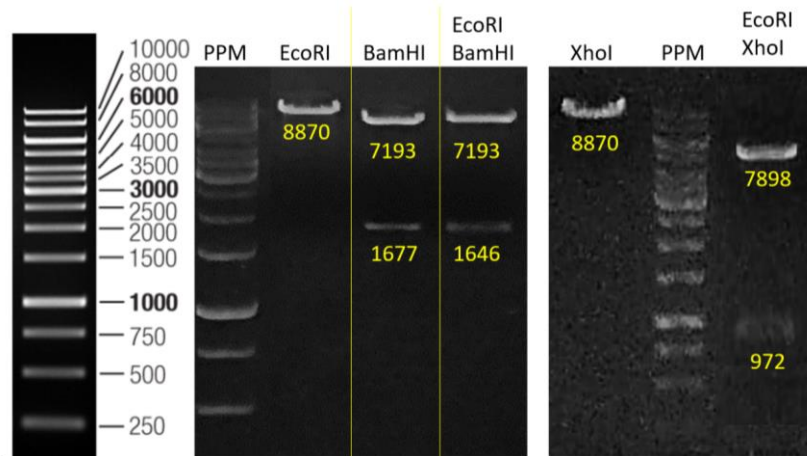


## **Amplificación de los plásmidos retrovirales y lentivirales en la cepa de *E. coli***

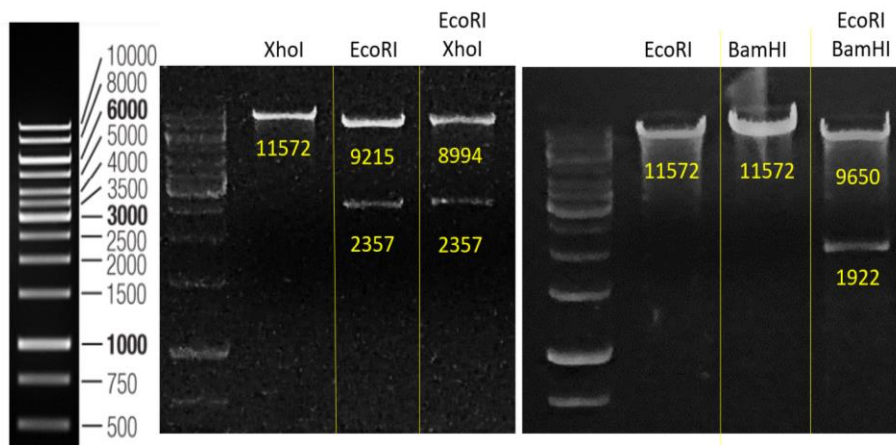
### **Stbl3**

Para la amplificación de los vectores se utilizó la cepa de *E. coli* Stbl3. Esta cepa bacteriana se destaca por conferir alta estabilidad en la mantención estructural de plásmidos recombinantes basados en lentivirus (Al-Allaf et al., 2013). La transformación bacteriana con el vector pRetroQ-Cre-ERT2, se realizó con bacterias quimio-competentes las cuales se transformaron mediante el protocolo recomendado por el fabricante (previamente descrito). Para la transformación bacteriana con los plásmidos pLVX-HOXD1 y pLVX-Stuffer, el método de shock térmico no resultó eficiente debido a gran tamaño de los plásmidos (~11.000pb). Por esta razón, a partir de la cepa comercial Stbl3 se prepararon bacterias electro-competentes y se transformaron mediante el método de electroporación (Lessard, 2013), tal como se describe en la metodología. Luego de la transformación, las bacterias se sembraron en placas con el medio selectivo de LB-ampicilina a 37°C por 16 h. Posteriormente, se tomó un inóculo de las colonias formadas en cada placa y se preparó un cultivo a escala mini-preparativa de 15 mL de medio LB-ampicilina. A partir de estos cultivos se realizó extracción de ADN plasmidial para confirmar la identidad de cada plásmido mediante ensayo de restricción utilizando diferentes enzimas. Confirmamos la obtención de bacterias transformadas ya que el tamaño de los fragmentos generados en las diferentes digestiones enzimáticas, coinciden con el tamaño predicho para la digestión de cada vector (Figuras 16-18). Con el fin de obtener una mayor cantidad de ADN plasmidial, para la generación de los vectores retrovirales y lentivirales, se realizaron cultivos a escala midi-preparativa. Se seleccionó una colonia transformada por cada vector, de la cual se

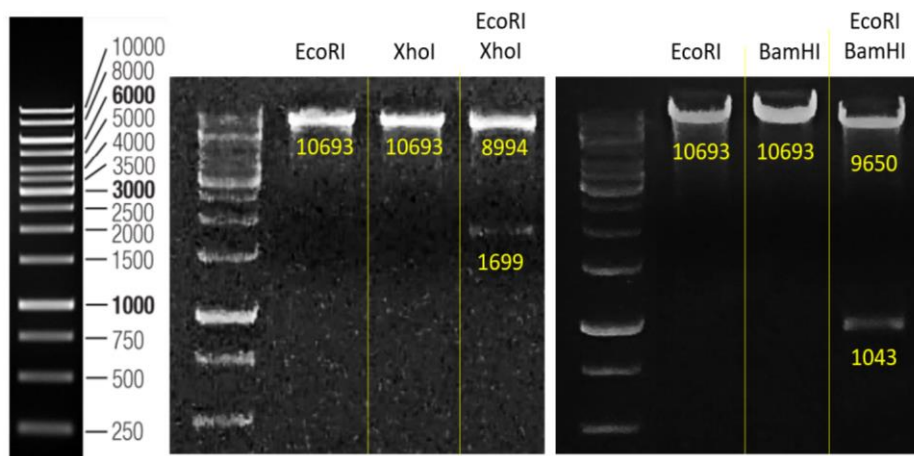
tomó un inoculo para generar un cultivo de 300 mL de LB-ampicilina, el cual se creció a 37°C por 16 h. Finalmente, se purifico el ADN plasmídico con el kit NucleoBond Xtra Midi, el cual se utilizó para la generación de las partículas lentivirales, como se describe en la metodología.



**Figura 16: Digestión enzimática del vector retroviral pRetroQ-Cre-ERT2.** A la izquierda se observa los tamaños del patrón de peso molecular (PPM). Para la identificación del plásmido pRetroQ-Cre-ERT2 se usaron las enzimas de restricción EcoRI, BamHI y XhoI, las cuales se utilizaron para la generación de digestiones simples o dobles. En amarillo se destaca el tamaño molecular predicho, el cual coincide con el tamaño de los productos de las digestiones enzimáticas.



**Figura 17: Digestión enzimática del vector lentiviral pLVX-HOXD1.** A la izquierda se observa los tamaños del patrón de peso molecular (PPM). Para la identificación del plásmido pLVX-HOXD1 se usaron las enzimas de restricción EcoRI, BamHI y XhoI, las cuales se utilizaron para la generación de digestiones simples o dobles. En amarillo se destaca el tamaño molecular predicho, el cual coincide con el tamaño de los productos de las digestiones enzimáticas.



**Figura 18: Digestión enzimática del vector lentiviral pLVX-Stuffer.** A la izquierda se observa los tamaños del patrón de peso molecular (PPM). Para la identificación

del plásmido pLVX-Stuffer se usaron las enzimas de restricción EcoRI, BamHI y XhoI, las cuales se utilizaron para la generación de digestiones simples o dobles. En amarillo se destaca el tamaño molecular predicho, el cual coincide con el tamaño de los productos de las digestiones enzimáticas.

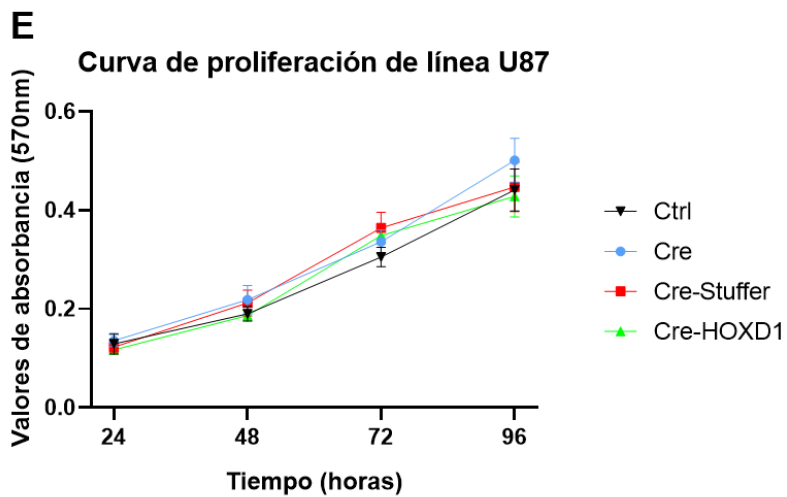
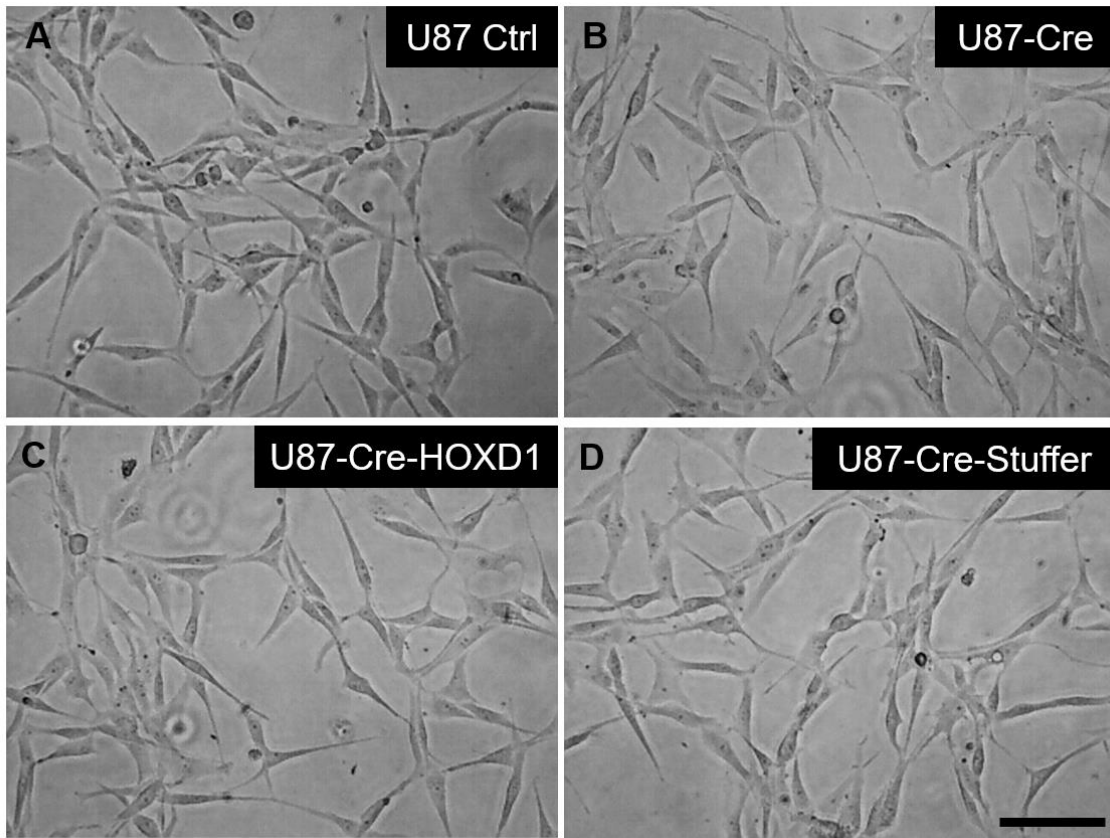
### **Generación de líneas estables de GBM para la expresión de *HOXD1* en las GSC**

La generación de líneas estables de GBM para inducir la expresión de *HOXD1* mediante el tratamiento con tamoxifeno, se obtuvo mediante dos transducciones virales. Primero, se realizó la transducción con el vector retroviral pRetroQ-Cre-ERT2. Las partículas retrovirales se generaron en la línea células Phoenix Ampho (ATCC, CRL3213), la cual contiene la secuencia génica para las proteínas de empaquetamiento y envoltura de las partículas retrovirales (Swift et al., 2001). El procedimiento de obtención de las partículas retrovirales se detalla en la metodología.

Brevemente, las líneas de GBM U87 y T98G se sembraron en placas de 12 pocillos en una densidad de  $2 \times 10^4$  células/ pocillo. Al alcanzar el 40% de confluencia se agregó el medio de cultivo fresco y complementado con las partículas retrovirales, como se detalla en la metodología. Luego de 72 h de transducción, las células eficientemente transducidas se seleccionaron con el antibiótico de selección puromicina el cual se agregó al medio de cultivo celular en una concentración de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las células se mantuvieron con este antibiótico hasta un pasaje después de la muerte de las células control, correspondiente a células sin transducir. Durante el transcurso de la transducción de las células de GBM y durante la selección con el

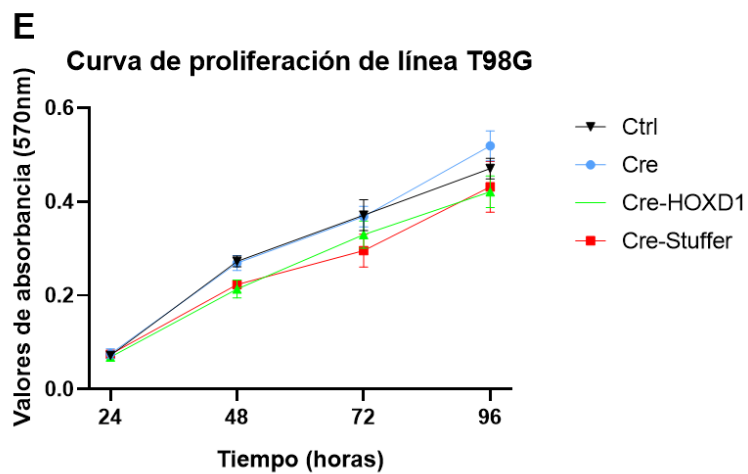
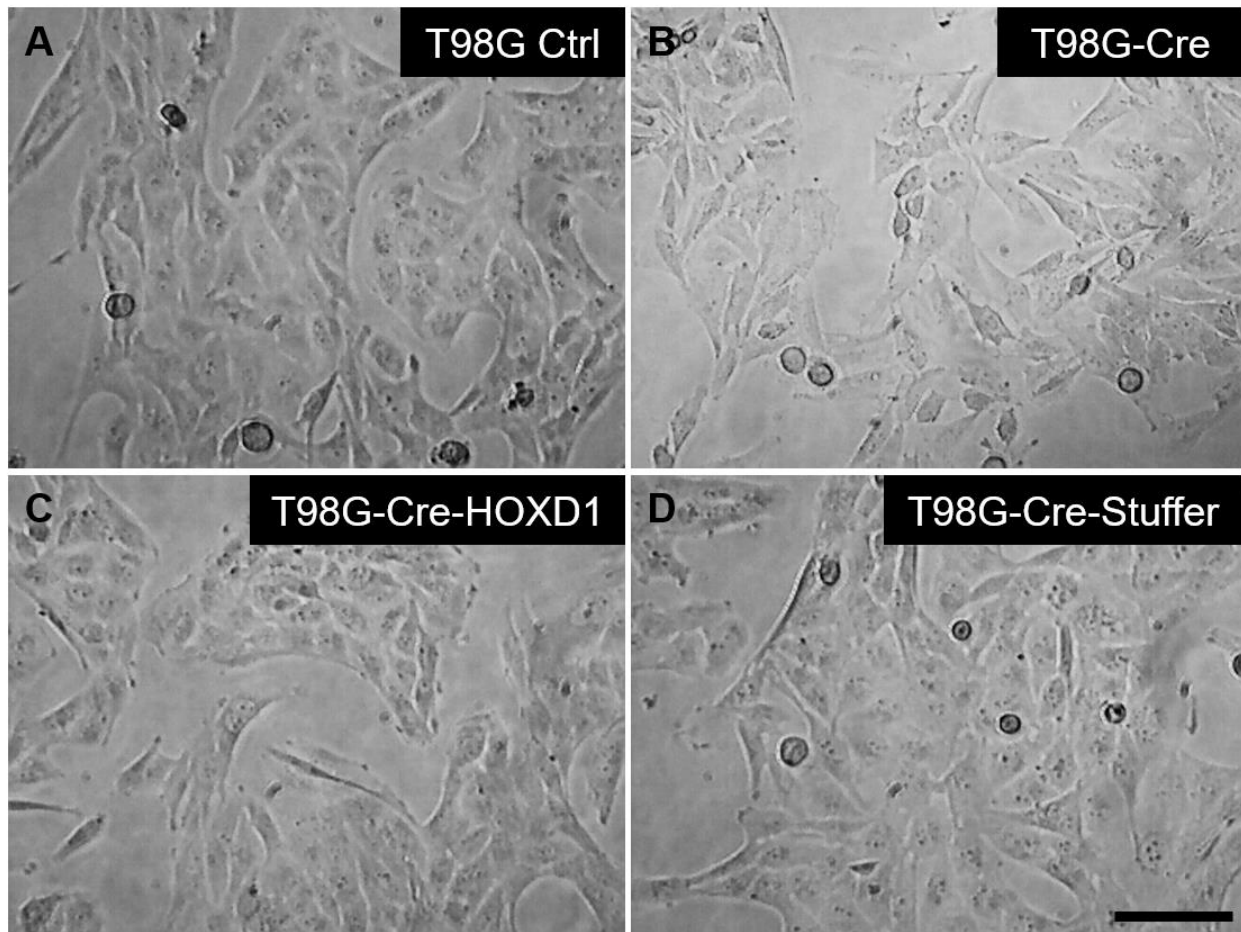
antibiótico no se observaron cambios morfológicos observables, tanto para la línea U87 (Figura 19 A y B) como para la línea T98G (Figura 20 A y B). Realizamos un ensayo de MTT que se utiliza para evaluar la actividad metabólica, la cual puede servir como indicador de la proliferación celular (Kumar et al., 2018; Sylvester, 2011). Estos análisis, no muestran diferencias significativas entre las células transducidas, U87-CRE y T98g-CRE, y las líneas control sin transducir (Figura 19 E, Figura 20 E).

Luego de la transducción retroviral y selección con puromicina, se realizó la transducción lentiviral. Se sembraron células de las líneas U87-CRE y T98G-CRE en placa de 12 pocillos, en la misma densidad descrita para la transducción retroviral. Se realizó una transducción por 72 h, en la cual las partículas retrovirales se agregaron al medio de cultivo estándar para la mantención de estas células. Luego de la transducción viral, se agregó medio de cultivo fresco el cual se cambió regularmente hasta que las células alcanzaron una confluencia del 80%. A continuación, se agregó el antibiótico de selección, Higromicina B, el cual se suplementó en el medio de cultivo en una concentración de 500 µg/mL. Las células se mantuvieron con el antibiótico de selección hasta un pasaje después de la muerte de las células control, correspondiente a células sin transducir. Durante la generación de las líneas estables de GBM, U87-Cre-HOXD1, U87-Cre-Stuffer, T98G-Cre-HOXD1 y T98G-Cre-Stuffer, no se observaron cambios morfológicos observables en relación con las células control sin transducir U87 y T98G (Fig. 19 A-D, Fig. 20 A-D). De igual manera, el ensayo de proliferación celular muestra que no hay diferencias significativas entre las líneas y los respectivos controles (Fig. 19 E, Fig. 20 E).



**Figura 19: No se observaron cambios morfológicos ni proliferativos luego de transducciones virales en las líneas derivadas de U87. A.B.C. y D. Se muestran imágenes representativas de la línea celular U87 control y de las líneas derivadas de las transducciones virales U87-Cre, U87-Cre-HOXD1 y U87-Cre-Stuffer,**

respectivamente. Barra de referencia: 100µm. E. Curvas de proliferación de la línea U87 control y sus derivadas, obtenidas mediante el ensayo de MTT realizado a las 24, 48, 72 y 96 h de cultivo. No se observan cambios estadísticamente significativos entre las curvas.



**Figura 20: No se observaron cambios morfológicos ni proliferativos luego de transducciones virales en las líneas derivadas de T98G.** A.B.C y D. Se muestran imágenes representativas de la línea celular T98G control y de las líneas derivadas de las transducciones virales T98G-Cre, T98G-Cre-HOXD1 y T98G-Cre-Stuffer, respectivamente. Barra de referencia: 100µm. E. Curvas de proliferación de la línea T98G control y sus derivadas, obtenidas mediante el ensayo de MTT realizado a las 24, 48, 72 y 96 h de cultivo. No se observan cambios estadísticamente significativos entre las curvas.

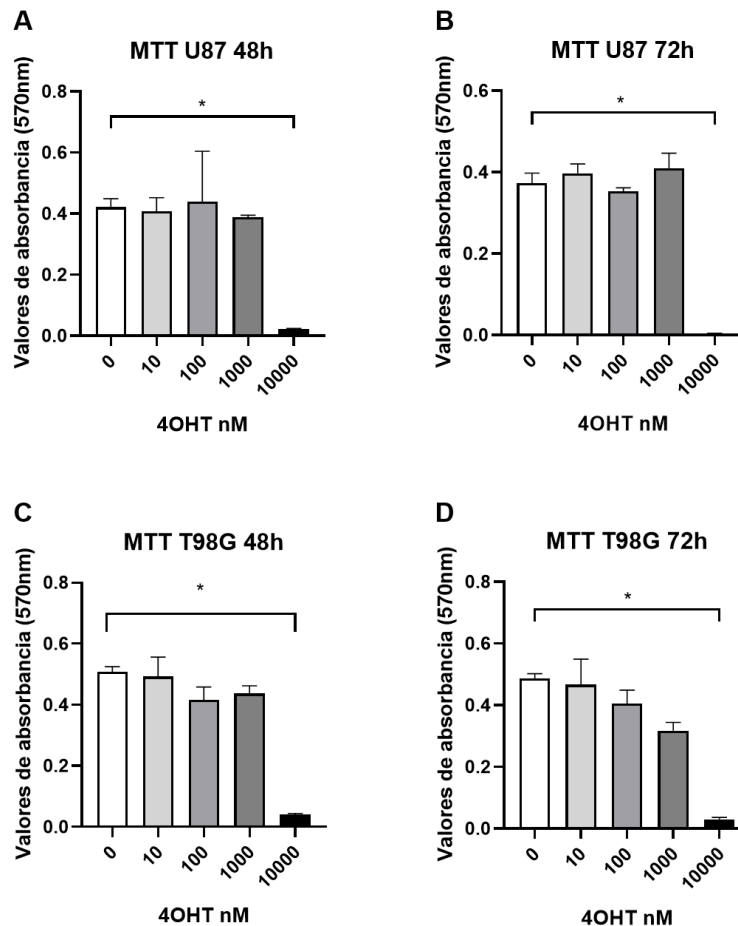
### **Determinación de la concentración óptima de 4OHT para el tratamiento de las líneas de GBM**

Para evaluar el efecto de la expresión de *HOXD1* en las GSC, primero se estableció la concentración adecuada de 4OHT para inducir la recombinación en las líneas de GBM Cre-HOXD1 y Cre-Stuffer. Es imperativo establecer las concentraciones que son tóxicas para las células de GBM, para asegurar que posibles resultados obtenidos en la inducción de *HOXD1*, asociados a muerte celular o disminución de proliferación, sean consecuencia de la expresión de dicho gen y no por el efecto tóxico de 4OHT. Para este propósito, evaluamos la actividad metabólica mediante ensayo de MTT, siendo este un ensayo indicativo de procesos celulares como viabilidad, proliferación y citotoxicidad (Kumar et al., 2018; Sylvester, 2011). Para

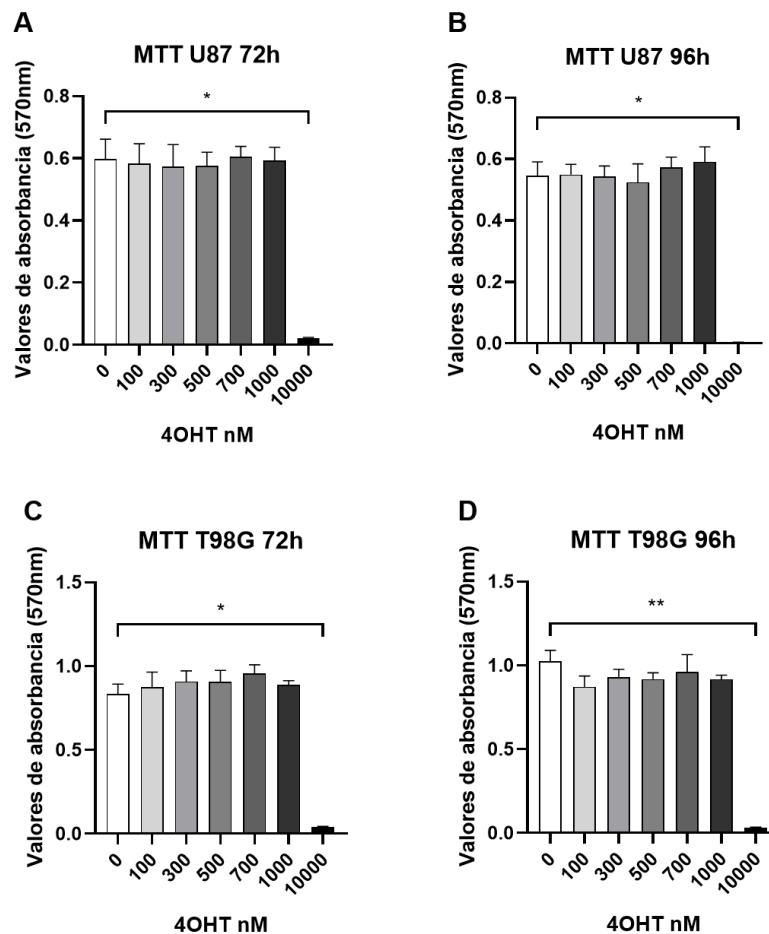


este ensayo decidimos utilizar solamente las líneas celulares U87-Cre y T98G-Cre. Esto, para descartar efectos citotóxicos debido a la recombinación inducida por 4OHT y la inducción de la expresión de HOXD1 o Stuffer. En consecuencia, revisamos la literatura y encontramos el reporte de tratamientos con 4OHT en cultivos primarios de gliomas y líneas de GBM (Chen et al., 2010; Lewis et al., 2015; Nogueira et al., 2008; W. Yang et al., 2013; Yaz et al., 2004). El rango de concentraciones reportadas para 4OHT incluye desde 100 nM hasta 10  $\mu$ M. En base a estos antecedentes, evaluamos la actividad metabólica en las líneas U87-Cre y T98G-Cre tratadas con 10, 100, 1000, 10.000 nM de 4OHT, por 48 y 72 h. Utilizamos como control células tratadas con el volumen equivalente de etanol 100%, el cual corresponde al solvente de 4OHT. Los resultados en ambas líneas celulares son similares, e indican que el tratamiento por 48 y 72 h con 10.000 nM de 4OHT es tóxico para las células, lo cual es evidenciado por una reducción significativa de los valores de absorbancia correspondiente a las células tratadas con dicha concentración de 4OHT, respecto al control (Figura 21 A-D). Los valores de absorbancia obtenidos de células tratadas con concentraciones de 10-1000 nM no muestran diferencias significativas, aunque se observa una tendencia en la disminución de los valores de absorbancia de las células T98G-Cre tratadas con 1000 nM por 72 h. En base a estas observaciones, consideramos necesario evaluar el efecto por un tratamiento más prolongado, correspondiente a 96 h, para determinar si esta tendencia en la disminución de la absorbancia se hace significativa. Además, dado que las concentraciones más reportadas en las literaturas para el tratamiento de las líneas de GBM corresponden a 100-500 nM, decidimos evaluar concentraciones de 4OHT en un rango más acotado. Los

resultados indican que, la absorbancia de células tratadas con 4OHT en concentraciones incluidas en un rango de 100-1000 nM por 72 y 96 h, no muestran diferencias significativas respecto a la absorbancia del control correspondiente a células no tratadas (Figura 22). Estos resultados sugieren que en este rango de concentraciones de 4OHT no se observan cambios en la actividad metabólica, aunque se extienda el tiempo de tratamiento. Finalmente, decidimos realizar los próximos tratamientos de la inducción de la recombinación mediada por Cre-ERT2, con 300 nM de 4OHT por 48h. Además de confirmar que estas condiciones de tratamiento no son tóxicas para las células, corresponden a las condiciones más frecuentes en los tratamientos de las líneas de GBM en la literatura analizada.



**Figura 21: Estimación de la viabilidad celular mediante ensayo de MTT en líneas celulares de GBM tratadas con 10, 100, 1.000 y 10.000nM de 4OHT.** A. y B. Evaluación de la actividad metabólica de células de la línea U87 tratadas con 10, 100, 1.000 y 10.000 nM de 4OHT por 48 y 72 h, respectivamente. C. y D. Evaluación de la actividad metabólica en la línea celular T98G tratadas con 4OHT por 48 y 72 h, respectivamente. Como control, se utilizaron células de ambas líneas de GBM que se trataron con volúmenes equivalentes de etanol 100%, correspondiente al solvente de 4OHT. Los resultados muestran que el tratamiento con 10.000 nM de 4OHT por 48 y 72 h reduce significativamente la actividad metabólica, y por ende la viabilidad celular, de ambas líneas celulares de GBM.



**Figura 22: Estimación de la viabilidad celular mediante ensayo de MTT en líneas celulares de GBM tratadas con 100, 300, 500 y 1.000 nM de 4OHT.** A. y B. Evaluación de la actividad metabólica de células de la línea U87 tratadas con 4OHT por 72 y 96 h, respectivamente. C. y D. Evaluación de la actividad metabólica en la línea celular T98G tratadas con 4OHT por 72 y 96 h, respectivamente. Se utilizaron como control negativo células de ambas líneas de GBM que se trataron con volúmenes equivalentes de etanol 100%, correspondiente al solvente de 4OHT. Adicionalmente, utilizamos como control positivo de toxicidad células de las líneas U87 y T98G tratadas con 10.000 nM de 4OHT. Los resultados muestran que el tratamiento de líneas celulares con 4OHT, en un rango de 100 -1.000 nM, por 72 y 96 h, no reduce los valores de absorbancia en relación con el control negativo. Estos resultados sugieren que el tratamiento con concentraciones de 100-1.000 nM de 4OHT por 72 y 96 h no afecta la actividad metabólica, y por consiguiente la viabilidad celular.

### **La Inducción de la expresión de HOXD1 reduce las características troncales en líneas celulares de GBM**

Para evaluar el efecto de la expresión de *HOXD1* en las GSC, enriquecimos esta subpoblación de células cancerígenas mediante el cultivo de tumor-esfera. Como ya se mencionó previamente, confirmamos el aumento de la expresión de varios marcadores troncales en este tipo de cultivo, lo cual es consistente con lo reportado en la literatura (Qiang et al., 2009). Decidimos comenzar el tratamiento con 4OHT al inicio del cultivo de tumor esferas. Para esto sembramos las células en una

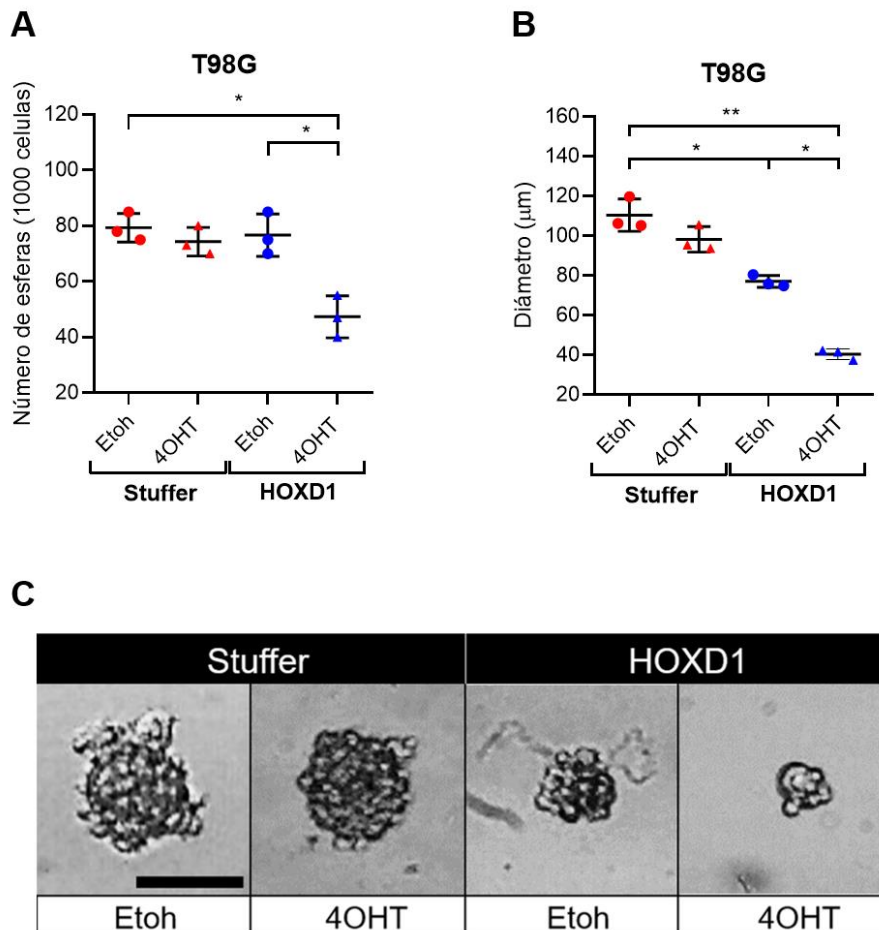
densidad de  $1 \times 10^3$  células/mL en placas de 96 pocillos de baja adherencia, para cultivar las células de manera independiente de un anclaje. Como se destacó previamente, en este tipo de cultivo celular el medio se suplementa con factores de crecimiento que potencian las características troncales. Realizamos el tratamiento con 4OHT al inicio del cultivo para lo cual suplementamos el medio de crecimiento con 300 nM de 4OHT. Debido a que este tipo de cultivo contiene células en suspensión en un bajo volumen, existe un impedimento técnico en cambiar el medio de cultivo completo y, por lo tanto, eliminar la totalidad del 4OHT. Por lo cual, luego de 48 h de tratamiento, se agregó medio de cultivo cada 24 h con el fin de renovar los factores de crecimiento, y para diluir la concentración de 4OHT en el medio. Luego de 7 días de cultivo analizamos el número y tamaño de esferas generadas en las células GBM-Cre-HOXD1 y GBM-Cre-Stuffer. Los resultados muestran interesantes diferencias en el número y tamaño de esferas generadas a partir de GBM-Cre-HOXD1 y GBM-Cre-Stuffer.

En relación con el número de esferas encontramos diferentes resultados en las líneas celulares derivadas de T98G y U87. Para la línea T98G, no encontramos diferencias significativas entre las esferas obtenidas de T98G-Cre-Stuffer y T98G-Cre-HOXD1, en la condición control. Además, no se observaron diferencias significativas entre las esferas obtenidas de la línea T98G-Cre-Stuffer en la condición de tratamiento respecto con la condición control (Figura 23 A). Por el contrario, en la línea T98G-Cre-HOXD1 el tratamiento con 4OHT reduce el número de esferas generadas en relación con el número de esferas obtenidas desde la condición control (Figura 23 A). Con respecto a las líneas derivadas de U87, no se observaron cambios significativos entre las esferas obtenidas de las células tratadas

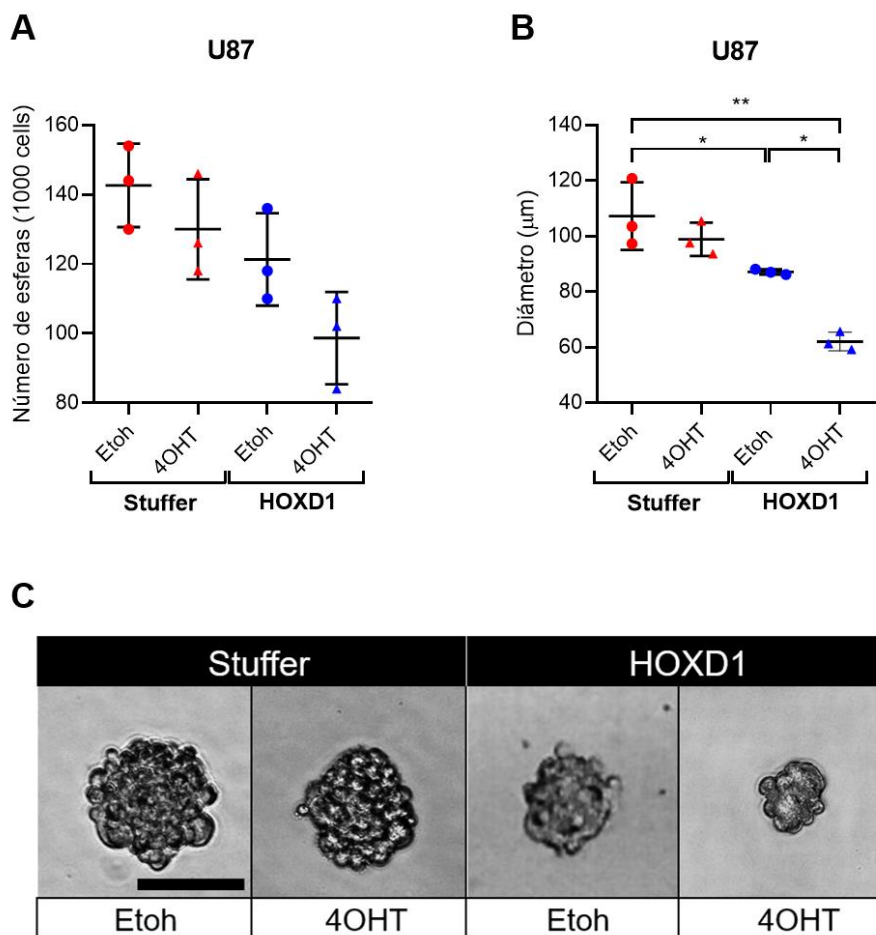
con 4OHT y el control (Figura 24 A). Si cabe mencionar algunas observaciones. Encontramos una tendencia a observar menor número de esferas desde la línea U87-Cre-HOXD1 en relación con el número de esferas obtenidas de la línea U87-Cre-Stuffer. También, encontramos para la línea U87-Cre-Stuffer y U87-Cre-HOXD1, una tendencia en la reducción del número de esferas obtenidas mediante el tratamiento con 4OHT en relación con la condición control (Figura 24 A). Los resultados sugieren que la inducción de la expresión de *HOXD1* en la línea T98G, pero no para la línea U87, disminuye el porcentaje de GSC enriquecido mediante el cultivo de tumor-esferas.

En relación con el diámetro de las esferas generadas, encontramos resultados similares en las líneas derivadas de T98G y U87. Los resultados obtenidos a partir de las líneas derivadas de las células T98G muestran que, las esferas generadas a partir de la línea T98G-Cre-HOXD1 muestran per-sé un menor tamaño que las esferas generadas a partir de la línea T98G-Cre-Stuffer (Figura 23 B y C). Es decir, en la condición de cultivo control de tratamiento, correspondiente a células tratadas con etanol, se observa que las esferas obtenidas de la línea T98G-Cre-HOXD1 presentan menor tamaño que las esferas obtenidas de la línea T98G-Cre-Stuffer. En la línea T98G-Cre-Stuffer no encontramos diferencias significativas en las esferas generadas a partir de células tratadas con 4OHT y la condición de cultivo control (Figura 23 B y C). En cambio, en la línea T98G-Cre-HOXD1 se evidenció que las esferas obtenidas de la condición de cultivo control presentaron mayor tamaño que las esferas obtenidas a partir de células tratadas con 4OHT (Figura 23 B y C). Se obtuvieron resultados similares en relación con el diámetro de las esferas obtenidas de las líneas derivadas de las células U87. Se evidenció que, en la

condición control, las esferas obtenidas a partir de la línea U87-Cre-HOXD1 son de menor tamaño que las esferas obtenidas a partir de U87-Cre-Stuffer (Figura 24 B y C). En la línea U87-Cre-Stuffer, no se observan cambios significativos entre las esferas obtenidas de la condición control y el tratamiento con 4OHT. Por el contrario, el tratamiento con 4OHT reduce de manera significativa el diámetro de las esferas generadas a partir de la línea U87-Cre-HOXD1, en relación con la condición control (Figura 24 B y C). Los resultados obtenidos de las líneas T98G y U87 sugieren que la inducción de la expresión de HOXD1, pero no de Stuffer, reduce el potencial proliferativo de las GSC enriquecidas mediante el cultivo de tumor-esfera.



**Figura 23: La inducción de HOXD1 reduce el número y tamaño de las tumor-esferas en la línea T98G.** A. y B. Número y tamaño de esferas tumorales obtenidas de líneas estables T98G-Cre-Stuffer T98G-Cre-HOXD1, después del tratamiento con Etoh o 4OHT, respectivamente. C. Imágenes representativas de las esferas tumorales. Barra de escala: 100  $\mu$ m. Para la comparación de tres grupos se utilizó el test Kruskal–Wallis y post test de Dunn. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .



**Figura 24: La inducción de HOXD1 reduce el tamaño de las tumor-esferas en la línea U87.** A. y B. Número y Tamaño de esferas tumorales obtenidas de líneas estables U87-Cre-Stuffer o U87-Cre-HOXD1, después del tratamiento con Etoh o



4OHT, respectivamente. C. Imágenes representativas de las esferas tumorales. Barra de escala: 100  $\mu$ m. Para la comparación de tres grupos se utilizó el test Kruskal–Wallis y post test de Dunn. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

En resumen, nuestros resultados sugieren que la inducción de la expresión de *HOXD1* en las GSC derivadas de líneas de GBM, reduce el porcentaje de células troncales y su potencial proliferativo.

#### **OBJETIVO 4: DETERMINAR MEDIANTE APROXIMACIONES BIOINFORMÁTICAS POSIBLES MECANISMOS INVOLUCRADOS EN EL SILENCIAMIENTO DEL POTENCIAL GEN HOX SUPRESOR TUMORAL CANDIDATO EN PACIENTES CON GLIOBLASTOMA**

De manera complementaria a nuestro objetivo general, y los objetivos específicos 1-3, quisimos explorar posibles mecanismos involucrados en el silenciamiento de *HOXD1* en los gliomas de distintos grados. A continuación, se revisan algunas de las alteraciones más frecuentes que conllevan a un cambio en la expresión de genes en el contexto del cáncer.

#### **Los re-arreglos genómicos no son el principal mecanismo de la expresión aberrante de *HOXD1* y otros genes del grupo genómico HOXD**

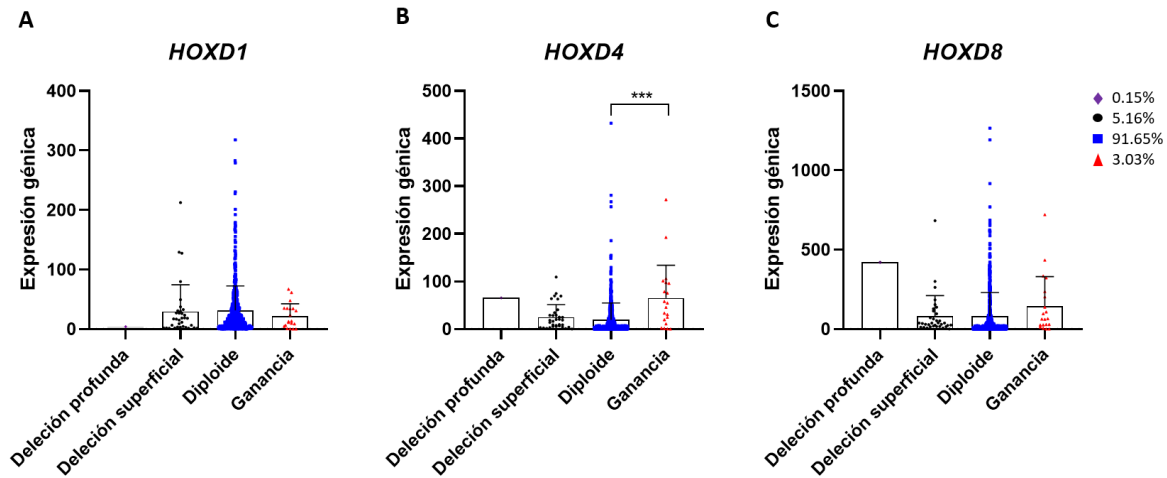
La aneuploidía se define como un número de cromosomas que se desvía de un

múltiplo del conjunto haploide y se asocia con anomalías en la función celular. La aneuploidía refleja ganancias/pérdidas de cromosomas completos, así como reordenamientos cromosómicos no balanceados, incluidas deleciones, amplificaciones o translocaciones de grandes regiones del genoma (Orr et al., 2015). Estas alteraciones cromosómicas a menudo son causadas por errores en la partición cromosómica durante la mitosis, como una señalización debilitada del punto de control mitótico, defectos en la cohesión o unión cromosómica (cromosomas rezagados) o incluso centrosomas supernumerarios en husos mitóticos bipolares (Lacroix & Maddox, 2012).

Esta inestabilidad cromosómica es un sello característico de las células cancerígenas (Gordon et al., 2012), incluyendo al GBM, el cual se ha descrito como uno de los cánceres genéticamente más inestables (Boisselier et al., 2018). El GBM se caracteriza por numerosas alteraciones del número de copias (CNA) de cromosomas (chr), entre las más frecuentes se encuentran la ganancia de chr 7, la pérdida de chr 9p y pérdida de chr 10, junto con delección homocigótica de CDKN2A (chr 9p21) y amplificación de EGFR (chr 7p11) (Louis et al., 2016).

Analizamos si la aberración en el número de copia es un mecanismo involucrado en la alteración de la expresión de *HOXD1* y de otros genes del mismo grupo genómico, *HOXD4* y *HOXD8*. Utilizamos datos disponibles en TCGA de 659 pacientes con glioma, cuyos datos de expresión y de número de copia del genoma estaban disponibles. Encontramos que la mayoría de los pacientes, 91,65 %, no presentan alteración en el número de copia de genes del grupo genómico HOXD. Del total de pacientes, un 8,34% presenta alguna alteración en el número de copia del grupo genómico HOXD. En relación con las deleciones, un 5,16% del total de

pacientes presentó una delección superficial, que hace referencia a una delección de una copia para este grupo genómico. Solo un paciente presentó una delección de ambas copias del grupo genómico HOXD. En relación con la ganancia de copia, un 3,03 % del total de pacientes con gliomas presentaron ganancia en una copia del grupo genómico HOXD. Al comparar la distribución de la expresión de *HOXD1* en pacientes diploides para este gen versus pacientes con alguna alteración en el número de copia, no se encontraron diferencias significativas (Figura 25 A). Esto sugiere que los re-arreglos genómicos no serían un potencial mecanismo asociado a la desregulación de la expresión de este gen. En cambio, otro gen del mismo grupo genómico, *HOXD4*, presenta mayores niveles de expresión en el grupo de pacientes que presentan ganancia de una copia de este gen (Figura 25 B). No se encontraron diferencias significativas en las demás comparaciones. Finalmente, *HOXD8* no presentó diferencias significativas en la distribución de la expresión entre pacientes diploides para este gen y pacientes con alteración en el número de copia (Figura 25 C). No obstante, se observó una tendencia a aumentar la expresión de *HOXD8* en pacientes con ganancia de este gen. Por lo tanto, es posible que los re-arreglos genómicos puedan contribuir al aumento de expresión de algunos genes del grupo genómico HOXD, como *HOXD4* y *HOXD8*. Sin embargo, hemos visto en los análisis previos que estos genes aumentan su expresión en pacientes con gliomas de mayor grado, grado III y GBM, pero considerando que existe un bajo porcentaje de pacientes con ganancia del grupo genómico HOXD, es posible concluir que la alteración en el número de copia no sería el principal mecanismo involucrado en la desregulación de expresión de los genes HOXD.



**Figura 25: La alteración del número de copia no es el principal mecanismo asociado a la expresión aberrante de *HOXD1* y otros genes del mismo grupo genómico.** Analizamos el estado de número de copia de *HOXD1*, *HOXD4* y *HOXD8* en 659 muestras de pacientes con gliomas de distinto grado almacenados en la base TCGA. Analizamos la relación en la alteración del número de copia y la expresión de dichos genes. A. Para *HOXD1* no se observan diferencias significativas en los niveles de expresión del gen entre pacientes diploide o con alteraciones en el número de copia de *HOXD1*. B. Pacientes con ganancia de una copia del gen de *HOXD4* presentan en promedio una mayor expresión de este gen en relación con los pacientes con un estado diploide, por lo que esta ganancia sería un potencial mecanismo asociado al aumento de expresión de este gen en pacientes con glioma. No se observaron diferencias significativas en la comparación de los demás grupos. C. El número de copia de *HOXD8* no influye significativamente en la expresión de este gen, sin embargo, observamos una tendencia en la cual el grupo de pacientes con una copia adicional del gen presenta en promedio mayor expresión de *HOXD8*.

## **La metilación no es el principal mecanismo de la expresión aberrante de *HOXD1* y otros genes del grupo genómico HOXD**

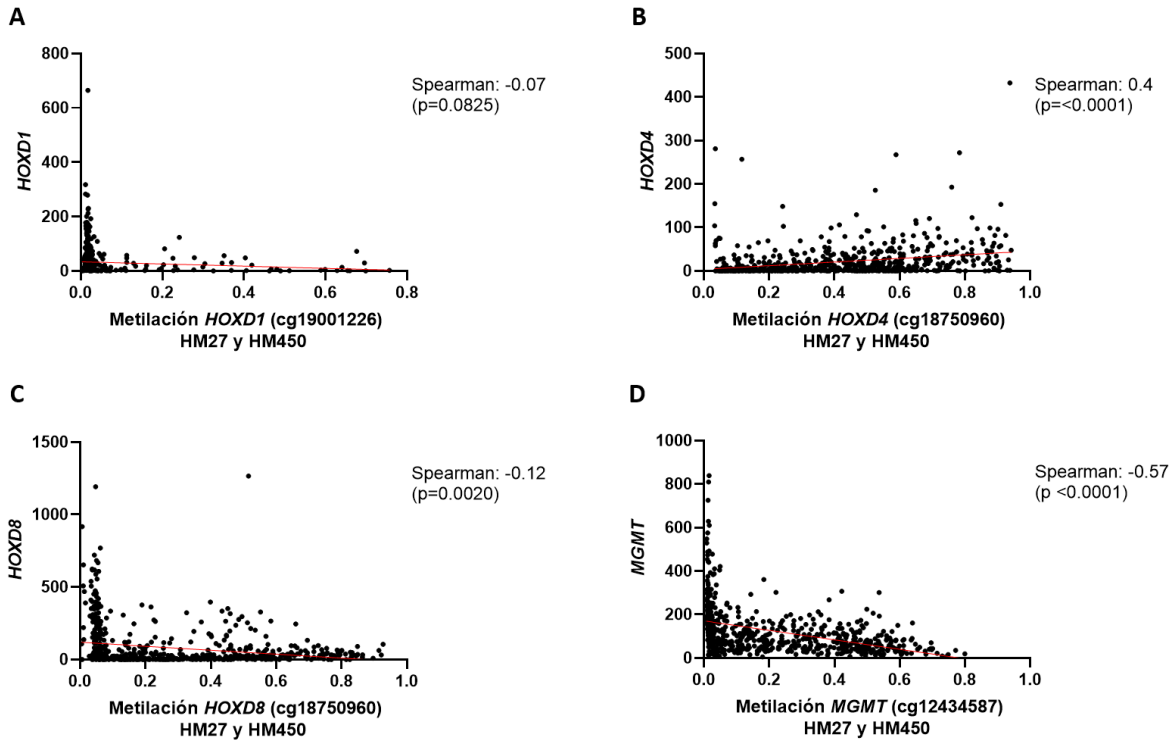
La metilación del ADN es una de las modificaciones epigenéticas más estudiadas, y es de gran interés para el estudio de distintos tipos de cáncer, entre ellos los gliomas (Capper et al., 2018; Ceccarelli et al., 2016). Diferentes estudios han revelado dos tipos de alteraciones en los patrones de metilación del ADN que pueden contribuir al desarrollo del cáncer: la hipermetilación y la hipometilación del ADN (Pfeifer, 2018; Van Tongelen et al., 2017). En este contexto, la hipermetilación involucra eventos de metilación del ADN en el sitio promotor de genes supresores de tumor, en los cuales se agrega un grupo metilo a la citosina que se mide más comúnmente en el contexto de dinucleótido CpG (Marabita et al., 2013). Por otro lado, la hipometilación involucra eventos en los que se elimina el grupo metilo en el sitio promotor de oncogenes (Ehrlich, 2002; Feinberg & Vogelstein, 1983).

En el estudio de metilación del ADN en gliomas, se ha reportado que el patrón de metilación de los genes HOX cambia en el contexto de cáncer en relación con el tejido cerebral normal (Court et al., 2019). Particularmente, se ha reportado que los cuatro grupos genómicos que contemplan los genes HOX tienden a estar hipermetilados en gliomas y que esta alteración epigenética es independiente del estado IDH, encontrándose tanto en pacientes IDHwt como en pacientes IDHmut (Kurscheid et al., 2015; Le Boiteux et al., 2021). Si bien se ha reportado que los genes HOX en su mayoría son genes con rol oncogénico, llama la atención que estos tiendan a estar hipermetilados en gliomas. Sin embargo, se ha reportado que

la hipermetilación y una elevada expresión de genes HOX pueden coexistir debido a la presencia de sitios alternativos de la transcripción que escapan de esta hipermetilación (Kurscheid et al., 2015; Le Boiteux et al., 2021). En resumen, la mayoría de los estudios de metilación del ADN en glioma se han enfocado en los genes HOX con rol oncogénico, y las publicaciones que han descrito a los pocos genes HOX con rol supresor tumoral, no se han enfocado en dilucidar si la hipermetilación es un mecanismo asociado a la disminución de la expresión de estos genes (Han et al., 2015; Hu et al., 2013; Se et al., 2017). Por lo tanto, en nuestra investigación evaluamos si la hipermetilación es un mecanismo asociado a la disminución de la expresión de *HOXD1* en pacientes con gliomas. Para esto determinamos la correlación entre la metilación y la expresión de *HOXD1*, extendiendo nuestro análisis a otros genes del mismo grupo genómico, *HOXD4* y *HOXD8*. Utilizamos datos de expresión y de metilación de 647 pacientes con gliomas de distintos grados, disponibles en las bases de datos de TCGA. Estos datos fueron generados a partir de los microarreglos “Human Methylation27” y “Human Methylation450”, para la identificación de metilación de islas CpG ubicadas dentro de las regiones promotoras proximales de sitios del inicio de la transcripción de genes. Nuestros resultados sugieren que la metilación no es el principal mecanismo asociado a la expresión aberrante de *HOXD1*, *HOXD4* y *HOXD8*. El coeficiente de Spearman muestra que no hay correlación estadísticamente significativa entre los niveles de expresión de *HOXD1* y la metilación de este gen (Figura 26 A). Esto sugiere que la disminución de la expresión de este gen en pacientes con gliomas se produce mediante otro mecanismo. Con respecto al análisis de metilación de *HOXD4*, encontramos una correlación contradictoria, que

sugiere que la metilación del gen se asocia con un aumento de su expresión (Figura 26 B). Tal como se mencionó previamente, esto se podría asociar a sitios alterativos de la transcripción (Le Boiteux et al., 2021). Por otro lado, el análisis de correlación de Spearman muestra un bajo coeficiente entre la disminución de la expresión de *HOXD8* sugiriendo que la metilación no sería el principal mecanismo asociado a su regulación en pacientes con glioma (Figura 26 C). Finalmente, para la validación de nuestros análisis quisimos evaluar el estado de metilación del gen de la enzima MGMT, ya que como se describió previamente, su estado de metilación es de relevancia clínica para los pacientes con glioma (Hegi et al., 2005). Nuestros resultados son consistentes con lo reportado en la literatura, y muestran un alto coeficiente de Spearman entre el estado de metilación del promotor de esta enzima y la disminución de la expresión su expresión (Figura 26 D).

En consecuencia, nuestros resultados sugieren que la metilación de islas CpG, ubicadas dentro de las regiones promotoras proximales de sitios del inicio de la transcripción de *HOXD1*, *HOXD4* y *HOXD8*, no es el principal mecanismo regulatorio asociado a la expresión aberrante de estos genes.



**Figura 26: La metilación no es el principal mecanismo asociado a la disminución de la expresión de *HOXD1* o a la expresión aberrante de otros genes del grupo genómico *HOXD*.** Analizamos la correlación entre la expresión de *HOXD1*, *HOXD4* y *HOXD8* y la metilación de islas CpG ubicadas dentro de las regiones promotoras proximales de sitios del inicio de la transcripción de estos genes. Para este análisis, utilizamos datos de expresión y metilación de 647 pacientes con gliomas, almacenados en la base de datos TCGA. A. El análisis de Spearman no reveló significancia de la correlación entre el estado de metilación de *HOXD1* en relación con la disminución de expresión. B. Contradictoriamente, el análisis de Spearman muestra una correlación significativa entre la metilación de *HOXD4* un aumento de la expresión de este gen. C. Por otra parte, observamos una muy baja correlación entre la metilación del gen *HOXD8* y la disminución su expresión. En conjunto estos resultados sugieren que la metilación de islas CpG



ubicadas en las regiones promotoras de *HOXD1*, *HOXD4* y *HOXD8*, no sería el principal mecanismo asociado a la expresión aberrante de estos genes en gliomas.

D. Para validar nuestros análisis, analizamos la correlación del estado de metilación de *MGMT* y su expresión. Tal como se describe en la literatura, encontramos un alto índice de correlación entre la metilación del gen y su silenciamiento. El valor p de cada análisis estadístico se indica en cada gráfico.

### **Las marcas de histonas H3k4me3 y h3k27me3 no son los principales mecanismos asociados a la expresión ABERRANTE DE HOXD1 Y OTROS genes del grupo genómico hoxd**

Como ya se mencionó previamente, la regulación de los genes HOX durante el desarrollo es establecida, en parte, mediante la metilación de los residuos de histona H3 por las proteínas del grupo Trithorax (TrxG) y Polycomb (PcG), que establecen las marcas H3K4me3 activas y H3K27me3 represivas, respectivamente. Por lo tanto, durante la determinación del destino celular, los dominios cromosómicos marcados por H3K4 activo o metilación silenciosa de H3K27 son mutuamente excluyentes y están programados para establecer el código HOX y la memoria epigenética de las células diferenciadas (Ringrose and Paro 2007, Ehrlich and Lacey 2013).

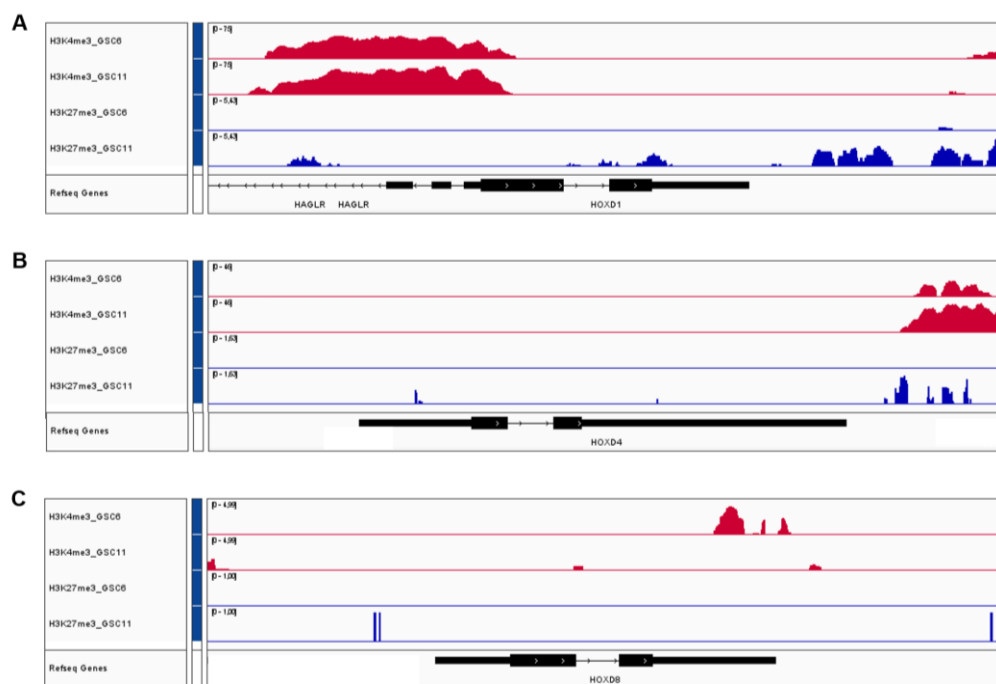
La alteración de los patrones de metilación de la histona H3 puede contribuir a la desregulación de la expresión de genes HOX en cáncer. Las modificaciones de las histonas no son constantes por lo cual una fluctuación en la actividad de las enzimas

modificadoras de histonas conduce a modificaciones específicas lo cual puede implicar el desarrollo de enfermedades, incluyendo el cáncer (Zaib, Rana et al. 2022). Se ha descrito que una alteración en los patrones de metilación de histona H3 puede generar la alteración de la expresión de los genes HOX en diferentes contextos cancerígenos (Marcinkiewicz and Gudas 2014, Luo, Wang et al. 2018, Rejlova, Musilova et al. 2018), incluyendo los gliomas (Luo, Luo et al. 2016, Court, Le Boiteux et al. 2019). Es estos últimos, las investigaciones han demostrado la alteración de diferentes vías que controlan las marcas H3K4me3 y H3K27me3, lo cual conduciría a la desregulación de genes HOX (Costa, Smith et al. 2010, Gallo, Ho et al. 2013).

En consecuencia, evaluamos las marcas H3K4me3 y H3K27me3 en el gen de HOXD1, en muestras GBM. Para este propósito utilizamos datos públicos de ChIP-Seq disponibles en bases de datos públicas. Los datos de muestras correspondientes a GBM y GSC se obtuvieron del estudio de Le Boiteux (Le Boiteux et al., 2021) y del estudio de Rheinbay (Rheinbay et al., 2013). disponibles en la base de datos GEO.

En primer lugar, analizamos los datos obtenidos del estudio de Le Boiteux, en el cual encontramos datos de dos muestras de líneas de GSC (GSC6 y GSC11) derivadas de pacientes. En esta publicación, el análisis de la expresión del grupo genómico HOXD en estas líneas celulares demostró una alta expresión de varios genes HOX, en relación con la expresión de muestras cerebrales sanas establecidas como control. Se destaca que HOXD1 presenta bajos niveles de expresión en ambas líneas celulares de GSC, en relación con el control. El análisis de ChIP-Seq para las muestras de GSC revela solo marcas de H3K4me3, y no de

H3K27me3, en la región río arriba y primer exón de *HOXD1* en ambas líneas celulares (Figura 27). En relación con el análisis de las marcas de histona asociadas a los genes *HOXD4* y *HOXD8*, no encontramos peaks de H3K4me3 ni de H3K27me3. Tampoco encontramos peaks de estas marcas de histonas en la región río arriba de la secuencia codificante de estos genes. En su conjunto, estos resultados sugieren que las marcas histona H3K4me3 y H3K27me3 no serían el principal mecanismo asociado a la expresión aberrante de *HOXD1* y de otros genes del grupo genómico *HOXD*, como *HOXD4* y *HOXD8*.



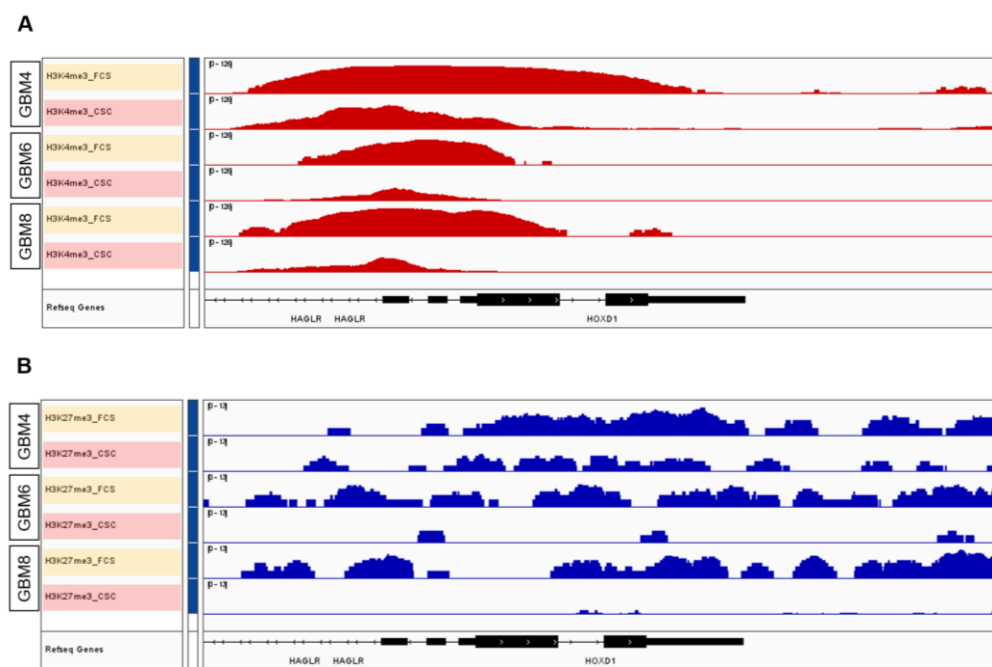
**Figura 27: Las marcas de histona H3K4me3 y H3K27me3 no son el principal mecanismo asociado a la expresión aberrante de *HOXD1* y otros genes del grupo genómico *HOXD*. A. B. C. Mediante ChIP-Seq realizamos análisis de marcas de histona H3K4me3 y H3K27me3 en los genes del grupo genómico *HOXD*,**

*HOXD1*, *HOXD4* y *HOXD8*, respectivamente. Nuestros análisis muestran que en *HOXD1* se evidencia la presencia exclusiva de H3K4me3 río arriba de la región codificante de *HOXD1*. Para *HOXD4* y *HOXD8* no se observan peaks asociados a estas marcas de histona.

Posteriormente, analizamos los datos obtenidos a partir del estudio de Rheinbay. Estos, incluyen datos de marcas de H3K4me3 y de H3K27me3 obtenidas desde muestras de líneas celulares de GBM derivadas de pacientes. Cabe mencionar que estas líneas celulares se cultivaron en dos condiciones, mediante cultivo adherente con medio suplementado con suero fetal bovino (condición de cultivo mencionada como “FCS”) y mediante cultivo de tumor-esfera para el enriquecimiento de las GSC (condición de cultivo mencionada como “CSC”). En consecuencia, a partir de estos datos quisimos evaluar si el enriquecimiento de GSC indica diferentes marcas de histona en el gen de *HOXD1*, respecto al cultivo control FCS. De manera interesante, y consistente con los resultados previos, encontramos solo marcas de H3K4me3 en la región promotora y primer exón de *HOXD1*, como así también en la región codificante de *HOXD-AS1*, ARN largo no codificante que se encuentra junto a la secuencia génica de *HOXD1* (Figura 28 A). Cabe destacar los niveles de los peaks asociados a esta marca de transcripción activa tienden a disminuir con el enriquecimiento de GSC. A este respecto, el análisis de expresión diferencial a partir de datos de ChIP-Seq no evidencian una disminución significativa en la expresión diferencial de *HOXD1* ni de *HOXD-AS1* (datos no mostrados). Cabe mencionar que, dado que el cultivo de tumor-esfera solo enriquece la población de GSC en cierta medida, es probable que la disminución de *HOXD1* y/o *HOXD-AS1* se evidencie

mediante ChIP-Seq realizado a partir de GSC seleccionadas por citometría de flujo, lo cual sería interesante de comprobar en futuras investigaciones.

En resumen, nuestros datos revelan la presencia de marcas de H3K4me3, y ausencia de H3K27me3, en *HOXD1* a partir de muestras de GBM. Esto sugiere que la disminución de la expresión de *HOXD1*, en relación con la expresión de muestras cerebrales sanas, estaría asociado a otro mecanismo.



**Figura 28: Análisis de marcas de histona H3K4me3 y H3K27me3 en *HOXD1* y *HOXD-AS1* en CSC en relación con líneas celulares de GBM cultivadas en condiciones FCS.** Analizamos las marcas H3K4me3 y H3K27me3 en líneas celulares de GBM cultivadas en dos condiciones, mediante cultivo adherente con medio suplementado con suero fetal bovino al 10% (“FCS” destacadas en amarillo), y mediante cultivo de tumor-esfera para el enriquecimiento de GSC (“CSC” destacadas en rojo). A. Se observa que las marcas de histona H3K4me3 tiende a

disminuir con la condición de cultivo de CSC, respecto a la condición de cultivo FCS.  
B. las marcas de H3K27me3 no presentan diferencias entre las dos condiciones de cultivo.

### **La desregulación de la expresión de miRNA en GBM es un potencial mecanismo asociado a la expresión aberrante de *HOXD1***

Los micro ARN (miRNA, del inglés *micro ribonucleic acid*) son pequeños ARN no codificantes que juegan un importante rol en la regulación post-transcripcional de los ARN mensajeros (ARNm). Los miRNA son pequeños ARN reguladores no codificantes de ~ 22 nucleótidos (Bartel, 2018). Estos se describieron por primera vez en *Caenorhabditis elegans* (Wightman et al., 1993), y posteriores investigaciones han demostrado su presencia en otras muchas especies, incluyendo humanos (Kozomara et al., 2019).

La biogénesis canónica de los miRNA ha sido ampliamente descrita en la literatura. Estos se generan a partir de transcripciones de miRNA primarios nacientes (pri-miRNA) a través de dos eventos de escisión. En primera instancia el pri-miRNA es procesado por DROSHA en el núcleo, resultando un precursor en forma de horquilla (pre-miRNA) (Nguyen et al., 2015). Posteriormente, exportina 5 exporta el pre-miRNA desde el núcleo al citoplasma, donde es escindido por DICER (Bohnsack et al., 2004; Wilson et al., 2015). De estas escisiones resulta un miRNA dúplex el cual

se carga en la proteína Argonauta, la cual preferentemente retiene una de las hebras de miRNA maduro, eliminando la otra (Gu et al., 2011). La proteína Argonauta cargada con el miRNA se asocia con otros cofactores y constituyen el complejo silenciador inducido por ARN (RISC, del inglés *RNA-induced silencing complex*). RISC puede provocar la degradación del ARNm así como la supresión de la traducción a través de la interacción con las secuencias complementarias en la región 3'-no traducida (UTR, del inglés *untranslated region*) del ARNm del gen diana (Bartel, 2009). Adicionalmente, hay estudios que indican que los miRNA también se pueden unir a la región 5'-UTR o bien a los marcos de lecturas abiertos (ORF, del inglés *open Reading frames*), sin embargo, esto sería un mecanismo menos frecuente en la regulación de los ARNm diana (Baek et al., 2008; Lewis et al., 2005; Lytle et al., 2007).

Los miRNA constituyen un sistema de regulación muy importante. Se ha estimado que los miRNA pueden tener como blanco más del 60% de los genes codificantes para proteínas en humanos (Norouzi et al., 2019). Se ha descrito que los miRNA regulan la expresión de genes involucrados en diferentes procesos fisiológicos y de desarrollo (Friedman et al., 2009). Adicionalmente, se ha implicado la expresión de miRNA en patologías, como el cáncer (Ali Syeda et al., 2020). A este respecto, se ha descrito que los miRNA pueden actuar como oncogenes (oncomiRs) o como supresores tumorales (oncosupresormiRs), y su desregulación se asocia con inicio tumoral, progresión y metástasis (Di Leva et al., 2014; He et al., 2020; Ventura & Jacks, 2009).

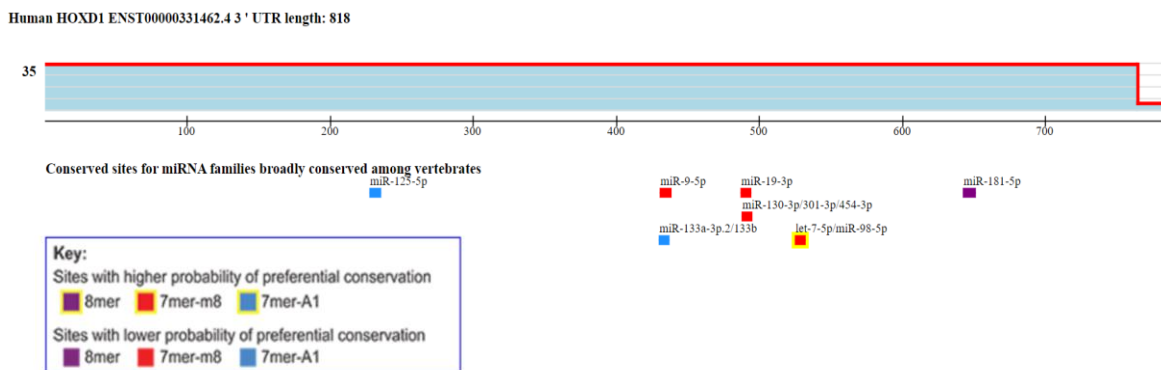
Particularmente en gliomas, incluyendo el GBM, se ha demostrado la desregulación en la expresión de muchos miRNA. Diferentes estudios muestran que la

desregulación de los miRNA pueden ser potenciales marcadores de diagnóstico en gliomas (Zhou et al., 2018). Adicionalmente, se ha demostrado que la desregulación en la expresión de miRNAs se relaciona con diferentes procesos tumorales en gliomas, tales como crecimiento tumoral (Gabriely et al., 2011), proliferación celular (Gaur et al., 2011), inhibición de la apoptosis (Papagiannakopoulos et al., 2008), migración e invasión (Liu et al., 2021; Peng et al., 2022), angiogénesis (Zhang et al., 2018), resistencia a tratamiento (L. Chen et al., 2012), adquisición de características troncales (Diana et al., 2019; Wang et al., 2014), entre otros.

Diferentes estudios señalan que los miRNA regulan la expresión de los genes HOX en diferentes contextos, tanto fisiológicos como patológicos, incluyendo el cáncer (Li et al., 2016; Lund, 2010; Tan et al., 2009; Zhao et al., 2018). Cabe mencionar que, en diferentes especies se ha demostrado que en los grupos genómicos de genes HOX se han encontrado secuencias que dan origen a ARN no codificante, incluidos los miRNA, los cuales tienen un importante rol en la regulación de la expresión de genes HOX (Chopra & Mishra, 2006; Lund, 2010). Particularmente en GBM, se ha reportado la expresión de miRNA que interfieren con la expresión de genes HOX, tales como *HOXB1* (Han et al., 2015) y *HOXD10* (Hu et al., 2013). En base a estos antecedentes, es imprescindible evaluar si la disminución de la expresión de *HOXD1* en gliomas está relacionada a la expresión de algún miRNA. En consecuencia, en las bases de datos públicas de glioblastoma, previamente mencionadas, encontramos datos de miRNA. A partir de la base CGGA encontramos datos de array para miRNA. Este contempla el análisis de 830 miRNA para 198 pacientes, de los cuales 159 presentan además datos de expresión génica. Con los datos transcriptómicos y de miRNA realizamos análisis de correlación entre



*HOXD1* y los miRNA. Seleccionamos las correlaciones negativas con un coeficiente de spearman  $<-0,2$  y un un valor  $p < 0.05$ . Entre los miRNA que presentan una correlación negativa con *HOXD1*, seleccionamos aquellos que pueden interactuar con el ARNm de *HOXD1*. Para esto consultamos la página web <http://www.targetscan.org> en la cual se realizó el análisis de predicción de interacción del RNAm de *HOXD1* y los ARNm descritos a la fecha (Figura 29). De estos análisis, encontramos 7 miRNA que cumplen con los criterios previamente mencionados (Tabla 4).

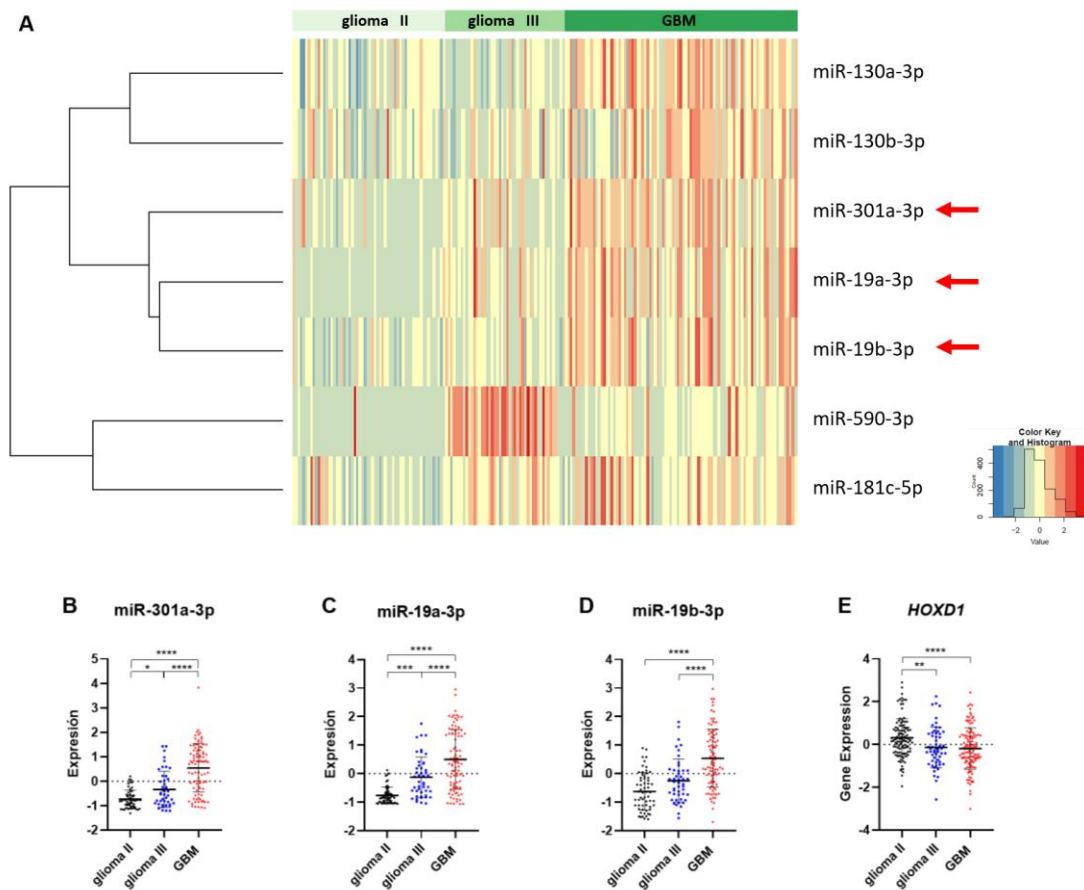


**Figura 29: miRNAs que interactúan con la región 3'UTR de *HOXD1*.** Análisis realizado desde la página web <https://www.targetscan.org/>. Se muestra la predicción de todos los miRNAs que podrían interactuar con el ARNm de *HOXD1*.

Tabla 4: miRNAs que correlacionan negativamente con *HOXD1*, en datos de GBM de la base CGGA, y tienen el potencial de unirse al ARNm de *HOXD1*. A partir de datos transcriptómicos y datos de miRNA, obtenidos de CGGA, se obtuvo la lista de miRNA que presentan una significativa correlación negativa con *HOXD1* y que pueden unirse al RNAm de *HOXD1*.

miRNA	Coefficiente Spearman	Valor-p	score
hsa-miR-301a-3p	-0,2229408	0,00473346	88
hsa-miR-19b-3p	-0,2276401	0,00390456	67
hsa-miR-19a-3p	-0,2292908	0,00364598	67
hsa-miR-181c-5p	-0,2450385	0,00185171	88
hsa-miR-130b-3p	-0,2516741	0,0013737	88
hsa-miR-590-3p	-0,2949622	0,00016045	62
hsa-miR-130a-3p	-0,307968	7,84E-05	88

Posteriormente, analizamos la expresión de los 7 miRNA en relación con el grado tumoral de los gliomas (Figura 30 A). Encontramos que la mayoría de estos presenta una mayor expresión en GBM en relación con los gliomas de menor grado, a excepción de miR-590-3p que presenta una mayor expresión en gliomas de grado III. De los 7 miRNAs, centramos nuestra atención en miR-301a-3p, miR-19a-3p y miR-19b-3p. Estos miRNAs presentan un marcado aumento de expresión en GBM en relación con los gliomas de menor grado tumoral (Figura 30 B, C y D).



**Figura 30: Los miRNA pueden estar involucrados en la expresión aberrante de *HOXD1* en GBM.** Se analizaron datos de micro-arreglos para datos transcriptómicos y de miRNA de gliomas de distintos grados tumorales, obtenidos de la base CGGA. Se realizó análisis de correlación para seleccionar miRNA que correlacionen negativamente con *HOXD1*. Además, se seleccionaron genes que, mediante análisis de predicción realizado en <http://www.targets.org>, tengan el potencial de interactuar con el ARNm de *HOXD1*. A. Construimos un mapa de calor que representa la expresión de estos miRNAs en las muestras de gliomas de diferentes grados. Seleccionamos 3 miRNA cuya expresión aumenta con el grado tumoral. B. C. D. Gráficos representativos de la expresión de miR-301a-3p, miR-19a-3p y miR-

19b-3p en muestras de gliomas de diferentes grados tumorales. Se observa que la expresión de estos microRNA es mayor en GBM en comparación con gliomas de menor grado tumoral. E. Análisis de la expresión de *HOXD1* que evidencia que, al igual que los análisis previos realizados con otro set de datos transcriptómicos de la base CGGA, su expresión es menor en muestras de GBM en comparación con gliomas de menor grado tumoral. Los datos graficados corresponden al z-score obtenido de los valores relativos de los datos de micro-arreglos de datos transcriptómicos o de miRNA. Para estos análisis aplicó la prueba estadística ANOVA con post test de Tukey. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Repetimos el análisis con datos de miRNA obtenidos de TCGA. Esta base presenta datos de expresión de miRNA de 5 pacientes con GBM. Lamentablemente, debido al bajo número de pacientes con datos de miRNA no se pudo obtener resultados de significancia estadística confiable.

Estos resultados sugieren que la disminución de la expresión de *HOXD1* en GBM puede ser mediada, al menos en parte, por miRNAs.

## **Resultados preliminares respecto al modelo *Danio rerio* para la validación *in vivo* de las aproximaciones bioinformáticas e *in vitro***

Como proyección de nuestro trabajo, proponemos utilizar el modelo de pez cebra (*Danio rerio*) para las aproximaciones *in vivo*, las que serán clave para la validación de nuestras aproximaciones bioinformáticas e *in vitro*. Las experimentaciones *in vivo* serán imperativas para comprender el comportamiento asociado a las GSC en el contexto del nicho tumoral y como estas son responsables de procesos como metástasis, resistencia a tratamiento y recurrencia tumoral. Uno de los modelos *in vivo* ampliamente utilizado para investigar la invasión o metástasis de células cancerosas o CSC es el xenoinjerto en ratones inmunodeficientes. Sin embargo, este modelo a menudo se considera lento y laborioso. El pez cebra y sus embriones transparentes emergen como un sistema prometedor de modelo de xenotransplantes y la detección de drogas terapéuticas tumorales (Bailey et al., 2009; Peterson & Freeman, 2009), ya que proporciona características únicas para investigar el desarrollo de tumores, angiogénesis, invasión y metástasis. El modelo ha mostrado ventajas en su simplicidad para la manipulación genética, bajo costo de mantenimiento, fácil visualización de estructuras internas y rápido desarrollo embrionario. Como animal vertebrado, el modelo de pez cebra ofrece un nivel adecuado de similitudes fisiológicas y genéticas con los mamíferos (Fishman, 2001; Jesuthasan, 2002). Varios informes han demostrado que las células tumorales humanas proliferan e interactúan con los tejidos de los vasos en los embriones de pez cebra (Geiger et al., 2008; Haldi et al., 2006; Stoletov et al., 2007). Este modelo, además permite generar tumores a partir de diversas formas que incluyen

tratamientos carcinogénicos, induciendo mutaciones génicas y activando vías de señalización a través del uso de agentes químicos, por regulación transgénica o por medio de la sobreexpresión de oncogenes (Zhao et al., 2015).

En comparación con los modelos de ratón, el modelo de xenoinjerto de embrión de pez cebra tiene ventajas para estudiar la invasión de GSC (X. J. Yang et al., 2013). Es fácil monitorear continuamente el proceso de invasión/diseminación de células tumorales en un órgano transparente y ofrece una mejor examinación de la interacción entre los vasos del huésped y las células tumorales. El período de observación en embriones de pez cebra es mucho más corto que en ratones, es posible observar todo el proceso de invasión en pocos días con suficiente claridad. Además, se requieren menos células tumorales en este modelo para las observaciones, particularmente valiosas para los estudios de GSC, que son difíciles de obtener en grandes cantidades (X. J. Yang et al., 2013).

Por lo tanto, los embriones de pez cebra ofrecen un excelente modelo para investigar el mecanismo de la invasión y diseminación de células de glioma y GSC *in vivo* (Welker et al., 2017; X. J. Yang et al., 2013). Nuestro grupo de laboratorio ya ha realizado xenotrasplantes de células de las líneas U87 y U251 en larvas de pez cebra. Los xenotrasplantes se han realizado en vitelo y cerebro de larvas de 48 y 36 hpf, respectivamente.

Con respecto a las inyecciones en el vitelo, se han realizado xenotrasplantes con células de las líneas U87 y U251 de cultivo adherente, en larvas de pez cebra Tab5 (wild type) de 2 dpf. Se utilizó como control larvas inyectadas solamente con medio de cultivo DMEM (Figura S 5 I). Previo a la inyección, las células se tiñeron con Mitotracker CMXRos, siguiendo la metodología del fabricante. Se confirmó que

ambas líneas celulares son capaces de sobrevivir y formar tumor en el pez cebra (Figura S 5 A-C y E-G), y además a los 3 días post inyección (dpi) se observa que estas realizan metástasis observándose migración a través del cuerpo y la formación de microtumores secundarios (Figura S 5 D y H). Adicionalmente, se han realizado xenotransplantes con células de las líneas de glioblastoma U87 y U251, en larvas Tg (fli1: GFP) de 2 dpf. Previo a la inyección, las células se tiñeron con Mitotracker CMXRos, siguiendo la metodología del fabricante. A los 2 días post inyección (4dpf) se visualizaron las células en los vasos sanguíneos migrando hacia la cola del pez (Figura S 6).

Con respecto a las inyecciones en cerebro, se han realizado xenotransplantes con células de la línea U87, obtenidos a partir de cultivo adherente, en larvas de pez cebra Tab5 (wild type) de 36 horas post fecundación (hpf) (Figura S 7). Se ha logrado establecer el sitio de inyección para obtener reproducibilidad en el lugar donde se establece el xenotransplante. Además, se han probado dos compuestos para marcar las células tumorales. Utilizamos el compuesto Mitotracker CMXRos (Figura S 7 C y D), el cual se utilizó en las inyecciones previamente mencionadas. Adicionalmente, utilizamos el compuesto Vybrant Dil, que es una tinción de membrana celular lipofílica (Figura S 7 A y B). Se observan diferencias importantes en la fluorescencia de ambos marcadores, destacando que Vybrant Dil presenta menos ruido de fondo y permite la visualización más precisa de las células tumorales en el cerebro del pez cebra.

En conjunto estos resultados preliminares demuestran que el pez cebra es un ventajoso modelo que puede ser utilizado para la validación *in vivo* de nuestras aproximaciones bioinformáticas e *in vitro*.

## DISCUSIÓN

### **Papel de los genes HOX en gliomas y desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas**

Durante el desarrollo embrionario, así como en tejidos adultos, el crecimiento, la diferenciación y la organización de las poblaciones celulares están estrechamente coordinadas y controladas (Bhatlekar et al., 2018; Gonçalves et al., 2020). Se ha descrito que la alteración de los mecanismos asociados a estos procesos puede contribuir al desarrollo de algunas patologías (Grier et al., 2005) incluyendo al cáncer (Vinnitsky, 2014). Como ya se mencionó previamente, los genes HOX codifican para factores de transcripción considerados maestros reguladores de la diferenciación ya que están implicados en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular, estableciendo y manteniendo así la identidad y el destino celular durante el desarrollo (Mark et al., 1997). Se ha descrito que la expresión errónea de estos genes puede conducir a una diferenciación y proliferación anormales, lo que lleva a un cambio en la identidad celular o a la transformación homeótica, por lo que desempeñan un papel importante en la carcinogénesis (Samuel & Naora, 2005). En consecuencia, se ha propuesto que los genes HOX pueden ser moduladores del cáncer, ya que pueden actuar como oncogenes o como genes supresores tumorales dependiendo del contexto (Bhatlekar et al., 2014; Mark et al., 1997; Samuel & Naora, 2005). En gliomas, se ha descrito que la mayoría de



los genes HOX presentan un rol oncogénico. Así, el aumento de la expresión de genes pertenecientes a los distintos grupos genómicos que comprenden los genes HOX, tales como HOXA13 (Duan et al., 2015), HOXB8 (Ma et al., 2019), HOXC10 (Li et al., 2018), y HOXD9 (Tabuse et al., 2011), contribuye a la progresión de los gliomas. Hasta el momento, se han descrito solo 3 genes con un potencial rol supresor tumoral en gliomas, los cuales son HOXB1 (Han et al., 2015), HOXA11 (Se et al., 2017) y HOXD10 (Hu et al., 2013). Sin embargo, el rol de estos dos últimos es aún controversial (Duan et al., 2015; Li et al., 2021).

Diversas investigaciones sugieren que la transformación maligna que surge de las mutaciones genéticas, en combinación con la desregulación epigenética, puede reprogramar las células somáticas en células que simulan las características de células de la línea germinal, siendo este uno de los posibles orígenes de las CSC. En este sentido, toma relevancia el rol de los genes HOX, ya que se ha postulado que una expresión equilibrada de estos genes es fundamental para la función de las células madre, especialmente para la autorrenovación, la diferenciación y la quiescencia (Abate-Shen, 2002; Bhatlekar et al., 2014, 2018; Shah & Sukumar, 2010). Se ha descrito en diferentes tipos de cáncer que algunos genes HOX con rol oncogénico pueden contribuir a la mantención de la troncalidad de las CSC. Así, por ejemplo, en GBM la expresión de HOXA9, HOXA10 y HOXB9 mantienen la troncalidad de GSC (Fang et al., 2014; Gallo et al., 2013; Murat et al., 2008). También, se ha descrito una mayor expresión de HOXC9 y HOXD9 en GSC obtenidas de muestras de pacientes con glioblastoma (Okamoto et al., 2007; Tabuse et al., 2011), sin embargo, aún se desconoce su rol en este tipo celular. Por lo cual son necesarias más investigaciones para determinar si la expresión de estos

genes conduce a la adquisición de características troncales.

Por otro lado, investigaciones han demostrado que algunos genes HOX con rol supresor tumoral pueden inducir diferenciación de las CSC, por lo cual podrían ser blancos estratégicos para la inducción de la diferenciación de estas células. Si bien en otros tipos de cáncer se ha evaluado esta estrategia (Ordóñez-Morán et al., 2015; Petrini et al., 2013; Shah et al., 2017; Teo et al., 2016), en la actualidad aún no hay estudios en gliomas, incluyendo el GBM, que aborden esta posibilidad. Por consiguiente, es preciso dilucidar si existen más genes con rol supresor tumoral en gliomas, y como estos se asocian al fenotipo de las GSC.

### ***HOXD1* es un potencial gen supresor tumoral en gliomas y otros cánceres cerebrales**

En la búsqueda de un nuevo gen supresor tumoral con potencial rol diferenciador, analizamos la expresión de los cuatro genes parálogos en muestras de pacientes con gliomas de diferentes bases de datos. De manera interesante, nuestros resultados sugieren a *HOXD1* como un gen con rol supresor tumoral en gliomas. Demostramos, mediante aproximaciones bioinformáticas, que la expresión de este factor de transcripción disminuye en GBM en comparación con tejido cerebral sano o con gliomas de bajo grado tumoral. A este respecto, nuestros análisis de la expresión de *HOXD1* en líneas de GBM y muestras tumorales fue poco concluyente. Consideramos que estos análisis pueden mejorar sustancialmente. Hubiese sido muy interesante contar con un control adicional, además del control de la línea de astrocitos fetal, particularmente con una línea de oligodendrocitos humanos.

Adicionalmente, para el análisis de muestras tumorales es importante mencionar que los niveles de expresión de genes dependerán de la composición celular de estas, de los subtipos moleculares de las células tumorales de GBM y de la variabilidad genética de cada individuo. Además, hubiese sido más oportuno contar con muestras de cerebro normal como control para la comparación de la expresión de *HOXD1* con las muestras de GBM derivadas de pacientes. Sin embargo, es complicado obtener muestras de cerebro normal de humanos a menos de que se obtengan de dadores post-mortem. Por lo tanto, para comprobar experimentalmente nuestros análisis bioinformáticos, que señalan que *HOXD1* presenta menor niveles de expresión en muestras tumorales en relación con muestras de cerebro normal, se necesitan controles más adecuados y mayor número de muestras tumorales.

Si bien hasta la fecha el rol que este gen en gliomas no se ha descrito, algunas investigaciones enfocadas en estudios más globales han mencionado algunas observaciones en relación con la expresión de *HOXD1* en gliomas. Por ejemplo, Buccoliero y colaboradores estudiaron la expresión del grupo genómico *HOXD* en gliomas pediátricos mediante RTqPCR, y describieron que si bien *HOXD1* se expresa en muestra de cerebro normal, su expresión aumenta en gliomas de grado I (Anna Maria Buccoliero et al., 2009). En contraste, Chakravadhanula y colaboradores analizaron el transcriptoma de seis GBM pediátricos usando la plataforma nanoString, y reportaron que *HOXD1* presentaba menor expresión en estas muestras tumorales en relación con su contraparte no tumoral (Chakravadhanula et al., 2014). De manera interesante, en esta misma publicación analizan la expresión de genes *HOX* en diez muestras de meduloblastoma, las

cuales también presentaban menor expresión de *HOXD1* en comparación con las muestras de tejido normal. Cabe destacar que, el meduloblastoma es un cáncer cerebelar cuyo origen se atribuye a anomalías genéticas en las vías de señalización requeridas para la maduración normal de la corteza cerebelar, en particular de vías involucradas en la neurogénesis de los precursores granulares neurales del cerebelo (Roussel & Hatten, 2011; Teglund & Toftgård, 2010). Otra investigación, que menciona a *HOXD1* en gliomas, es el estudio de Le Boiteux y colaboradores. Ellos realizan un análisis global de la expresión de genes *HOX*, entre otros análisis, e indicaron que la mayoría de los genes *HOX* estaban regulados al alza en gliomas a excepción de *HOXD1*, el cual además se expresa en cerebro sano (Le Boiteux et al., 2021). Por lo tanto, nuestros resultados son consistentes con otras publicaciones que señalan que la expresión de *HOXD1* es menor en GBM en comparación con LGG o tejido normal.

En consecuencia, nuestros resultados son consistentes con la literatura y sugieren que *HOXD1* es un potencial gen supresor tumoral en gliomas y probablemente también en otros cánceres cerebrales.

### ***HOXD1* presenta mayores niveles de expresión en pacientes con gliomas de mejor pronóstico**

En este estudio analizamos la relevancia clínica de la expresión de *HOXD1* en el pronóstico de pacientes con gliomas. Nuestros resultados indican que los pacientes con alta expresión de *HOXD1* presentan una supervivencia prolongada en comparación con los pacientes que presentan una baja expresión de este gen. También

evaluamos la expresión de *HOXD1* en relación con marcadores clásicos en el estudio de gliomas como lo son el estado de IDH, el subtipo molecular, el estado de metilación del gen MGMT, entre otros. Estos son de gran utilidad clínica ya que son predictivos del pronóstico de supervivencia y de la respuesta a tratamiento (Eckel-Passow et al., 2015; Wick et al., 2013; Yao et al., 2020).

Nuestros resultados indican que *HOXD1* presenta mayores niveles de expresión en muestras de pacientes que presentan marcadores de mejor pronóstico.

### **La expresión de *HOXD1* se asocia a un fenotipo diferenciado en el contexto cerebral**

En nuestro análisis precisamos si este potencial gen supresor tumoral se asocia a un fenotipo más diferenciado, para lo cual realizamos diferentes aproximaciones bioinformáticas e *in vitro*.

Utilizando datos de expresión de pacientes con GBM, de la base de datos TCGA, seleccionamos los genes que correlacionan positivamente con *HOXD1*. El enriquecimiento de procesos biológicos mediante el uso de la base Gene Ontology, reveló que los genes que correlacionan positivamente con *HOXD1* se asocian con diferenciación de sistema nervioso, diferenciación neural y diferenciación glial, entre otros. Cabe mencionar que, en estos datos una de las proteínas que presento mayor correlación con *HOXD1* es *MOG* (coeficiente de Spearman= 0.8,  $p= 1.49e-30$ ). Previamente se describió a esta glicoproteína de la mielina de oligodendrocitos es un blanco transcripcional de *Hoxd1* en ratón. Consistentemente, nuestros análisis de la expresión y correlación de *HOXD1* y *MOG* en muestras de cerebro humano

de distintos tiempos de desarrollo, obtenidos de la base de datos ALLEN BRAIN MAP, sugieren también que la regulación transcripcional de MOG por parte de HOXD1 es conservada en humanos. Más allá del potencial rol de Hoxd1 en la diferenciación y/o maduración de oligodendrocitos, es probable que este gen también tenga un rol en la diferenciación y/ o maduración de otras células gliales. En su publicación Booth y col. mencionan que, mediante el análisis inmunocitoquímico de cultivo primario de células gliales mixtas de ratón recién nacido, la expresión de Hoxd1 no estaba limitada al linaje oligodendroglial, ya que células gliales negativas para marcadores de oligodendrocito también expresaban Hoxd1 (Booth et al., 2007). Por lo tanto, son necesarias más investigaciones para dilucidar el rol de HOXD1 en otros tipos celulares como astrocitos.

Evaluamos que procesos biológicos se asocian de manera negativa a la expresión de *HOXD1*. Seleccionamos genes que correlacionan negativamente con *HOXD1* en muestras de pacientes con GBM almacenados en la base de datos TCGA. De manera interesante, el enriquecimiento de procesos biológicos de este análisis reveló que los genes que correlacionan negativamente con HOXD1 se relacionan con proliferación de progenitores neurales y mantención de la troncalidad.

Otra aproximación, que realizamos para determinar si HOXD1 se asocia a un fenotipo diferenciado, consistió en analizar la expresión de *HOXD1* en datos de expresión de muestras tumorales de GBM clasificadas con alta o baja expresión de marcadores troncales, pertenecientes a la base de datos IVYGAP. De manera consistente, *HOXD1*, al igual que *MOG*, presento mayor expresión en las muestras con baja expresión de marcadores troncales.

En base a los resultados de enriquecimiento en Gene Ontology que señalan que

*HOXD1* se asocia a diferenciación neural, decidimos realizar un análisis exploratorio en el cual evaluamos la expresión de *HOXD1* en un modelo *in vitro* de la diferenciación de NSC a neuronas de la corteza cerebral. Cabe mencionar que los NSC utilizados se obtuvieron a partir de hiPS de dadores sanos. El análisis de expresión mediante RTqPCR demostró que *HOXD1* presenta baja expresión en NSC, en cambio en neuronas presenta mayor expresión y aumenta concomitante con el grado de diferenciación. Este resultado sugiere que *HOXD1* podría tener un rol en la maduración del fenotipo neuronal. Cabe precisar si el potencial rol diferenciador de *HOXD1* en el linaje neural es conservado más allá del contexto cerebral. A este respecto, destaca la publicación de Manohar y colaboradores los cuales demostraron que en células de neuroblastoma humanas la inducción de la diferenciación con AR induce la expresión de *HOXC6*, *HOXD8* y *HOXD1* (Manohar et al., 1996). El neuroblastoma es un cáncer pediátrico asociado a la diferenciación detenida o incompleta de neuroblastos (Tomolonis et al., 2018), los cuales corresponden a células inmaduras del linaje neural del sistema nervioso periférico (Ponzoni et al., 2022).

Finalmente, respecto a los análisis en las líneas celulares de GBM, no encontramos diferencias significativas en la expresión de *HOXD1* en las tumor-esferas en comparación con el cultivo adherente. Con el aumento del porcentaje de GSC en el cultivo de tumor-esferas esperábamos encontrar una disminución en la expresión de *HOXD1* en relación con el cultivo adherente. Es probable que, aunque aumente el porcentaje de GSC, este no sea suficiente para detectar una disminución en la expresión de *HOXD1*, quedando bajo los límites de detección de la técnica de RTqPCR. Además, estas líneas celulares constituyen un modelo simplificado del

glioblastoma, y tienen sus particularidades como por ejemplo la adquisición de nuevas mutaciones, por lo cual no necesariamente representarán los resultados bioinformáticos previos. Por último, cabe destacar que la expresión de *HOXD1* en las líneas de GBM ya es baja, por lo cual es probable que no se registren niveles significativamente más bajos de *HOXD1* en las GSC.

El principal foco de estudio de los genes HOX ha sido establecer sus diferentes roles en un contexto de desarrollo, particularmente en comprender el rol de estos genes en la segmentación del eje anteroposterior, en donde pueden establecer segmentos únicos y diferentes durante el desarrollo. Sin embargo, existe una creciente evidencia que muestra la expresión de los genes HOX en estadios post-natales. Se ha demostrado que la expresión de genes HOX en organismos adultos es clave para la determinación de la identidad en diferentes tipos celulares. Particularmente en el SNC, clásicamente se ha estudiado el rol de los genes HOX en el contexto de desarrollo, donde además se ha planteado que la expresión de estos es acotada al cerebro posterior y medula espinal. No obstante, evidencia controversial ha surgido durante los últimos años que demuestran que los genes HOX pueden expresarse en cerebro y en diferentes etapas del desarrollo (Louise V. Wolf et al., 2001), pero también en un contexto post-natal/adulto (Gonçalves et al., 2020; Hutlet et al., 2016; Lizen et al., 2017; Takahashi et al., 2004). Si bien no se ha descrito el rol de estos genes HOX en los diferentes tipos celulares que residen en el cerebro, basados en la literatura se puede presumir que tendrían un rol asociado a la determinación del destino e identidad celular.

Bajo esta perspectiva, nuestros resultados sugieren que *HOXD1* podría ser un gen



HOX relevante para la diferenciación y/o maduración de las NSC hacia un linaje neural y/o glial, como también un rol en la mantención de la identidad de estos tipos celulares. Así, en cáncer la disminución de la expresión de *HOXD1* podría contribuir a una mayor plasticidad fenotípica que posibilitaría la adquisición de una mayor plasticidad fenotípica, es decir, la adquisición de características troncales.

### **La activación de la expresión de *HOXD1* en las GSC derivadas de líneas celulares de GBM, reduce sus características troncales**

Para validar nuestros resultados bioinformáticos, que sugieren que *HOXD1* es un gen con el potencial de inducir la diferenciación de las GSC, diseñamos un sistema basado en la tecnología Cre/loxP para la inducción de la expresión de *HOXD1* en las GSC derivadas de las líneas de GBM. Así, mediante transducciones retrovirales y lentivirales, generamos líneas estables a partir de U87 y T98G para inducir la expresión de *HOXD1* mediante el tratamiento con 4OHT. Establecimos como control el mismo sistema diseñado para la inducción de expresión de *HOXD1*, pero en lugar de tener la secuencia de este factor de transcripción, presenta la secuencia de un péptido sin actividad biológica, que denominamos Stuffer. Analizamos la morfología y la proliferación de las líneas derivadas de U87 y T98G, de las cuales no se encontraron diferencias observables o significativas en relación con las células sin transducir. Si bien esta caracterización nos sugiere que no hay alteraciones metabólicas producto de las transducciones virales, falta una mayor caracterización de las líneas celulares. Por consiguiente, será necesario un análisis más detallado,

por ejemplo, realizando secuenciación genética para evidenciar que la inserción de las secuencias foráneas de los vectores virales no haya interrumpido la expresión de algún gen relevante para el metabolismo celular.

Mediante el ensayo de tumor-esferas determinamos el efecto de la inducción de *HOXD1* en las características troncales de células de las líneas de GBM. Como se mencionó previamente, el ensayo de tumor-esferas permite el enriquecimiento in vitro de las GSC. Caracterizamos este tipo de cultivo en las tres líneas celulares de GBM U87, U251 y T98G, comprobando un aumento de la expresión de marcadores troncales en las tumor-esferas generadas, lo cual es consistente con la literatura reportada. A partir de este tipo de cultivo celular se obtienen tumor-esferas de las cuales se puede evaluar el número y tamaño que a su vez están asociados al porcentaje de GSC en el cultivo y al potencial proliferativo de estas (Johnson et al., 2013), respectivamente. Comparamos el número y tamaño de tumor-esferas obtenidos de las líneas derivadas de T98G, correspondientes a T98G-Cre-HOXD1 y T98G-Cre-Stuffer. Encontramos que, en relación con la condición control, el tratamiento con 4OHT disminuye el número y tamaño de las tumor-esferas solo en la línea T98G-Cre-HOXD1. Estos resultados sugieren que la expresión de *HOXD1* disminuye el porcentaje de GSC y su potencial proliferativo en la línea T98G. Los análisis realizados en las líneas celulares derivadas de U87, muestran que solo en la línea U87-Cre-HOXD1 el tratamiento con 4OHT disminuye el tamaño de las esferas generadas, en relación con la condición control. Para las líneas derivadas de U87 no se observaron diferencias significativas en el número de esferas generadas con el tratamiento de 4OHT y la condición control. Estos resultados

sugieren que la inducción de la expresión de HOXD1 reduce el potencial proliferativo de las GSC en la línea U87.

Si bien estos resultados son consistentes con nuestra hipótesis se deben mencionar algunas observaciones. Por ejemplo, en las líneas derivadas de T98G y de U87, las esferas obtenidas de GBM-Cre-HOXD1 presentaron per-sé un menor tamaño que las esferas obtenidas de GBM-Cre-Stuffer. Este hecho puede ser explicado por una internalización nuclear espontánea de Cre-ERT2 en algunas células, en ausencia de 4OHT, que permita la expresión de *HOXD1* y por consiguiente reduciendo el potencial proliferativo de las GSC. Otra posible explicación es que las líneas GBM-Cre-HOXD1 sea más sensible al tratamiento de 4OHT en comparación con GBM-Cre-Stuffer, lo cual será necesario dilucidar.

Al igual que los análisis bioinformáticos, nuestras aproximaciones *in vitro* sugieren que *HOXD1* es un gen supresor tumoral con el potencial de inducir diferenciación en las GSC. Sin embargo, creemos que faltan algunas aproximaciones para la validación de los resultados *in vitro*. En primer lugar, se debe realizar una caracterización molecular del sistema de expresión Cre/loxP. Para esto se deberá confirmar la integración de los vectores retrovirales y lentivirales en el genoma, como por ejemplo mediante el análisis de PCR de alguna secuencia perteneciente a los vectores virales. Adicionalmente, se deberá confirmar la expresión de la recombinasa modificada Cre-ERT2. Para esto se podría realizar un análisis de inmunofluorescencia para esta proteína, y analizar si el tratamiento con 4OHT induce su internalización nuclear. Otro análisis relevante, es confirmar la recombinación de las secuencias loxP, para lo cual se puede realizar PCR a partir de ADN genómico utilizando partidores que amplifiquen la región que contenga

ambas secuencias loxP. Así, mediante la recombinación inducida por 4OHT se podría evidenciar una disminución del tamaño del producto de PCR con relación a la condición control. De igual manera se podría establecer el tiempo mínimo de tratamiento con 300 nM de 4OHT para asegurar la recombinación en la mayoría de las células en cultivo. Aunque en este último punto creemos que las 48 horas de tratamiento son más que suficientes en relación con lo que se reporta en la literatura (Chen et al., 2010; Lewis et al., 2015; Nogueira et al., 2008; W. Yang et al., 2013; Yaz et al., 2004).

Otro control muy importante para la validación de los resultados in vitro consiste en confirmar la expresión de HOXD1 y Stuffer luego de la recombinación inducida por 4OHT. Para este propósito se podría realizar el cultivo de tumor-esfera en las líneas derivadas de T98G y U87, para realizar análisis de RTqPCR y Western blot comparando los niveles de expresión de HOXD1 y Stuffer en la condición control versus el tratamiento de 4OHT. Cabe mencionar que, en el diseño del sistema Cre/loxP para la expresión inducible de HOXD1 y Stuffer en las GSC, se agregó la secuencia génica de mCherry unida a las secuencias de HOXD1 y Stuffer (Figura 14). El objetivo de esta estrategia consistió en utilizar a esta proteína fluorescente como un reportero de la expresión de HOXD1 y Stuffer. Lamentablemente, no fue posible evidenciar cambios significativos en la fluorescencia de esta proteína luego del tratamiento con 4OHT (imagen no adjunta). Varios factores influyeron en la visualización de la fluorescencia de mCherry. Al igual que HOXD1 y Stuffer, la expresión de mCherry está regulada por el promotor de SOX2. Si bien el cultivo de tumor-esfera enriquece la subpoblación de GSC aun estas están presentes en una baja proporción. Por lo tanto, un bajo número de células debería expresar HOXD1-

mCherry y Stuffer-mCherry, lo cual puede dificultar la visualización de la auto-fluorescencia. Adicionalmente, el medio de cultivo usado en el ensayo de tumor-esferas contiene el indicador de pH rojo fenol, el cual presenta auto-fluorescencia que puede interferir con la visualización de mCherry. Otro factor para considerar en la visualización de mCherry corresponde a la autofluorescencia que emiten las células muertas. Durante el transcurso de los cultivos se pudo evidenciar células rojas flotantes presentes incluso a en los controles de células T98G y U87 sin transducir. Finalmente, hay que considerar se debe establecer la temporalidad en la cual es posible evidenciar la expresión de HOXD1-mCherry y Stuffer-mCherry luego del tratamiento con 4OHT.

Como proyecciones asociadas a nuestras aproximaciones *in vitro*, proponemos validar nuestro sistema Cre/loxP, para la activación de la expresión de *HOXD1* bajo el promotor de SOX2, en otro modelo celular. Así, por ejemplo, mediante las transducciones virales detalladas en este trabajo se podrían generar líneas estables a partir de las NSC derivadas de hiPSC. Además de la caracterización molecular correspondiente para la validación del sistema, se podrían realizar algunas aproximaciones muy interesantes. A este respecto se podría dilucidar si HOXD1 tiene un rol en la diferenciación en un contexto fisiológico. Por lo tanto, se podría inducir la expresión de *HOXD1* para evaluar si disminuye la expresión de los marcadores de troncalidad y un aumento de marcadores de diferenciación neural o glial. También se podría evaluar si la inducción de *HOXD1* reduce los tiempos de diferenciación hacia un linaje neural o glial.

Otra proyección de nuestro trabajo consistirá en evaluar los efectos de la pérdida de función de HOXD1 en las líneas celulares de GBM. Hipotetizamos que la

disminución o eliminación de la expresión de *HOXD1* en las líneas de GBM induciría un aumento de la agresividad tumoral debido al aumento del porcentaje de GSC en los cultivos celulares.

### ***HOXD1* actúa como un oncogén o gen supresor tumoral en otros contextos tumorales**

En la literatura hay pocas investigaciones que han descrito el rol de *HOXD1* en distintos tipos de cáncer. Al igual que otros genes *HOX*, se ha descrito que *HOXD1* puede actuar como un oncogén o como un supresor tumoral. Se ha demostrado que la expresión de *HOXD1* es mayor en cáncer de ovario en comparación con su contraparte normal. Así se ha sugerido que su activación puede estar asociada con el desarrollo de cáncer de ovario (Guo et al., 2017; Kelly et al., 2016). Por otro lado, en la literatura se ha descrito que *HOXD1* actúa como un gen supresor tumoral en cáncer de mama (Li et al., 2016) y en carcinoma de riñón (Cui et al., 2021), destacando que en ambos tipos de cáncer la expresión de *HOXD1* disminuye en relación con el tejido normal. Estos diferentes roles en cáncer pueden depender de la activación o represión de diferentes blancos transcripcionales de *HOXD1*, los cuales, sin embargo, no se han descrito. Esta es una interesante proyección que permitirá dilucidar los posibles mecanismos a través de los cuales *HOXD1* puede cumplir un rol oncogénico o un supresor tumoral según sea el contexto. Además, un mayor entendimiento de los blancos transcripcionales de *HOXD1* en el contexto cerebral no solamente permitirá comprender y desarrollar nuevas estrategias para el cáncer, sino que también para otras patologías cerebrales.

## **Los miRNAs podrían estar asociados a la disminución de la expresión de *HOXD1* en GBM**

En conjunto las investigaciones que han dilucidado el rol de *HOXD1* en distintos tipos de cáncer, sugieren que este puede ser un interesante blanco terapéutico, por lo cual es preciso dilucidar los mecanismos asociados a su expresión aberrante. En nuestra investigación realizamos, de manera complementaria al objetivo general, diferentes análisis para determinar posibles mecanismos involucrados en la disminución de la expresión de *HOXD1* en GBM. Así, evaluamos algunas de las alteraciones más frecuentes que conllevan al cambio de la expresión génica en cáncer como lo son la alteración del número de copia, la metilación de islas CpG en regiones promotoras, marcas de histonas H3K4me3 y H3K27me3 y miRNAs. Las diferentes aproximaciones bioinformáticas sugieren que el mecanismo más probable asociado a la disminución de la expresión de *HOXD1* correspondería a los miRNAs.

Respecto a nuestros análisis asociados a las aneuploidias, cabe mencionar que, encontramos un bajo porcentaje de pacientes que presentan delección de al menos una de las copias de *HOXD1*, y que no estaría asociada a la significativa disminución de la expresión de este gen. Por otro lado, el grado de la metilación de islas CpG en la región promotora de *HOXD1* no genera una concomitante disminución en la expresión de *HOXD1*, lo cual se evidencia con un bajo coeficiente de Spearman que, por lo demás, no presenta significancia estadística. En relación con las marcas de metilación de histona H3, determinamos que el silenciamiento de *HOXD1* no se debe a la disminución de H3K4me3 ni a una mayor marca de

H3K27me3 en *HOXD1*. De hecho, en nuestros análisis de dos líneas de GSC se encontraron marcas H3K4me3 en *HOXD1*, lo cual es curioso considerando que estas líneas presentan bajos niveles de expresión de *HOXD1*. Estos resultados sugieren otro u otros mecanismos involucrados en la disminución de la expresión de *HOXD1*.

Respecto a los miRNAs, nuestros resultados sugieren que la disminución de la expresión de *HOXD1* puede ser mediada, al menos en parte, por este mecanismo. En particular nuestros análisis a partir de la base de datos de CGGA sugiere que miRNAs tales como miR-301a-3p, miR-19a-3p y miR-19b-3p, interferir con la expresión de *HOXD1*. Es interesante destacar, que diferentes estudios han descrito que miR-19 a y miR19b presentan elevados niveles de expresión en gliomas (Jia et al., 2013; Vojdani et al., 2021; Yang et al., 2022). Además, se ha descrito que en gliomas estos miRNAs actúan como oncomiRs y que se asocian a diferentes procesos tumorales (Dews et al., 2010; Li et al., 2017; Lv et al., 2020; McCutcheon & Spray, 2022; Schnabel et al., 2021; Xu et al., 2010).

Es importante mencionar que nuestros resultados se obtuvieron de un análisis realizado a partir de datos de array para 830 miRNAs. Hasta la fecha existen más de 2000 miRNA descritos en humanos, por lo cual será necesario realizar estos análisis con datos más actualizados para determinar si otros miRNA, descritos más recientemente, pueden interferir con la expresión de *HOXD1*. Adicionalmente, será imperativo determinar mediante diferentes aproximaciones *in vitro* si estos miRNAs son capaces de disminuir la expresión de *HOXD1*, por ejemplo, en líneas celulares de GBM o bien en cultivos primarios derivados de pacientes con gliomas de diferentes grados tumorales.



Finalmente, en relación con los miRNAs cabe mencionar que ya se ha reportado en otro contexto cancerígeno que este mecanismo puede estar asociado a la disminución de la expresión de *HOXD1*. Específicamente en cáncer de mama, se ha descrito que miR-9 y miR125b disminuyen la expresión de *HOXD1* (Li et al., 2016), el cual también cumple un rol supresor tumoral en este cáncer.

Como ya se mencionó previamente, en la literatura se han reportado muchos mecanismos asociados a la regulación de la expresión de los genes HOX, tanto en un contexto fisiológico como patológico. Particularmente, se ha destacado que la regulación de estos genes durante el desarrollo es compleja y que involucra un conjunto de parámetros estructurales y epigenéticos que contribuyen a una regulación espaciotemporal que determina el correcto desarrollo embrionario. Considerando el conjunto de desregulaciones que coexisten en las células tumorales, implican que es aún más complejo establecer los mecanismos involucrados en la desregulación de la expresión de *HOXD1* en gliomas. Este punto se hace más relevante cuando aún no se ha establecido por completo el perfil normal de expresión de genes HOX en los diferentes tipos celulares que componen el cerebro adulto, como tampoco se conocen los mecanismos involucrados en la regulación y mantención de la expresión del código HOX en este contexto.

En conjunto, estas observaciones sugieren que el mecanismo subyacente a la desregulación del gen HOX en el glioma es complejo y que la principal fuerza impulsora aún está por determinarse.

## ***Danio rerio* como modelo *in vivo* para el estudio del efecto de la modulación de la expresión de HOXD1 en las GSC**

Como ya se mencionó previamente, será imperativo validar los resultados mediante aproximaciones *in vivo*, las cuales son necesarios para comprender el comportamiento asociado a las células madre en el contexto del nicho tumoral y como estas son responsables de procesos como metástasis, resistencia a tratamiento y recurrencia. Como se evidencio de nuestros resultados preliminares, los embriones de pez cebra ofrecen un excelente modelo para investigar el mecanismo de la invasión y diseminación de células de GSC *in vivo* (Welker et al., 2017; X. J. Yang et al., 2013).

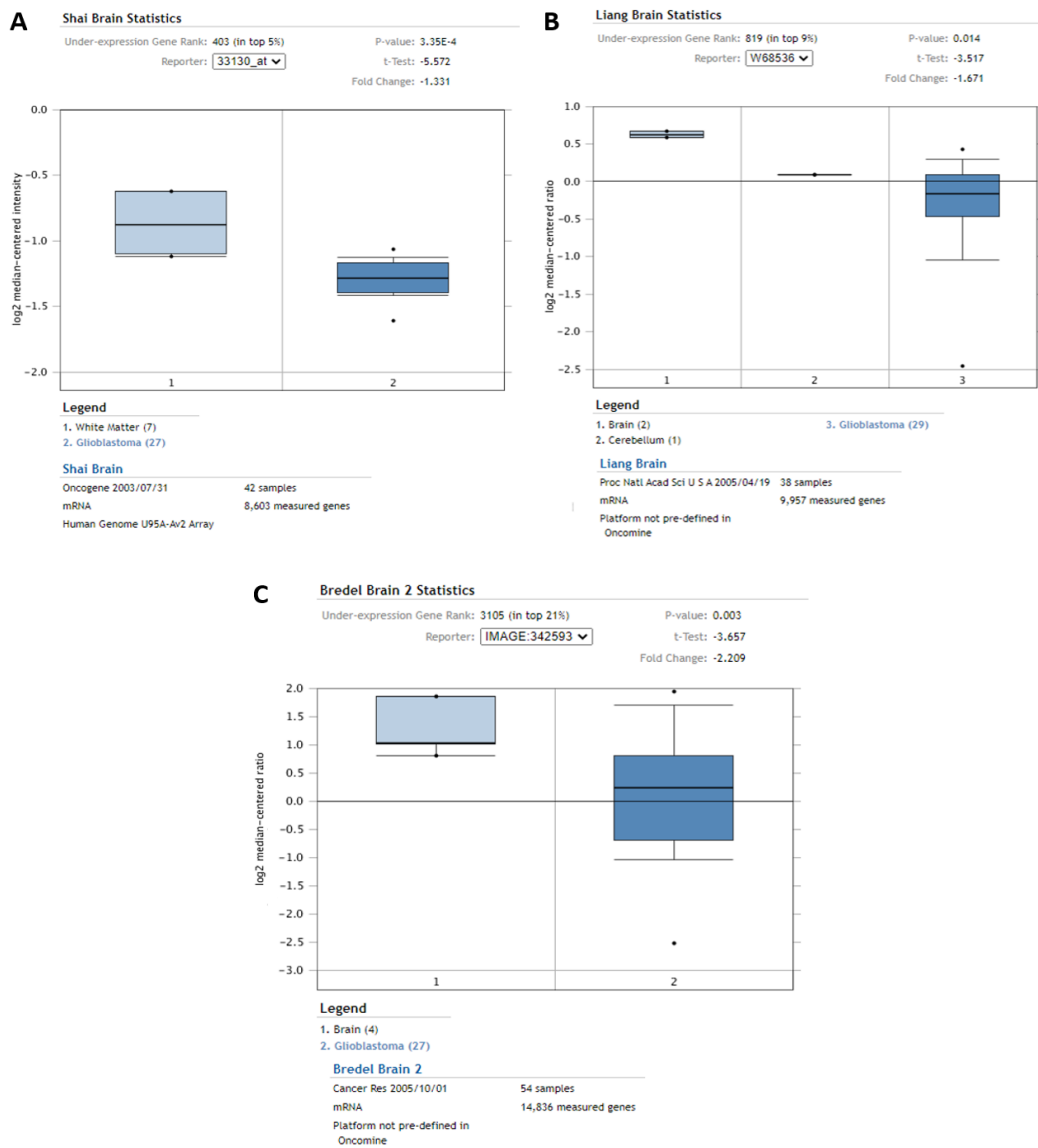
En consecuencia, la proyección de nuestro trabajo en el modelo del pez cebra consistirá en evaluar si la activación de la expresión de *HOXD1* en las GSC, derivadas de líneas de GBM, disminuye su agresividad en relación con su respectivo control. De igual manera se podría evaluar si la disminución o eliminación de la expresión de *HOXD1* genera un aumento del porcentaje de GSC o bien un aumento de la agresividad de las GSC preexistentes en los xenotrasplantes en larvas de pez cebra. Se pueden evaluar diferentes parámetros en estos ensayos, como por ejemplo el tamaño de los tumores generados, la capacidad de invasión a los tejidos adyacentes y el número de focos metastásicos. Adicionalmente, se evaluarán marcadores de troncalidad y de diferenciación para determinar cómo estos se asocian con la expresión de *HOXD1* en células tumorales xenotrasplantadas en larvas de pez cebra.

## CONCLUSIÓN

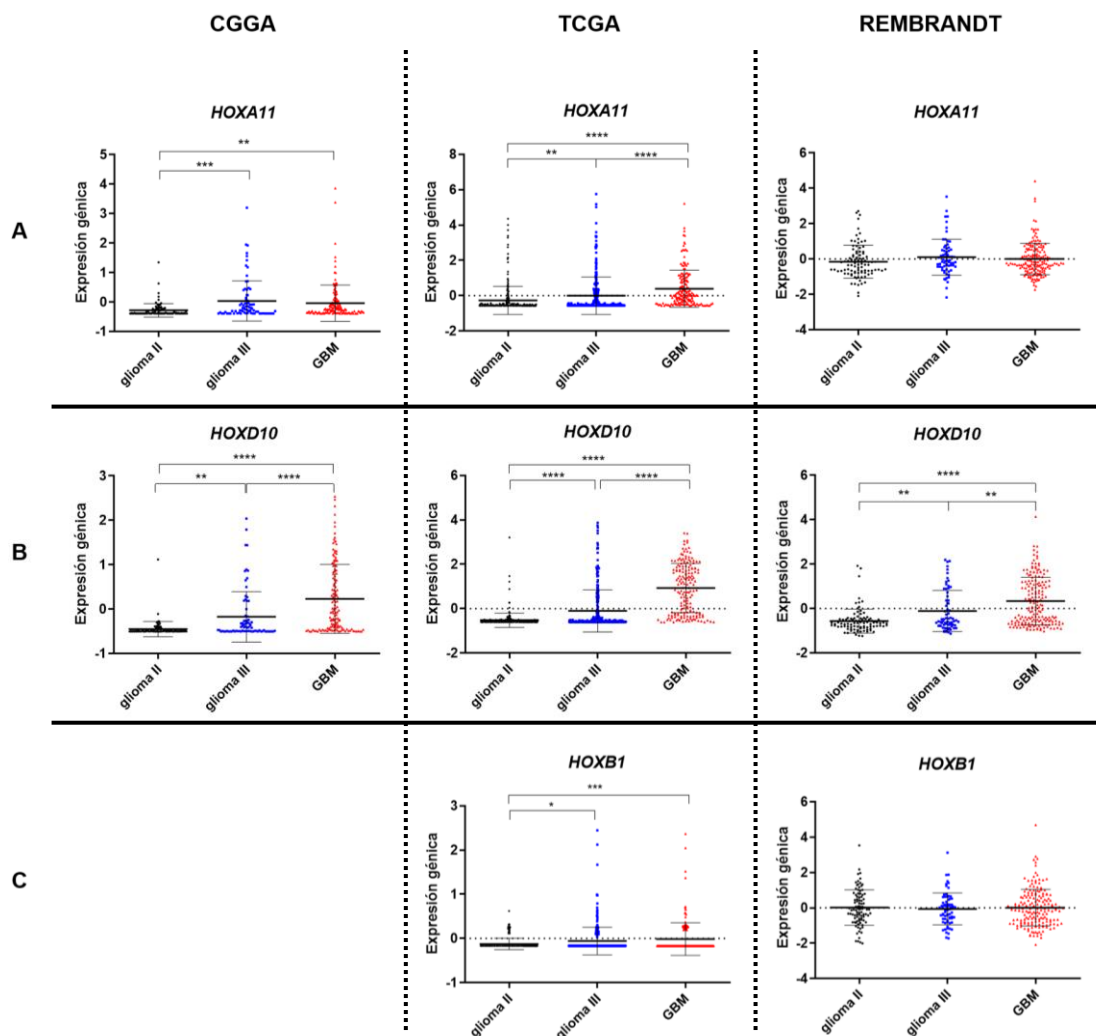
En conjunto con la evidencia presentada en otros tipos de cáncer, en donde se destaca el rol de los genes HOX como reguladores importantes del destino de las células madre, nuestra investigación sugiere que la diferenciación inducida por genes HOX debe considerarse como un enfoque viable para abordar las GSC. Hasta el momento no se ha dilucidado si los genes HOX descritos en gliomas como potenciales genes supresores pueden inducir la diferenciación de esta subpoblación tumoral. Sin embargo, los resultados de nuestra investigación sugieren que *HOXD1* es un gen supresor tumoral en glioma que podría inducir la diferenciación de las GSC.

# MATERIAL SUPPLEMENTARIO

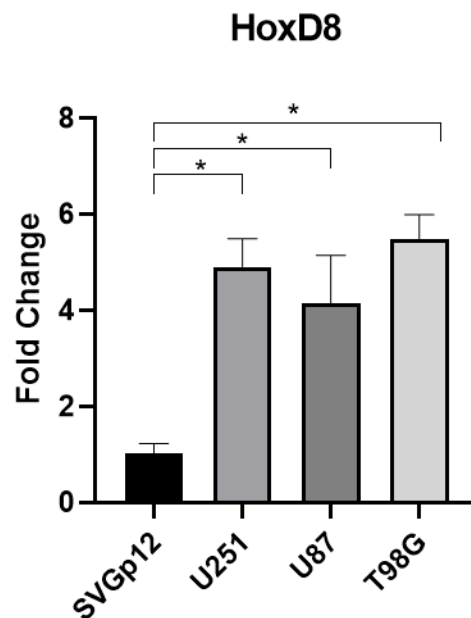
## FIGURAS SUPLEMENTARIAS



**Figura S 1: La expresión de *HOXD1* es menor en muestras de GBM en comparación con tejido normal.** De la consulta en línea en la base de datos ONCOMINE, se encontraron diferentes estudios que indican que *HOXD1* disminuye su expresión en GBM en relación con su expresión en muestras de tejido cerebral normal. Los estudios de Shai (A), Liang (B) y Breden (C) comprenden datos de expresión obtenidos desde microarrays, los cuales son independientes entre sí. El análisis estadístico y el valor-p se indica en cada gráfico.

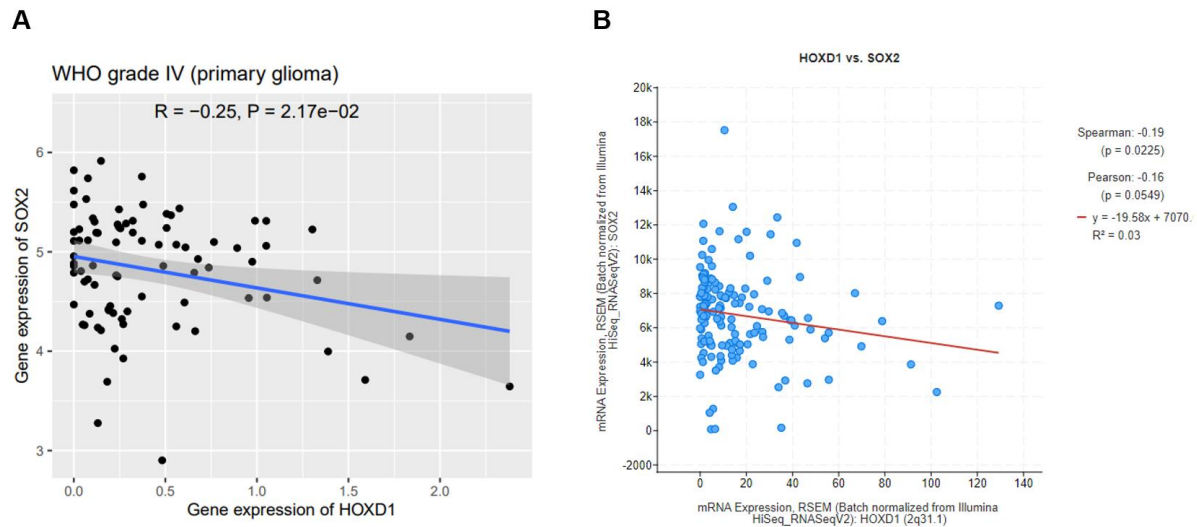


*HOXB1*, respectivamente. Estos se generaron a partir de los datos de expresión obtenidos desde las bases TCGA (con datos de 519 pacientes con LGG y 173 pacientes con GBM), CGGA (con datos de 184 pacientes con LGG y 140 pacientes con GBM) y REMBRANDT (con datos de 161 pacientes con LGG y 179 pacientes con GBM). Se observa que estos genes tienen una mayor expresión en GBM en comparación a LGG. La expresión génica corresponde a los z-score calculados a partir de los datos de expresión en FPKM. Para el análisis estadístico se utilizó el test ANOVA y post test de Tukey. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

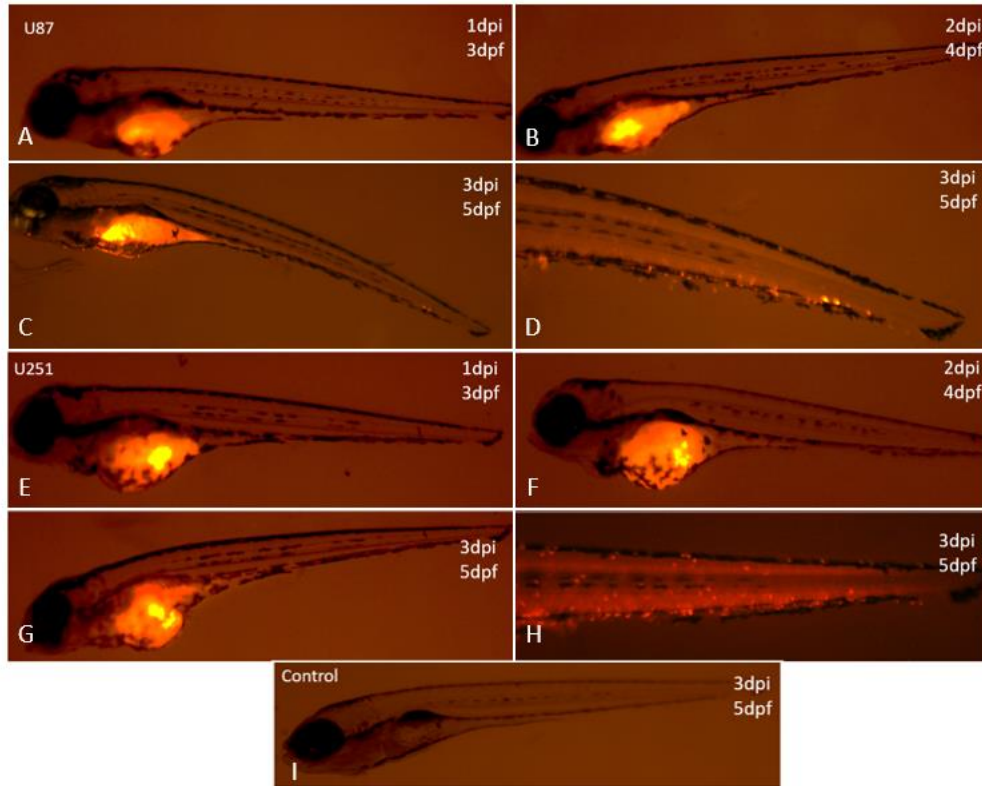


**Figura S 3: *HOXD8* presenta altos niveles de expresión en las líneas de GBM U87, U251 y T98G.** Analizamos la expresión de *HOXD8* en las líneas celulares de GBM U87, U251 y T98G mediante RTqPCR. Observamos que estas líneas celulares de GBM presentan mayores niveles de expresión de *HOXD8* en comparación con la línea de astrocitos fetales SVGp12. Para el análisis estadístico

se utilizó el test Mann Whitney (one-tailed). \*  $p < 0,05$ .



**Figura S 4: La expresión de *SOX2* correlaciona negativamente con la expresión de *HOXD1*.** A. y B. Análisis de correlación de datos transcriptómicos de GBM obtenidos desde las bases CGGA y TCGA, respectivamente. El valor p se indica en cada gráfico.

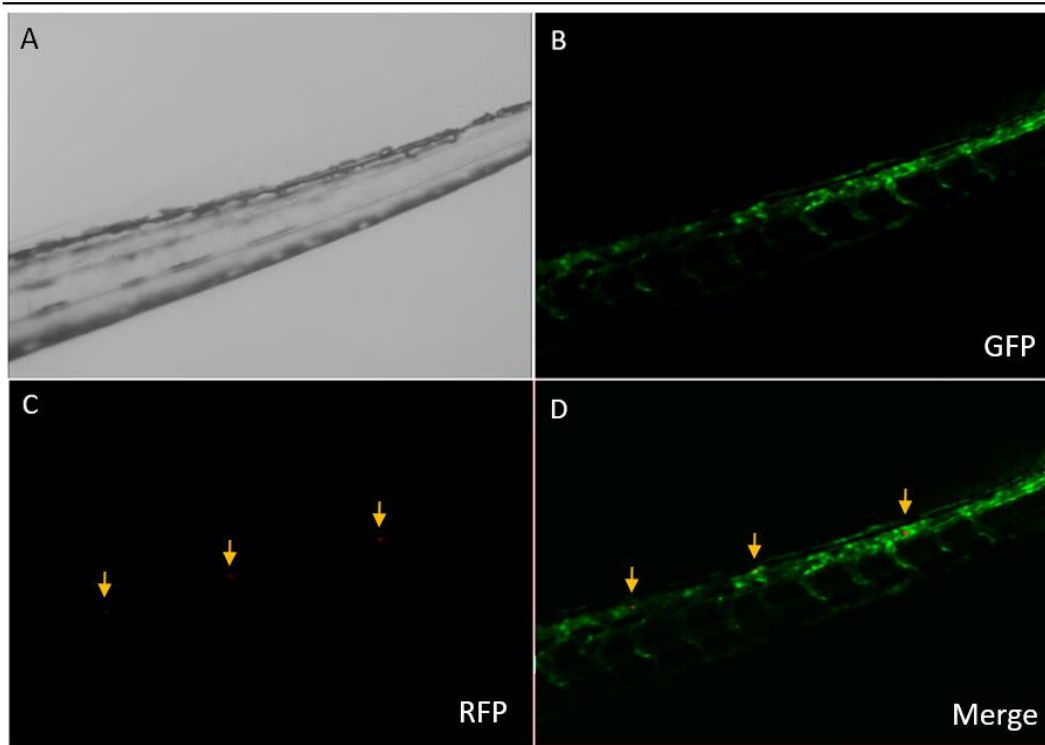


**Figura S 5: Inyección de células de GBM, U87 y U251, en el vitelo de pez cebra.**

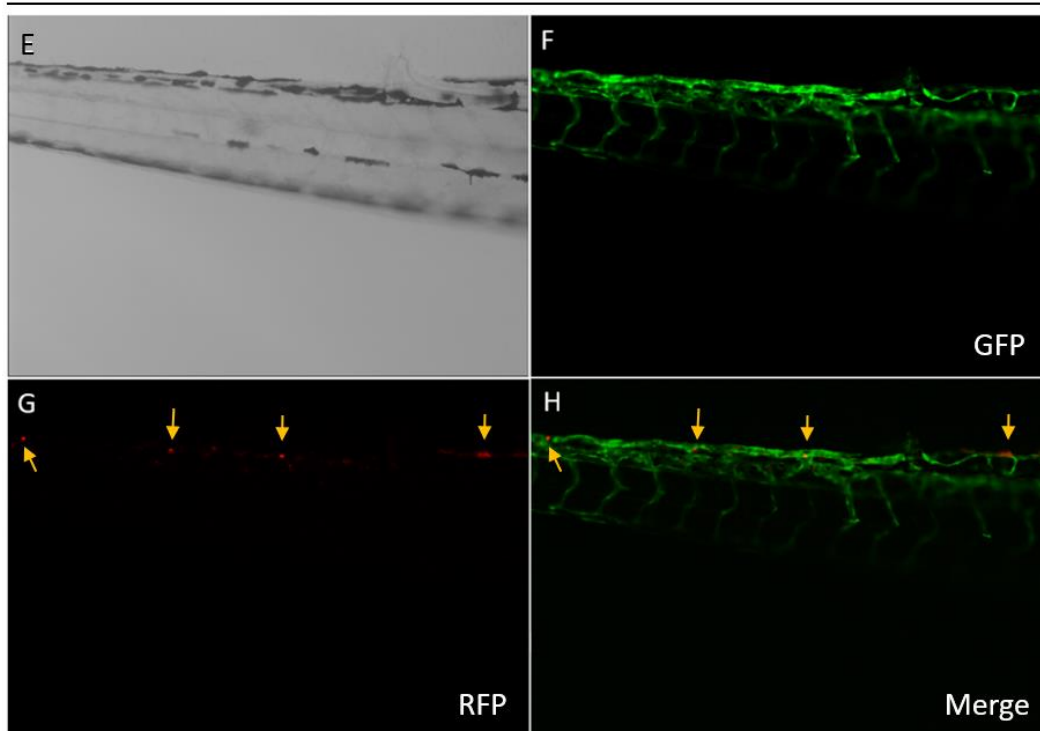
Mediante microscopía de epifluorescencia se visualizaron larvas de pez cebra, de la línea Tab5, las cuales se inyectaron a los 2dpf con células de líneas de glioblastoma, U87 y U251. A. y E. Se observó que 1dpi se logran visualizar las células inyectadas en el vitelo, además se descarta la presencia de estas en otras zonas del pez. B. y F. A los 2 dpi se observa un aumento del volumen de las células que residen en el vitelo del pez. C. y G. Luego de 3dpi, el aumento del volumen de células de GBM es más evidente, destacando que las células comienzan a ocupar la parte más posterior del vitelo. D. y H. Adicionalmente, a los 3 dpi se logran visualizar células en la cola del pez. I. El control corresponde a larvas inyectadas con medio de cultivo DMEM. Aumento 4X y 10X.



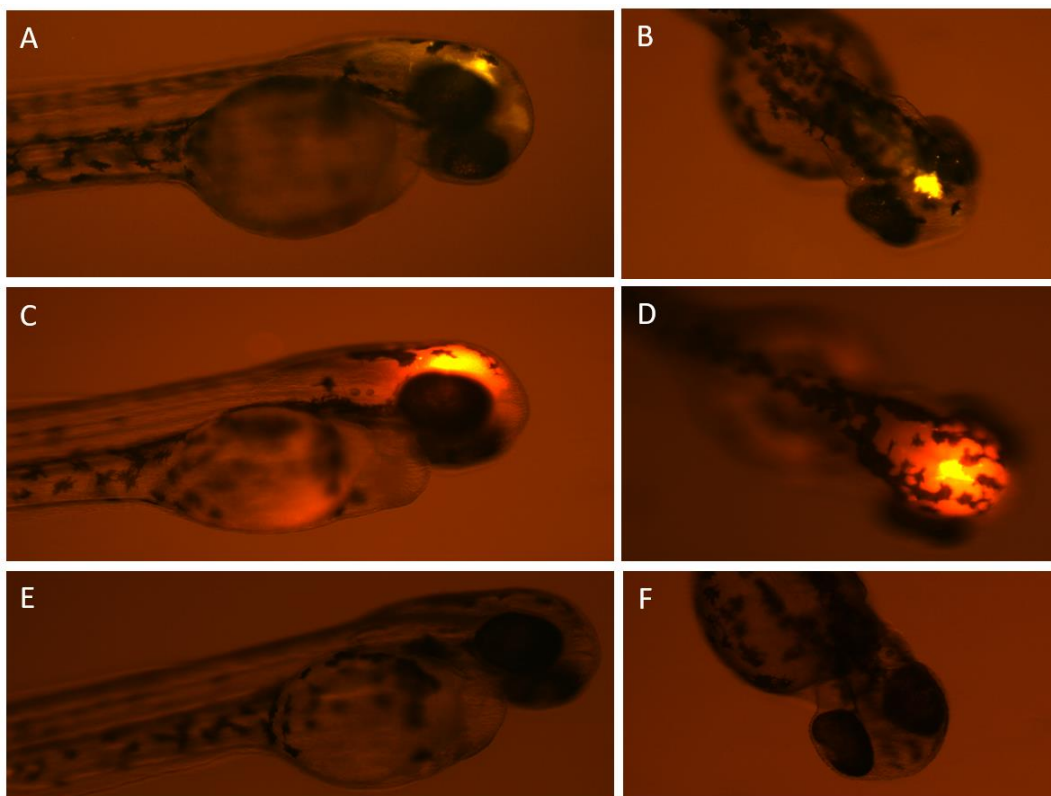
U87



U251



**Figura S 6: Visualización de células de GBM, U87 y U251 que migran hacia la cola del pez a través de vasos sanguíneos.** Mediante microscopía confocal visualizamos larvas de pez cebra Tg (*fli1*: GFP) las cuales se inyectaron a los 2dpf con células de las líneas de GBM U87 y U251 (rojo). A los 2 dpi, 4dpf, es posible visualizar células que migran a través de los vasos sanguíneos hacia la cola del pez (destacadas con flechas amarillas). A y E: Campo claro, B y F: Canal GFP, C y G: Canal RFP, D y H: Merge. Aumento 20X.



**Figura suplementaria 7: Inyección de células de la línea de GBM U87 en el cerebro del pez cebra.** Mediante microscopía de epifluorescencia se visualizaron

larvas de pez cebra, de la línea Tab5, las cuales se inyectaron a las 36 hpf con células de glioblastoma de la línea U87. Se probaron dos compuestos distintos para la visualización de las células. A. y B. Imagen representativa de larvas de 2dpi inyectadas con células marcadas con Vybrant Dil. C. y D. Imagen representativa de larvas de 2dpi inyectadas con células marcadas con Mitotracker CMXRos. D. y F. Larvas control inyectadas con DMEM. Aumento 10X

## Tablas versión completa

Tabla 2: Procesos biológicos enriquecidos a partir de genes que correlacionan positivamente con HOXD1 en pacientes con GBM (versión completa).

GO biological process complete	Homo sapiens - REFLIST (20589)	upload_1 (3145)	upload_1 (expected)	upload_1 (over/under)	upload_1 (fold Enrichment)	upload_1 (raw P-value)	upload_1 (FDR)
regulation of synaptic vesicle membrane organization (GO:1901632)	9	9	1.37	+	6.55	1.95E-04	9.08E-03
regulation of synaptic vesicle fusion to presynaptic active zone membrane (GO:0031630)	9	9	1.37	+	6.55	1.95E-04	9.05E-03
calcium ion-regulated exocytosis of neurotransmitter (GO:0048791)	14	11	2.14	+	5.14	1.61E-04	7.69E-03
positive regulation of calcium ion-dependent exocytosis (GO:0045956)	17	12	2.60	+	4.62	1.67E-04	7.91E-03
positive regulation of catecholamine secretion (GO:0033605)	13	9	1.99	+	4.53	1.21E-03	4.00E-02
regulation of AMPA receptor activity (GO:2000311)	26	17	3.97	+	4.28	1.56E-05	1.01E-03
neuronal action potential (GO:0019228)	31	20	4.74	+	4.22	3.28E-06	2.62E-04
regulation of short-term neuronal synaptic plasticity (GO:0048172)	16	10	2.44	+	4.09	1.15E-03	3.92E-02
regulation of dopamine secretion (GO:0014059)	37	23	5.65	+	4.07	9.84E-07	8.72E-05
aspartate family amino acid catabolic process (GO:0009068)	18	11	2.75	+	4.00	7.54E-04	2.74E-02
central nervous system myelination (GO:0022010)	23	14	3.51	+	3.98	1.53E-04	7.38E-03
axon ensheathment in central nervous system (GO:0032291)	23	14	3.51	+	3.98	1.53E-04	7.36E-03
cell-cell signaling involved in cardiac conduction (GO:0086019)	27	16	4.12	+	3.88	6.63E-05	3.57E-03
regulation of vesicle fusion (GO:0031338)	22	13	3.36	+	3.87	3.24E-04	1.37E-02
calcium ion import across plasma membrane (GO:0098703)	24	14	3.67	+	3.82	2.12E-04	9.61E-03

vocalization behavior (GO:0071625)	19	11	2.90	+	3.79	1.05E-03	3.63E-02
regulation of glutamate secretion (GO:0014048)	19	11	2.90	+	3.79	1.05E-03	3.62E-02
regulation of catecholamine secretion (GO:0050433)	56	32	8.55	+	3.74	3.52E-08	4.25E-06
positive regulation of excitatory postsynaptic potential (GO:2000463)	30	17	4.58	+	3.71	6.01E-05	3.29E-03
membrane depolarization during action potential (GO:0086010)	30	17	4.58	+	3.71	6.01E-05	3.28E-03
transmission of nerve impulse (GO:0019226)	57	32	8.71	+	3.68	4.80E-08	5.58E-06
calcium-ion regulated exocytosis (GO:0017156)	43	24	6.57	+	3.65	2.39E-06	1.96E-04
regulation of neuronal synaptic plasticity (GO:0048168)	57	31	8.71	+	3.56	1.33E-07	1.39E-05
ligand-gated ion channel signaling pathway (GO:1990806)	26	14	3.97	+	3.53	3.94E-04	1.61E-02
ionotropic glutamate receptor signaling pathway (GO:0035235)	26	14	3.97	+	3.53	3.94E-04	1.61E-02
long-term synaptic potentiation (GO:0060291)	47	25	7.18	+	3.48	2.86E-06	2.30E-04
neurotransmitter secretion (GO:0007269)	81	43	12.37	+	3.48	9.45E-10	1.45E-07
signal release from synapse (GO:0099643)	81	43	12.37	+	3.48	9.45E-10	1.44E-07
oligodendrocyte development (GO:0014003)	42	22	6.42	+	3.43	1.34E-05	8.76E-04
maintenance of synapse structure (GO:0099558)	25	13	3.82	+	3.40	8.08E-04	2.91E-02
gamma-aminobutyric acid signaling pathway (GO:0007214)	27	14	4.12	+	3.39	5.25E-04	2.01E-02
negative regulation of amine transport (GO:0051953)	27	14	4.12	+	3.39	5.25E-04	2.01E-02
synaptic vesicle exocytosis (GO:0016079)	56	29	8.55	+	3.39	7.20E-07	6.60E-05
adult walking behavior (GO:0007628)	31	16	4.74	+	3.38	2.23E-04	1.00E-02
modulation of excitatory postsynaptic potential (GO:0098815)	43	22	6.57	+	3.35	1.77E-05	1.11E-03
glutamate receptor signaling pathway (GO:0007215)	47	24	7.18	+	3.34	7.65E-06	5.35E-04
neurotransmitter transport (GO:0006836)	133	67	20.32	+	3.30	1.46E-13	4.67E-11
retina layer formation (GO:0010842)	26	13	3.97	+	3.27	1.07E-03	3.66E-02
walking behavior (GO:0090659)	32	16	4.89	+	3.27	2.94E-04	1.26E-02
protein localization to synapse (GO:0035418)	53	26	8.10	+	3.21	5.67E-06	4.19E-04
synaptic vesicle cycle (GO:0099504)	122	58	18.64	+	3.11	4.38E-11	8.57E-09
positive regulation of amine transport (GO:0051954)	40	19	6.11	+	3.11	1.39E-04	6.84E-03
acidic amino acid transport (GO:0015800)	40	19	6.11	+	3.11	1.39E-04	6.81E-03
regulation of amine transport (GO:0051952)	93	44	14.21	+	3.10	1.24E-08	1.62E-06
membrane depolarization (GO:0051899)	53	25	8.10	+	3.09	1.44E-05	9.35E-04
oligodendrocyte differentiation (GO:0048709)	66	31	10.08	+	3.07	2.52E-06	2.04E-04
response to amphetamine (GO:0001975)	30	14	4.58	+	3.06	1.17E-03	3.92E-02
synaptic transmission, glutamatergic (GO:0035249)	30	14	4.58	+	3.06	1.17E-03	3.91E-02
vesicle-mediated transport in synapse (GO:0099003)	131	60	20.01	+	3.00	5.65E-11	1.05E-08
regulation of synaptic transmission, GABAergic (GO:0032228)	35	16	5.35	+	2.99	6.34E-04	2.34E-02
positive regulation of synaptic transmission, glutamatergic (GO:0051968)	33	15	5.04	+	2.98	9.70E-04	3.43E-02
eating behavior (GO:0042755)	33	15	5.04	+	2.98	9.70E-04	3.43E-02
potassium ion transmembrane transport (GO:0071805)	160	72	24.44	+	2.95	1.47E-12	3.78E-10
regulation of calcium ion-dependent exocytosis (GO:0017158)	40	18	6.11	+	2.95	3.45E-04	1.45E-02
negative regulation of axonogenesis (GO:0050771)	65	29	9.93	+	2.92	8.68E-06	5.97E-04
regulation of synaptic plasticity (GO:0048167)	191	85	29.18	+	2.91	2.76E-14	1.03E-11
neuromuscular process controlling balance (GO:0050885)	52	23	7.94	+	2.90	9.11E-05	4.74E-03
cell communication involved in cardiac conduction (GO:0086065)	43	19	6.57	+	2.89	4.34E-04	1.75E-02

receptor localization to synapse (GO:0097120)	43	19	6.57	+	2.89	4.34E-04	1.75E-02
positive regulation of synapse assembly (GO:0051965)	62	27	9.47	+	2.85	2.36E-05	1.42E-03
action potential (GO:0001508)	99	43	15.12	+	2.84	1.27E-07	1.35E-05
multicellular organismal signaling (GO:0035637)	120	52	18.33	+	2.84	5.17E-09	6.98E-07
potassium ion transport (GO:0006813)	170	73	25.97	+	2.81	5.99E-12	1.38E-09
regulation of neurotransmitter receptor activity (GO:0099601)	63	27	9.62	+	2.81	2.84E-05	1.67E-03
positive regulation of synaptic transmission (GO:0050806)	133	57	20.32	+	2.81	1.92E-09	2.85E-07
regulation of synaptic transmission, glutamatergic (GO:0051966)	75	32	11.46	+	2.79	5.38E-06	4.00E-04
learning (GO:0007612)	150	63	22.91	+	2.75	3.40E-10	5.67E-08
associative learning (GO:0008306)	84	35	12.83	+	2.73	3.73E-06	2.92E-04
regulation of neurotransmitter secretion (GO:0046928)	90	37	13.75	+	2.69	2.25E-06	1.85E-04
cardiac muscle cell contraction (GO:0086003)	44	18	6.72	+	2.68	9.89E-04	3.48E-02
cardiac muscle cell action potential (GO:0086001)	49	20	7.48	+	2.67	5.09E-04	1.98E-02
adult behavior (GO:0030534)	140	57	21.39	+	2.67	8.21E-09	1.09E-06
positive regulation of adenylate cyclase activity (GO:0045762)	42	17	6.42	+	2.65	1.50E-03	4.82E-02
regulation of heart rate by cardiac conduction (GO:0086091)	42	17	6.42	+	2.65	1.50E-03	4.81E-02
modulation of chemical synaptic transmission (GO:0050804)	424	171	64.77	+	2.64	6.95E-24	1.09E-20
regulation of trans-synaptic signaling (GO:0099177)	425	171	64.92	+	2.63	8.21E-24	1.17E-20
negative regulation of axon extension (GO:0030517)	45	18	6.87	+	2.62	1.16E-03	3.93E-02
trans-synaptic signaling (GO:0099537)	420	167	64.16	+	2.60	8.81E-23	1.06E-19
signal release (GO:0023061)	161	64	24.59	+	2.60	2.02E-09	2.96E-07
regulation of adenylate cyclase activity (GO:0045761)	63	25	9.62	+	2.60	1.86E-04	8.74E-03
regulation of postsynaptic membrane potential (GO:0060078)	96	38	14.66	+	2.59	4.13E-06	3.19E-04
chemical synaptic transmission (GO:0007268)	402	159	61.41	+	2.59	1.68E-21	1.31E-18
anterograde trans-synaptic signaling (GO:0098916)	402	159	61.41	+	2.59	1.68E-21	1.25E-18
regulation of neurotransmitter levels (GO:0001505)	217	85	33.15	+	2.56	7.66E-12	1.74E-09
adenylate cyclase-inhibiting G protein-coupled receptor signaling pathway (GO:0007193)	77	30	11.76	+	2.55	4.38E-05	2.48E-03
regulation of nervous system process (GO:0031644)	144	56	22.00	+	2.55	4.14E-08	4.84E-06
adult locomotory behavior (GO:0008344)	80	31	12.22	+	2.54	5.42E-05	2.99E-03
excitatory postsynaptic potential (GO:0060079)	62	24	9.47	+	2.53	3.12E-04	1.32E-02
synaptic signaling (GO:0099536)	450	174	68.74	+	2.53	1.03E-22	1.08E-19
regulation of action potential (GO:0098900)	57	22	8.71	+	2.53	6.19E-04	2.31E-02
regulated exocytosis (GO:0045055)	130	50	19.86	+	2.52	2.06E-07	2.15E-05
regulation of synaptic vesicle exocytosis (GO:2000300)	60	23	9.17	+	2.51	4.65E-04	1.84E-02
peptide hormone secretion (GO:0030072)	60	23	9.17	+	2.51	4.65E-04	1.84E-02
renal tubule morphogenesis (GO:0061333)	68	26	10.39	+	2.50	1.84E-04	8.67E-03
positive regulation of cyclase activity (GO:0031281)	55	21	8.40	+	2.50	9.23E-04	3.29E-02
locomotory behavior (GO:0007626)	192	73	29.33	+	2.49	7.03E-10	1.11E-07
regulation of neurotransmitter transport (GO:0051588)	103	39	15.73	+	2.48	8.31E-06	5.74E-04
regulation of cyclase activity (GO:0031279)	82	31	12.53	+	2.47	6.41E-05	3.47E-03
memory (GO:0007613)	122	46	18.64	+	2.47	9.72E-07	8.66E-05
calcium ion transmembrane import into cytosol (GO:0097553)	86	32	13.14	+	2.44	5.49E-05	3.02E-03
regulation of membrane potential (GO:0042391)	425	158	64.92	+	2.43	2.53E-19	1.53E-16

peptide secretion (GO:0002790)	62	23	9.47	+	2.43	6.05E-04	2.26E-02
negative regulation of neurogenesis (GO:0050768)	138	51	21.08	+	2.42	4.26E-07	4.18E-05
presynaptic endocytosis (GO:0140238)	57	21	8.71	+	2.41	1.16E-03	3.93E-02
synaptic vesicle endocytosis (GO:0048488)	57	21	8.71	+	2.41	1.16E-03	3.92E-02
protein localization to cell junction (GO:1902414)	79	29	12.07	+	2.40	1.55E-04	7.44E-03
feeding behavior (GO:0007631)	90	33	13.75	+	2.40	7.59E-05	3.99E-03
regulation of potassium ion transport (GO:0043266)	104	38	15.89	+	2.39	1.62E-05	1.04E-03
regulation of axon extension (GO:0030516)	96	35	14.66	+	2.39	4.12E-05	2.34E-03
negative regulation of nervous system development (GO:0051961)	143	52	21.84	+	2.38	6.05E-07	5.72E-05
chemical synaptic transmission, postsynaptic (GO:0099565)	66	24	10.08	+	2.38	8.04E-04	2.90E-02
regulation of extent of cell growth (GO:0061387)	111	40	16.96	+	2.36	1.64E-05	1.05E-03
regulation of potassium ion transmembrane transport (GO:1901379)	89	32	13.59	+	2.35	1.18E-04	5.93E-03
nephron tubule morphogenesis (GO:0072078)	64	23	9.78	+	2.35	1.18E-03	3.94E-02
negative regulation of synaptic transmission (GO:0050805)	64	23	9.78	+	2.35	1.18E-03	3.93E-02
synaptic vesicle recycling (GO:0036465)	64	23	9.78	+	2.35	1.18E-03	3.92E-02
regulation of lyase activity (GO:0051339)	81	29	12.37	+	2.34	1.99E-04	9.17E-03
ensheathment of neurons (GO:0007272)	112	40	17.11	+	2.34	1.76E-05	1.12E-03
homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules (GO:0007156)	168	60	25.66	+	2.34	1.14E-07	1.23E-05
axon ensheathment (GO:0008366)	112	40	17.11	+	2.34	1.76E-05	1.11E-03
myelination (GO:0042552)	110	39	16.80	+	2.32	2.55E-05	1.51E-03
dicarboxylic acid transport (GO:0006835)	68	24	10.39	+	2.31	9.49E-04	3.38E-02
regulation of synapse assembly (GO:0051963)	102	36	15.58	+	2.31	6.75E-05	3.62E-03
neural retina development (GO:0003407)	68	24	10.39	+	2.31	9.49E-04	3.37E-02
synapse organization (GO:0050808)	294	103	44.91	+	2.29	8.17E-12	1.83E-09
synapse assembly (GO:0007416)	103	36	15.73	+	2.29	7.15E-05	3.79E-03
regulation of synapse structure or activity (GO:0050803)	215	75	32.84	+	2.28	7.74E-09	1.04E-06
nephron epithelium morphogenesis (GO:0072088)	66	23	10.08	+	2.28	1.39E-03	4.52E-02
regulation of sodium ion transmembrane transport (GO:1902305)	66	23	10.08	+	2.28	1.39E-03	4.51E-02
learning or memory (GO:0007611)	267	93	40.78	+	2.28	1.10E-10	1.98E-08
regulation of exocytosis (GO:0017157)	213	74	32.54	+	2.27	1.11E-08	1.46E-06
inorganic ion import across plasma membrane (GO:0099587)	98	34	14.97	+	2.27	1.40E-04	6.84E-03
inorganic cation import across plasma membrane (GO:0098659)	98	34	14.97	+	2.27	1.40E-04	6.82E-03
sensory perception of pain (GO:0019233)	75	26	11.46	+	2.27	6.26E-04	2.33E-02
regulation of behavior (GO:0050795)	75	26	11.46	+	2.27	6.26E-04	2.32E-02
nephron tubule development (GO:0072080)	78	27	11.91	+	2.27	7.04E-04	2.57E-02
regulation of axonogenesis (GO:0050770)	156	54	23.83	+	2.27	1.05E-06	9.21E-05
regulation of sodium ion transport (GO:0002028)	90	31	13.75	+	2.25	2.27E-04	1.01E-02
sodium ion transmembrane transport (GO:0035725)	122	42	18.64	+	2.25	2.21E-05	1.35E-03
renal tubule development (GO:0061326)	82	28	12.53	+	2.24	5.65E-04	2.14E-02
positive regulation of neuron differentiation (GO:0045666)	91	31	13.90	+	2.23	2.55E-04	1.11E-02
neuromuscular process (GO:0050905)	141	48	21.54	+	2.23	6.90E-06	4.91E-04
regulation of synapse organization (GO:0050807)	209	71	31.93	+	2.22	4.02E-08	4.74E-06
cognition (GO:0050890)	310	105	47.35	+	2.22	3.70E-11	7.34E-09

regulation of regulated secretory pathway (GO:1903305)	145	49	22.15	+	2.21	5.82E-06	4.22E-04
regulation of postsynapse organization (GO:0099175)	89	30	13.59	+	2.21	3.69E-04	1.53E-02
postsynapse organization (GO:0099173)	92	31	14.05	+	2.21	4.11E-04	1.67E-02
negative regulation of cell projection organization (GO:0031345)	187	62	28.56	+	2.17	6.78E-07	6.29E-05
cellular response to catecholamine stimulus (GO:0071870)	97	32	14.82	+	2.16	3.59E-04	1.49E-02
cellular response to monoamine stimulus (GO:0071868)	97	32	14.82	+	2.16	3.59E-04	1.49E-02
cellular response to dopamine (GO:1903351)	82	27	12.53	+	2.16	9.92E-04	3.46E-02
negative regulation of neuron projection development (GO:0010977)	137	45	20.93	+	2.15	2.44E-05	1.45E-03
regulation of cation channel activity (GO:2001257)	180	59	27.50	+	2.15	1.79E-06	1.52E-04
glial cell development (GO:0021782)	110	36	16.80	+	2.14	1.89E-04	8.83E-03
positive regulation of exocytosis (GO:0045921)	86	28	13.14	+	2.13	1.19E-03	3.94E-02
central nervous system neuron differentiation (GO:0021953)	169	55	25.81	+	2.13	4.00E-06	3.12E-04
dendrite development (GO:0016358)	111	36	16.96	+	2.12	2.06E-04	9.38E-03
neuron projection development (GO:0031175)	656	211	100.20	+	2.11	2.19E-19	1.49E-16
neuropeptide signaling pathway (GO:0007218)	112	36	17.11	+	2.10	2.26E-04	1.01E-02
neuron projection morphogenesis (GO:0048812)	462	148	70.57	+	2.10	1.09E-13	3.57E-11
response to catecholamine (GO:0071869)	100	32	15.28	+	2.09	6.69E-04	2.46E-02
response to monoamine (GO:0071867)	100	32	15.28	+	2.09	6.69E-04	2.46E-02
inorganic anion transmembrane transport (GO:0098661)	88	28	13.44	+	2.08	1.37E-03	4.47E-02
plasma membrane bounded cell projection morphogenesis (GO:0120039)	466	148	71.18	+	2.08	1.48E-13	4.63E-11
positive regulation of cell junction assembly (GO:1901890)	104	33	15.89	+	2.08	5.41E-04	2.06E-02
positive regulation of developmental growth (GO:0048639)	164	52	25.05	+	2.08	1.72E-05	1.10E-03
nephron epithelium development (GO:0072009)	101	32	15.43	+	2.07	7.12E-04	2.59E-02
regulation of neuron differentiation (GO:0045664)	190	60	29.02	+	2.07	3.34E-06	2.66E-04
regulation of ion transmembrane transport (GO:0034765)	495	156	75.61	+	2.06	6.92E-14	2.31E-11
cell projection morphogenesis (GO:0048858)	470	148	71.79	+	2.06	2.71E-13	8.02E-11
behavior (GO:0007610)	582	183	88.90	+	2.06	4.24E-16	1.95E-13
regulation of ion transport (GO:0043269)	687	216	104.94	+	2.06	7.14E-19	3.86E-16
cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules (GO:0098742)	264	83	40.33	+	2.06	6.03E-08	6.90E-06
regulation of dendrite development (GO:0050773)	99	31	15.12	+	2.05	1.00E-03	3.50E-02
negative regulation of cell development (GO:0010721)	176	55	26.88	+	2.05	1.35E-05	8.81E-04
neuron differentiation (GO:0030182)	1018	318	155.50	+	2.05	4.18E-27	1.31E-23
regulation of G protein-coupled receptor signaling pathway (GO:0008277)	138	43	21.08	+	2.04	1.02E-04	5.25E-03
neuron development (GO:0048666)	819	255	125.10	+	2.04	1.12E-21	9.76E-19
calcium ion transmembrane transport (GO:0070588)	193	60	29.48	+	2.04	5.75E-06	4.21E-04
cell part morphogenesis (GO:0032990)	489	152	74.70	+	2.03	2.99E-13	8.69E-11
neuron migration (GO:0001764)	126	39	19.25	+	2.03	2.92E-04	1.25E-02
sodium ion transport (GO:0006814)	181	56	27.65	+	2.03	1.18E-05	7.93E-04
exocytosis (GO:0006887)	227	70	34.67	+	2.02	1.08E-06	9.39E-05
generation of neurons (GO:0048699)	1081	333	165.12	+	2.02	1.75E-27	6.86E-24
regulation of neuron projection development (GO:0010975)	432	133	65.99	+	2.02	1.64E-11	3.43E-09
inorganic ion transmembrane transport (GO:0098660)	647	199	98.83	+	2.01	1.42E-16	6.72E-14
axonogenesis (GO:0007409)	350	107	53.46	+	2.00	3.11E-09	4.42E-07

cell morphogenesis involved in neuron differentiation (GO:0048667)	422	129	64.46	+	2.00	5.27E-11	1.01E-08
kidney epithelium development (GO:0072073)	131	40	20.01	+	2.00	2.58E-04	1.12E-02
protein localization to cell periphery (GO:1990778)	233	71	35.59	+	1.99	1.40E-06	1.19E-04
regulation of ion transmembrane transporter activity (GO:0032412)	266	81	40.63	+	1.99	2.44E-07	2.48E-05
inorganic cation transmembrane transport (GO:0098662)	580	176	88.60	+	1.99	2.61E-14	9.99E-12
axon development (GO:0061564)	389	118	59.42	+	1.99	4.88E-10	8.04E-08
metal ion transport (GO:0030001)	620	188	94.71	+	1.99	2.79E-15	1.15E-12
response to calcium ion (GO:0051592)	146	44	22.30	+	1.97	2.16E-04	9.73E-03
cellular component morphogenesis (GO:0032989)	582	175	88.90	+	1.97	6.46E-14	2.20E-11
neurogenesis (GO:0022008)	1223	366	186.82	+	1.96	2.34E-28	1.22E-24
regulation of secretion by cell (GO:1903530)	556	166	84.93	+	1.95	5.27E-13	1.47E-10
import into cell (GO:0098657)	188	56	28.72	+	1.95	3.62E-05	2.08E-03
adenylate cyclase-modulating G protein-coupled receptor signaling pathway (GO:0007188)	232	69	35.44	+	1.95	4.47E-06	3.40E-04
regulation of transmembrane transporter activity (GO:0022898)	276	82	42.16	+	1.94	5.56E-07	5.31E-05
regulation of transporter activity (GO:0032409)	293	87	44.76	+	1.94	2.37E-07	2.43E-05
import across plasma membrane (GO:0098739)	152	45	23.22	+	1.94	1.97E-04	9.08E-03
glial cell differentiation (GO:0010001)	169	50	25.81	+	1.94	1.18E-04	5.92E-03
ion transmembrane transport (GO:0034220)	859	253	131.21	+	1.93	6.61E-19	3.70E-16
cell-cell signaling (GO:0007267)	1055	310	161.15	+	1.92	6.62E-23	8.64E-20
regulation of cell size (GO:0008361)	184	54	28.11	+	1.92	6.75E-05	3.61E-03
regulation of nervous system development (GO:0051960)	437	128	66.75	+	1.92	7.35E-10	1.15E-07
regulation of secretion (GO:0051046)	612	179	93.48	+	1.91	2.28E-13	7.01E-11
cation transmembrane transport (GO:0098655)	648	189	98.98	+	1.91	6.28E-14	2.24E-11
positive regulation of nervous system development (GO:0051962)	268	78	40.94	+	1.91	1.92E-06	1.62E-04
regulation of transmembrane transport (GO:0034762)	578	167	88.29	+	1.89	4.08E-12	9.99E-10
sensory perception of mechanical stimulus (GO:0050954)	180	52	27.50	+	1.89	1.25E-04	6.24E-03
regulation of neurogenesis (GO:0050767)	358	103	54.69	+	1.88	6.86E-08	7.74E-06
regulation of insulin secretion (GO:0050796)	150	43	22.91	+	1.88	5.66E-04	2.14E-02
secretion by cell (GO:0032940)	385	110	58.81	+	1.87	3.00E-08	3.65E-06
regulation of peptide hormone secretion (GO:0090276)	182	52	27.80	+	1.87	1.40E-04	6.84E-03
regulation of developmental growth (GO:0048638)	320	91	48.88	+	1.86	6.83E-07	6.30E-05
protein localization to plasma membrane (GO:0072659)	197	56	30.09	+	1.86	1.13E-04	5.71E-03
regulation of system process (GO:0044057)	563	160	86.00	+	1.86	3.19E-11	6.49E-09
positive regulation of ion transport (GO:0043270)	279	79	42.62	+	1.85	4.22E-06	3.23E-04
regulation of cation transmembrane transport (GO:1904062)	371	105	56.67	+	1.85	1.10E-07	1.19E-05
detection of abiotic stimulus (GO:0009582)	138	39	21.08	+	1.85	1.15E-03	3.91E-02
muscle system process (GO:0003012)	277	78	42.31	+	1.84	5.67E-06	4.18E-04
cell junction organization (GO:0034330)	487	137	74.39	+	1.84	1.55E-09	2.31E-07
regulation of peptide secretion (GO:0002791)	185	52	28.26	+	1.84	2.21E-04	9.97E-03
neuron projection guidance (GO:0097485)	235	66	35.90	+	1.84	3.38E-05	1.95E-03
regulation of vesicle-mediated transport (GO:0060627)	543	152	82.94	+	1.83	2.12E-10	3.65E-08
regulation of muscle contraction (GO:0006937)	168	47	25.66	+	1.83	5.21E-04	2.01E-02
calcium ion transport (GO:0006816)	240	67	36.66	+	1.83	2.91E-05	1.71E-03



axon guidance (GO:0007411)	234	65	35.74	+	1.82	4.73E-05	2.65E-03
export from cell (GO:0140352)	440	122	67.21	+	1.82	2.32E-08	2.90E-06
sensory perception of sound (GO:0007605)	159	44	24.29	+	1.81	8.15E-04	2.93E-02
regulation of blood circulation (GO:1903522)	253	70	38.65	+	1.81	3.05E-05	1.77E-03
regulation of peptide transport (GO:0090087)	188	52	28.72	+	1.81	3.52E-04	1.47E-02
regulation of cell junction assembly (GO:1901888)	199	55	30.40	+	1.81	1.83E-04	8.65E-03
muscle contraction (GO:0006936)	228	63	34.83	+	1.81	7.79E-05	4.08E-03
positive regulation of secretion by cell (GO:1903532)	280	77	42.77	+	1.80	1.29E-05	8.49E-04
regulation of heart contraction (GO:0008016)	204	56	31.16	+	1.80	2.08E-04	9.46E-03
cation transport (GO:0006812)	828	227	126.48	+	1.79	3.38E-14	1.23E-11
gliogenesis (GO:0042063)	219	60	33.45	+	1.79	1.21E-04	6.05E-03
regulation of protein polymerization (GO:0032271)	201	55	30.70	+	1.79	2.67E-04	1.15E-02
anion transmembrane transport (GO:0098656)	234	64	35.74	+	1.79	9.49E-05	4.91E-03
regulation of plasma membrane bounded cell projection organization (GO:0120035)	623	170	95.16	+	1.79	1.15E-10	2.04E-08
cell morphogenesis (GO:0000902)	686	187	104.79	+	1.78	1.29E-11	2.81E-09
nervous system development (GO:0007399)	2081	565	317.88	+	1.78	1.26E-34	1.97E-30
cell morphogenesis involved in differentiation (GO:0000904)	535	145	81.72	+	1.77	3.69E-09	5.07E-07
regulation of cell projection organization (GO:0031344)	639	173	97.61	+	1.77	1.32E-10	2.33E-08
regulation of endocytosis (GO:0030100)	207	56	31.62	+	1.77	3.21E-04	1.36E-02
regulation of hormone secretion (GO:0046883)	238	64	36.35	+	1.76	1.12E-04	5.69E-03
positive regulation of neurogenesis (GO:0050769)	220	59	33.61	+	1.76	2.43E-04	1.08E-02
protein homooligomerization (GO:0051260)	195	52	29.79	+	1.75	6.27E-04	2.32E-02
regulation of metal ion transport (GO:0010959)	398	106	60.80	+	1.74	1.05E-06	9.23E-05
positive regulation of secretion (GO:0051047)	308	81	47.05	+	1.72	2.98E-05	1.74E-03
transmembrane transport (GO:0055085)	1204	315	183.91	+	1.71	6.70E-17	3.28E-14
ion transport (GO:0006811)	1188	307	181.47	+	1.69	5.94E-16	2.52E-13
regulation of cellular component size (GO:0032535)	363	93	55.45	+	1.68	1.87E-05	1.17E-03
negative regulation of transport (GO:0051051)	432	110	65.99	+	1.67	4.67E-06	3.54E-04
regulation of transport (GO:0051049)	1742	441	266.09	+	1.66	2.06E-21	1.46E-18
plasma membrane bounded cell projection organization (GO:0120036)	1082	273	165.28	+	1.65	3.73E-13	1.06E-10
developmental maturation (GO:0021700)	254	64	38.80	+	1.65	5.94E-04	2.23E-02
cell-cell adhesion (GO:0098609)	540	136	82.49	+	1.65	4.75E-07	4.62E-05
central nervous system development (GO:0007417)	1000	249	152.75	+	1.63	1.30E-11	2.79E-09
regulation of muscle system process (GO:0090257)	233	58	35.59	+	1.63	1.24E-03	4.08E-02
cell projection organization (GO:0030030)	1131	280	172.76	+	1.62	1.05E-12	2.73E-10
positive regulation of cell projection organization (GO:0031346)	340	84	51.94	+	1.62	1.57E-04	7.50E-03
positive regulation of cell development (GO:0010720)	296	73	45.21	+	1.61	4.61E-04	1.83E-02
regulation of cell development (GO:0060284)	496	122	75.76	+	1.61	5.81E-06	4.23E-04
secretion (GO:0046903)	497	122	75.92	+	1.61	5.91E-06	4.27E-04
protein complex oligomerization (GO:0051259)	254	62	38.80	+	1.60	1.42E-03	4.60E-02
regulation of anatomical structure size (GO:0090066)	497	121	75.92	+	1.59	7.92E-06	5.49E-04
sensory organ morphogenesis (GO:0090596)	273	66	41.70	+	1.58	1.19E-03	3.94E-02
cell development (GO:0048468)	1668	400	254.79	+	1.57	4.70E-16	2.05E-13

forebrain development (GO:0030900)	380	90	58.05	+	1.55	3.31E-04	1.39E-02
actin filament-based process (GO:0030029)	610	143	93.18	+	1.53	6.91E-06	4.90E-04
protein localization to membrane (GO:0072657)	442	103	67.52	+	1.53	1.97E-04	9.10E-03
regulation of hormone levels (GO:0010817)	507	117	77.44	+	1.51	9.44E-05	4.90E-03
regulation of supramolecular fiber organization (GO:1902903)	382	88	58.35	+	1.51	7.28E-04	2.65E-02
brain development (GO:0007420)	757	174	115.63	+	1.50	2.01E-06	1.68E-04
regulation of protein-containing complex assembly (GO:0043254)	410	94	62.63	+	1.50	5.33E-04	2.03E-02
regulation of localization (GO:0032879)	2762	632	421.90	+	1.50	1.21E-21	1.00E-18
supramolecular fiber organization (GO:0097435)	573	131	87.53	+	1.50	4.60E-05	2.58E-03
actin cytoskeleton organization (GO:0030036)	544	123	83.10	+	1.48	1.25E-04	6.25E-03
skeletal system development (GO:0001501)	509	115	77.75	+	1.48	2.01E-04	9.20E-03
head development (GO:0060322)	804	180	122.81	+	1.47	4.78E-06	3.60E-04
positive regulation of cellular component biogenesis (GO:0044089)	497	111	75.92	+	1.46	4.22E-04	1.71E-02
regulation of anatomical structure morphogenesis (GO:0022603)	928	207	141.75	+	1.46	1.17E-06	1.01E-04
regulation of cell growth (GO:0001558)	426	95	65.07	+	1.46	1.06E-03	3.66E-02
anion transport (GO:0006820)	455	101	69.50	+	1.45	9.59E-04	3.40E-02
localization within membrane (GO:0051668)	519	115	79.28	+	1.45	4.41E-04	1.77E-02
system development (GO:0048731)	3719	822	568.08	+	1.45	3.85E-25	1.00E-21
positive regulation of cellular component organization (GO:0051130)	1047	230	159.93	+	1.44	7.95E-07	7.16E-05
circulatory system process (GO:0003013)	495	108	75.61	+	1.43	9.91E-04	3.48E-02
negative regulation of cellular component organization (GO:0051129)	683	149	104.33	+	1.43	1.12E-04	5.70E-03
cell adhesion (GO:0007155)	964	210	147.25	+	1.43	4.13E-06	3.17E-04
regulation of locomotion (GO:0040012)	1021	222	155.96	+	1.42	2.15E-06	1.79E-04
regulation of cellular component movement (GO:0051270)	1052	228	160.69	+	1.42	1.95E-06	1.63E-04
positive regulation of transport (GO:0051050)	910	196	139.00	+	1.41	1.53E-05	9.89E-04
multicellular organism development (GO:0007275)	4129	887	630.71	+	1.41	4.71E-24	9.22E-21
regulation of growth (GO:0040008)	666	143	101.73	+	1.41	2.65E-04	1.15E-02
chemotaxis (GO:0006935)	513	110	78.36	+	1.40	1.48E-03	4.76E-02
sensory organ development (GO:0007423)	574	122	87.68	+	1.39	1.18E-03	3.93E-02
positive regulation of developmental process (GO:0051094)	1314	278	200.72	+	1.39	7.51E-07	6.84E-05
animal organ morphogenesis (GO:0009887)	988	209	150.92	+	1.38	2.12E-05	1.31E-03
regulation of cell migration (GO:0030334)	918	194	140.23	+	1.38	4.41E-05	2.49E-03
regulation of cell motility (GO:2000145)	976	206	149.09	+	1.38	2.79E-05	1.65E-03
anatomical structure morphogenesis (GO:0009653)	2185	458	333.76	+	1.37	2.24E-10	3.82E-08
regulation of cellular component biogenesis (GO:0044087)	957	200	146.18	+	1.37	6.10E-05	3.32E-03
positive regulation of cell differentiation (GO:0045597)	863	180	131.82	+	1.37	1.52E-04	7.38E-03
locomotion (GO:0040011)	1244	256	190.02	+	1.35	1.23E-05	8.12E-04
regulation of biological quality (GO:0065008)	3730	767	569.76	+	1.35	4.34E-16	1.94E-13
cellular developmental process (GO:0048869)	3440	706	525.47	+	1.34	1.59E-14	6.37E-12
cell differentiation (GO:0030154)	3418	701	522.10	+	1.34	2.44E-14	9.57E-12
movement of cell or subcellular component (GO:0006928)	1480	303	226.07	+	1.34	2.69E-06	2.17E-04
anatomical structure development (GO:0048856)	5029	1029	768.19	+	1.34	2.80E-22	2.58E-19
regulation of cellular component organization (GO:0051128)	2345	478	358.20	+	1.33	2.59E-09	3.76E-07

regulation of multicellular organismal development (GO:2000026)	1356	276	207.13	+	1.33	1.11E-05	7.50E-04
regulation of multicellular organismal process (GO:0051239)	2721	552	415.64	+	1.33	1.89E-10	3.29E-08
regulation of cell communication (GO:0010646)	3342	676	510.50	+	1.32	9.65E-13	2.61E-10
regulation of signaling (GO:0023051)	3355	676	512.48	+	1.32	1.81E-12	4.58E-10
regulation of developmental process (GO:0050793)	2463	492	376.23	+	1.31	1.49E-08	1.89E-06
system process (GO:0003008)	2049	408	312.99	+	1.30	4.77E-07	4.59E-05
cellular response to endogenous stimulus (GO:0071495)	1078	214	164.67	+	1.30	4.53E-04	1.81E-02
positive regulation of signaling (GO:0023056)	1698	337	259.37	+	1.30	7.31E-06	5.14E-04
nervous system process (GO:0050877)	1440	285	219.96	+	1.30	4.91E-05	2.74E-03
positive regulation of cell communication (GO:0010647)	1693	335	258.61	+	1.30	9.76E-06	6.65E-04
regulation of cell differentiation (GO:0045595)	1568	310	239.51	+	1.29	2.39E-05	1.43E-03
developmental process (GO:0032502)	5561	1097	849.45	+	1.29	2.53E-19	1.58E-16
cytoskeleton organization (GO:0007010)	1217	240	185.90	+	1.29	2.79E-04	1.20E-02
transport (GO:0006810)	3800	740	580.46	+	1.27	4.66E-11	9.02E-09
response to endogenous stimulus (GO:0009719)	1337	257	204.23	+	1.26	6.55E-04	2.42E-02
establishment of localization (GO:0051234)	3957	759	604.44	+	1.26	3.10E-10	5.22E-08
multicellular organismal process (GO:0032501)	6472	1237	988.61	+	1.25	3.88E-18	1.96E-15
vesicle-mediated transport (GO:0016192)	1346	257	205.60	+	1.25	8.94E-04	3.20E-02
localization (GO:0051179)	5157	981	787.74	+	1.25	5.92E-13	1.63E-10
signaling (GO:0023052)	5163	980	788.66	+	1.24	9.74E-13	2.59E-10
positive regulation of molecular function (GO:0044093)	1569	297	239.67	+	1.24	5.54E-04	2.10E-02
animal organ development (GO:0048513)	3179	601	485.60	+	1.24	2.86E-07	2.88E-05
cell communication (GO:0007154)	5266	991	804.39	+	1.23	4.59E-12	1.09E-09
tissue development (GO:0009888)	1687	312	257.69	+	1.21	1.51E-03	4.82E-02
regulation of signal transduction (GO:0009966)	2975	547	454.44	+	1.20	2.32E-05	1.40E-03
regulation of molecular function (GO:0065009)	3079	558	470.32	+	1.19	7.42E-05	3.92E-03
signal transduction (GO:0007165)	4820	848	736.26	+	1.15	1.78E-05	1.12E-03
cellular component organization (GO:0016043)	5459	928	833.87	+	1.11	4.70E-04	1.86E-02
positive regulation of cellular process (GO:0048522)	5740	967	876.79	+	1.10	9.80E-04	3.45E-02
regulation of cellular process (GO:0050794)	11275	1899	1722.27	+	1.10	3.27E-09	4.62E-07
regulation of biological process (GO:0050789)	11735	1968	1792.54	+	1.10	3.33E-09	4.66E-07
biological regulation (GO:0065007)	12469	2085	1904.66	+	1.09	6.54E-10	1.06E-07
cellular process (GO:0009987)	15176	2463	2318.16	+	1.06	2.54E-08	3.17E-06
biological_process (GO:0008150)	17859	2815	2727.99	+	1.03	1.22E-05	8.07E-04
regulation of cellular metabolic process (GO:0031323)	6040	833	922.62	-	.90	9.92E-04	3.47E-02
regulation of nitrogen compound metabolic process (GO:0051171)	5689	783	869.00	-	.90	1.26E-03	4.13E-02
regulation of macromolecule metabolic process (GO:0060255)	6190	846	945.53	-	.89	2.86E-04	1.23E-02
metabolic process (GO:0008152)	8019	1070	1224.91	-	.87	1.04E-07	1.13E-05
primary metabolic process (GO:0044238)	7091	943	1083.16	-	.87	7.87E-07	7.13E-05
regulation of gene expression (GO:0010468)	4833	642	738.25	-	.87	1.34E-04	6.65E-03
organic substance metabolic process (GO:0071704)	7577	1005	1157.40	-	.87	1.14E-07	1.22E-05
nitrogen compound metabolic process (GO:0006807)	6583	866	1005.56	-	.86	4.77E-07	4.61E-05
regulation of nucleobase-containing compound metabolic process (GO:0019219)	4059	532	620.02	-	.86	1.89E-04	8.83E-03

cellular metabolic process (GO:0044237)	7138	930	1090.34	-	.85	1.49E-08	1.89E-06
regulation of cellular biosynthetic process (GO:0031326)	4095	531	625.52	-	.85	6.62E-05	3.58E-03
regulation of biosynthetic process (GO:0009889)	4155	537	634.68	-	.85	3.92E-05	2.23E-03
regulation of macromolecule biosynthetic process (GO:0010556)	3932	508	600.62	-	.85	6.93E-05	3.68E-03
cellular macromolecule metabolic process (GO:0044260)	4236	540	647.06	-	.83	7.08E-06	5.00E-04
macromolecule metabolic process (GO:0043170)	5847	721	893.14	-	.81	9.87E-11	1.80E-08
response to stress (GO:0006950)	3400	418	519.35	-	.80	3.45E-06	2.73E-04
Unclassified (UNCLASSIFIED)	2730	330	417.01	-	.79	1.22E-05	8.11E-04
organonitrogen compound biosynthetic process (GO:1901566)	1331	156	203.31	-	.77	1.03E-03	3.58E-02
cell cycle (GO:0007049)	1224	141	186.97	-	.75	8.55E-04	3.07E-02
biosynthetic process (GO:0009058)	2390	274	365.08	-	.75	8.75E-07	7.84E-05
organic substance biosynthetic process (GO:1901576)	2325	264	355.15	-	.74	6.32E-07	5.93E-05
immune system process (GO:0002376)	2375	269	362.78	-	.74	3.64E-07	3.61E-05
defense response (GO:0006952)	1451	164	221.64	-	.74	1.03E-04	5.31E-03
cellular biosynthetic process (GO:0044249)	2255	246	344.45	-	.71	3.89E-08	4.62E-06
cellular response to stress (GO:0033554)	1554	162	237.38	-	.68	5.72E-07	5.44E-05
cellular amide metabolic process (GO:0043603)	803	83	122.66	-	.68	3.31E-04	1.39E-02
aromatic compound biosynthetic process (GO:0019438)	895	91	136.71	-	.67	8.12E-05	4.24E-03
organic cyclic compound biosynthetic process (GO:1901362)	1023	104	156.26	-	.67	2.26E-05	1.38E-03
biological process involved in interspecies interaction between organisms (GO:0044419)	1558	158	237.99	-	.66	9.61E-08	1.05E-05
response to biotic stimulus (GO:0009607)	1464	148	223.63	-	.66	2.15E-07	2.23E-05
response to external biotic stimulus (GO:0043207)	1403	141	214.31	-	.66	2.82E-07	2.85E-05
response to other organism (GO:0051707)	1400	140	213.85	-	.65	2.21E-07	2.28E-05
organic cyclic compound metabolic process (GO:1901360)	3076	293	469.86	-	.62	1.29E-18	6.75E-16
immune response (GO:0006955)	1606	152	245.32	-	.62	5.75E-10	9.39E-08
heterocycle biosynthetic process (GO:0018130)	885	83	135.19	-	.61	5.01E-06	3.76E-04
cellular nitrogen compound biosynthetic process (GO:0044271)	1381	128	210.95	-	.61	3.50E-09	4.85E-07
cellular nitrogen compound metabolic process (GO:0034641)	3354	310	512.33	-	.61	2.10E-22	2.06E-19
cellular aromatic compound metabolic process (GO:0006725)	2831	259	432.44	-	.60	2.36E-19	1.54E-16
nucleobase-containing compound biosynthetic process (GO:0034654)	813	73	124.19	-	.59	2.46E-06	2.01E-04
generation of precursor metabolites and energy (GO:0006091)	395	35	60.34	-	.58	1.18E-03	3.93E-02
chromosome organization (GO:0051276)	942	82	143.89	-	.57	9.12E-08	1.01E-05
defense response to other organism (GO:0098542)	1050	91	160.39	-	.57	1.48E-08	1.90E-06
heterocycle metabolic process (GO:0046483)	2778	238	424.34	-	.56	9.13E-23	1.02E-19
response to virus (GO:0009615)	353	30	53.92	-	.56	1.04E-03	3.61E-02
post-transcriptional regulation of gene expression (GO:0010608)	517	43	78.97	-	.54	3.79E-05	2.17E-03
amide biosynthetic process (GO:0043604)	520	43	79.43	-	.54	3.02E-05	1.76E-03
innate immune response (GO:0045087)	827	68	126.33	-	.54	6.64E-08	7.54E-06
macromolecule biosynthetic process (GO:0009059)	1291	106	197.20	-	.54	8.62E-12	1.90E-09
regulation of translation (GO:0006417)	402	33	61.41	-	.54	2.54E-04	1.11E-02
nucleobase-containing compound metabolic process (GO:0006139)	2610	213	398.68	-	.53	4.89E-24	8.51E-21
detection of stimulus involved in sensory perception (GO:0050906)	559	45	85.39	-	.53	6.26E-06	4.48E-04
cellular macromolecule biosynthetic process (GO:0034645)	764	61	116.70	-	.52	8.36E-08	9.35E-06

defense response to bacterium (GO:0042742)	365	29	55.75	-	.52	2.98E-04	1.27E-02
regulation of DNA metabolic process (GO:0051052)	538	42	82.18	-	.51	4.09E-06	3.17E-04
methylation (GO:0032259)	324	25	49.49	-	.51	4.31E-04	1.74E-02
RNA biosynthetic process (GO:0032774)	428	32	65.38	-	.49	2.03E-05	1.26E-03
transcription, DNA-templated (GO:0006351)	417	31	63.70	-	.49	2.19E-05	1.35E-03
nucleic acid-templated transcription (GO:0097659)	418	31	63.85	-	.49	2.21E-05	1.36E-03
macromolecule methylation (GO:0043414)	275	20	42.01	-	.48	5.09E-04	1.98E-02
gene expression (GO:0010467)	2080	149	317.72	-	.47	4.21E-25	9.43E-22
energy derivation by oxidation of organic compounds (GO:0015980)	253	18	38.65	-	.47	7.84E-04	2.84E-02
mRNA processing (GO:0006397)	440	31	67.21	-	.46	3.72E-06	2.93E-04
transcription by RNA polymerase II (GO:0006366)	270	19	41.24	-	.46	4.35E-04	1.75E-02
cellular response to DNA damage stimulus (GO:0006974)	734	51	112.12	-	.45	8.14E-10	1.26E-07
mRNA metabolic process (GO:0016071)	598	41	91.35	-	.45	2.97E-08	3.66E-06
RNA metabolic process (GO:0016070)	1442	98	220.27	-	.44	4.14E-19	2.40E-16
antigen receptor-mediated signaling pathway (GO:0050851)	238	16	36.35	-	.44	5.25E-04	2.02E-02
nucleic acid metabolic process (GO:0090304)	2109	141	322.15	-	.44	7.82E-29	6.13E-25
DNA recombination (GO:0006310)	240	16	36.66	-	.44	3.98E-04	1.62E-02
detection of chemical stimulus (GO:0009593)	526	35	80.35	-	.44	9.48E-08	1.05E-05
chromosome segregation (GO:0007059)	286	19	43.69	-	.43	1.15E-04	5.83E-03
ribonucleoprotein complex subunit organization (GO:0071826)	196	13	29.94	-	.43	1.41E-03	4.57E-02
nuclear chromosome segregation (GO:0098813)	229	15	34.98	-	.43	5.69E-04	2.14E-02
nucleic acid phosphodiester bond hydrolysis (GO:0090305)	246	16	37.58	-	.43	2.31E-04	1.03E-02
double-strand break repair (GO:0006302)	201	13	30.70	-	.42	1.09E-03	3.71E-02
regulation of B cell activation (GO:0050864)	217	14	33.15	-	.42	5.87E-04	2.21E-02
RNA splicing (GO:0008380)	359	23	54.84	-	.42	6.05E-06	4.35E-04
protein-DNA complex subunit organization (GO:0071824)	250	16	38.19	-	.42	1.75E-04	8.29E-03
nucleocytoplasmic transport (GO:0006913)	238	15	36.35	-	.41	2.45E-04	1.09E-02
nuclear transport (GO:0051169)	238	15	36.35	-	.41	2.45E-04	1.08E-02
mRNA splicing, via spliceosome (GO:0000398)	239	15	36.51	-	.41	2.50E-04	1.10E-02
RNA splicing, via transesterification reactions with bulged adenosine as nucleophile (GO:0000377)	239	15	36.51	-	.41	2.50E-04	1.10E-02
RNA splicing, via transesterification reactions (GO:0000375)	243	15	37.12	-	.40	1.38E-04	6.83E-03
DNA repair (GO:0006281)	490	30	74.85	-	.40	2.99E-08	3.66E-06
leukocyte mediated immunity (GO:0002443)	295	18	45.06	-	.40	2.29E-05	1.39E-03
RNA processing (GO:0006396)	858	52	131.06	-	.40	6.45E-14	2.25E-11
adaptive immune response (GO:0002250)	652	39	99.59	-	.39	5.61E-11	1.06E-08
DNA metabolic process (GO:0006259)	794	47	121.28	-	.39	2.44E-13	7.36E-11
positive regulation of B cell activation (GO:0050871)	170	10	25.97	-	.39	1.24E-03	4.08E-02
cellular respiration (GO:0045333)	188	11	28.72	-	.38	6.87E-04	2.52E-02
tRNA metabolic process (GO:0006399)	190	11	29.02	-	.38	5.01E-04	1.96E-02
peptide metabolic process (GO:0006518)	538	31	82.18	-	.38	1.27E-09	1.91E-07
RNA modification (GO:0009451)	180	10	27.50	-	.36	5.14E-04	1.98E-02
RNA transport (GO:0050658)	169	9	25.81	-	.35	5.12E-04	1.99E-02
nucleic acid transport (GO:0050657)	169	9	25.81	-	.35	5.12E-04	1.98E-02

sensory perception of chemical stimulus (GO:0007606)	545	29	83.25	-	.35	8.52E-11	1.57E-08
RNA localization (GO:0006403)	188	10	28.72	-	.35	2.05E-04	9.35E-03
establishment of RNA localization (GO:0051236)	171	9	26.12	-	.34	3.75E-04	1.55E-02
defense response to virus (GO:0051607)	251	13	38.34	-	.34	9.94E-06	6.72E-04
defense response to symbiont (GO:0140546)	252	13	38.49	-	.34	9.94E-06	6.74E-04
ribonucleoprotein complex biogenesis (GO:0022613)	429	22	65.53	-	.34	4.05E-09	5.53E-07
aerobic respiration (GO:0009060)	158	8	24.13	-	.33	5.05E-04	1.97E-02
adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains (GO:0002460)	258	13	39.41	-	.33	5.35E-06	3.99E-04
ncRNA metabolic process (GO:0034660)	524	26	80.04	-	.32	3.20E-11	6.43E-09
negative regulation of DNA metabolic process (GO:0051053)	147	7	22.45	-	.31	4.90E-04	1.93E-02
B cell receptor signaling pathway (GO:0050853)	129	6	19.70	-	.30	1.26E-03	4.14E-02
rRNA processing (GO:0006364)	220	10	33.61	-	.30	8.82E-06	6.03E-04
detection of chemical stimulus involved in sensory perception (GO:0050907)	489	22	74.70	-	.29	1.40E-11	2.96E-09
ncRNA processing (GO:0034470)	404	18	61.71	-	.29	6.90E-10	1.10E-07
rRNA metabolic process (GO:0016072)	250	11	38.19	-	.29	1.35E-06	1.16E-04
mRNA transport (GO:0051028)	139	6	21.23	-	.28	4.81E-04	1.89E-02
sensory perception of smell (GO:0007608)	470	19	71.79	-	.26	2.83E-12	7.04E-10
lymphocyte mediated immunity (GO:0002449)	248	10	37.88	-	.26	6.61E-07	6.17E-05
nuclear export (GO:0051168)	130	5	19.86	-	.25	3.04E-04	1.29E-02
detection of chemical stimulus involved in sensory perception of smell (GO:0050911)	443	17	67.67	-	.25	4.42E-12	1.07E-09
phagocytosis, recognition (GO:0006910)	106	4	16.19	-	.25	1.06E-03	3.66E-02
peptide biosynthetic process (GO:0043043)	404	15	61.71	-	.24	1.74E-11	3.59E-09
regulation of DNA replication (GO:0006275)	137	5	20.93	-	.24	1.55E-04	7.43E-03
complement activation (GO:0006956)	139	5	21.23	-	.24	1.08E-04	5.53E-03
DNA-templated transcription, initiation (GO:0006352)	118	4	18.02	-	.22	3.92E-04	1.61E-02
ribosome biogenesis (GO:0042254)	296	10	45.21	-	.22	2.65E-09	3.81E-07
translation (GO:0006412)	377	12	57.59	-	.21	4.92E-12	1.15E-09
mitochondrial respiratory chain complex assembly (GO:0033108)	95	3	14.51	-	.21	1.39E-03	4.50E-02
telomere organization (GO:0032200)	102	3	15.58	-	.19	4.44E-04	1.77E-02
mitochondrial gene expression (GO:0140053)	139	4	21.23	-	.19	3.13E-05	1.81E-03
complement activation, classical pathway (GO:0006958)	123	3	18.79	-	.16	5.21E-05	2.89E-03
transcription initiation from RNA polymerase II promoter (GO:0006367)	84	2	12.83	-	.16	1.11E-03	3.78E-02
humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin (GO:0002455)	127	3	19.40	-	.15	2.31E-05	1.40E-03
DNA replication (GO:0006260)	219	5	33.45	-	.15	1.32E-08	1.71E-06
telomere maintenance (GO:0000723)	93	2	14.21	-	.14	3.54E-04	1.47E-02
immunoglobulin mediated immune response (GO:0016064)	190	4	29.02	-	.14	5.53E-08	6.38E-06
B cell mediated immunity (GO:0019724)	194	4	29.63	-	.13	3.81E-08	4.56E-06
DNA-templated DNA replication (GO:0006261)	153	3	23.37	-	.13	1.16E-06	1.00E-04
immunoglobulin production (GO:0002377)	160	3	24.44	-	.12	3.55E-07	3.54E-05
mitochondrial translation (GO:0032543)	108	2	16.50	-	.12	5.14E-05	2.86E-03
production of molecular mediator of immune response (GO:0002440)	163	3	24.90	-	.12	3.82E-07	3.76E-05
cytoplasmic translation (GO:0002181)	124	2	18.94	-	.11	7.68E-06	5.35E-04

transcription preinitiation complex assembly (GO:0070897)	69	1	10.54	-	.09	1.11E-03	3.79E-02
ribosomal large subunit biogenesis (GO:0042273)	72	0	11.00	-	< 0.01	6.85E-05	3.65E-03

Tabla 3: Procesos biológicos enriquecidos a partir de genes que correlacionan negativamente con HOXD1 en pacientes con GBM (versión completa).

GO biological process complete	Homo sapiens - REFLIST (20589)	upload_1 (1734)	upload_1 (expected)	upload_1 (over/under)	upload_1 (fold Enrichment)	upload_1 (raw P-value)	upload_1 (FDR)
protein folding in endoplasmic reticulum (GO:0034975)	11	8	.93	+	8.64	4.53E-05	3.53E-03
peptidyl-lysine hydroxylation (GO:0017185)	9	6	.76	+	7.92	5.90E-04	2.82E-02
positive regulation of cerebellar granule cell precursor proliferation (GO:0021940)	9	6	.76	+	7.92	5.90E-04	2.81E-02
regulation of translational initiation in response to stress (GO:0043558)	10	6	.84	+	7.12	8.82E-04	3.80E-02
membrane protein ectodomain proteolysis (GO:0006509)	21	10	1.77	+	5.65	7.58E-05	5.37E-03
regulation of translation in response to stress (GO:0043555)	19	9	1.60	+	5.62	1.79E-04	1.11E-02
hippo signaling (GO:0035329)	20	8	1.68	+	4.75	9.90E-04	4.17E-02
negative regulation of stem cell differentiation (GO:2000737)	23	9	1.94	+	4.65	5.47E-04	2.66E-02
focal adhesion assembly (GO:0048041)	27	10	2.27	+	4.40	3.87E-04	2.02E-02
cytoplasmic pattern recognition receptor signaling pathway (GO:0002753)	27	10	2.27	+	4.40	3.87E-04	2.02E-02
positive regulation of blood vessel endothelial cell migration (GO:0043536)	54	19	4.55	+	4.18	2.03E-06	2.51E-04
positive regulation of smoothed signaling pathway (GO:0045880)	37	13	3.12	+	4.17	8.33E-05	5.72E-03
regulation of extracellular matrix organization (GO:1903053)	55	19	4.63	+	4.10	2.54E-06	2.97E-04
membrane protein proteolysis (GO:0033619)	35	12	2.95	+	4.07	1.87E-04	1.15E-02
cell-substrate junction assembly (GO:0007044)	36	12	3.03	+	3.96	2.32E-04	1.34E-02
cell-substrate junction organization (GO:0150115)	37	12	3.12	+	3.85	2.86E-04	1.59E-02
cellular response to vascular endothelial growth factor stimulus (GO:0035924)	45	14	3.79	+	3.69	1.32E-04	8.45E-03
regulation of miRNA transcription (GO:1902893)	62	19	5.22	+	3.64	1.06E-05	1.04E-03
positive regulation of miRNA transcription (GO:1902895)	46	14	3.87	+	3.61	1.59E-04	1.00E-02
positive regulation of neural precursor cell proliferation (GO:2000179)	53	16	4.46	+	3.58	6.02E-05	4.45E-03
proteoglycan biosynthetic process (GO:0030166)	53	16	4.46	+	3.58	6.02E-05	4.43E-03
positive regulation of osteoblast differentiation (GO:0045669)	68	20	5.73	+	3.49	1.04E-05	1.03E-03
viral gene expression (GO:0019080)	52	15	4.38	+	3.43	1.55E-04	9.78E-03
regulation of neural precursor cell proliferation (GO:2000177)	88	25	7.41	+	3.37	1.46E-06	1.92E-04
exocrine system development (GO:0035272)	43	12	3.62	+	3.31	8.81E-04	3.81E-02
retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to endoplasmic reticulum (GO:0006890)	51	14	4.30	+	3.26	3.89E-04	2.01E-02
regulation of osteoblast differentiation (GO:0045667)	126	34	10.61	+	3.20	5.82E-08	1.45E-05
regulation of blood vessel endothelial cell migration (GO:0043535)	91	24	7.66	+	3.13	6.90E-06	7.07E-04
regulation of interferon-beta production (GO:0032648)	58	15	4.88	+	3.07	4.19E-04	2.14E-02
endoplasmic reticulum unfolded protein response (GO:0030968)	55	14	4.63	+	3.02	7.36E-04	3.34E-02
cell-matrix adhesion (GO:0007160)	133	33	11.20	+	2.95	4.66E-07	7.45E-05
transforming growth factor beta receptor signaling pathway (GO:0007179)	89	22	7.50	+	2.94	3.82E-05	3.04E-03
collagen metabolic process (GO:0032963)	57	14	4.80	+	2.92	9.90E-04	4.15E-02
aminoglycan biosynthetic process (GO:0006023)	82	20	6.91	+	2.90	9.88E-05	6.65E-03
regulation of smoothed signaling pathway (GO:0008589)	84	20	7.07	+	2.83	1.31E-04	8.47E-03
skin epidermis development (GO:0098773)	85	20	7.16	+	2.79	1.50E-04	9.51E-03
hair follicle development (GO:0001942)	81	19	6.82	+	2.79	2.25E-04	1.32E-02
proteoglycan metabolic process (GO:0006029)	77	18	6.48	+	2.78	3.37E-04	1.81E-02
positive regulation of endothelial cell migration (GO:0010595)	107	25	9.01	+	2.77	2.63E-05	2.26E-03
cell-substrate adhesion (GO:0031589)	189	44	15.92	+	2.76	3.65E-08	1.00E-05
glycosaminoglycan biosynthetic process (GO:0006024)	78	18	6.57	+	2.74	3.85E-04	2.02E-02
regulation of stem cell differentiation (GO:2000736)	88	20	7.41	+	2.70	2.23E-04	1.32E-02
glycoprotein biosynthetic process (GO:0009101)	269	61	22.66	+	2.69	2.34E-10	1.60E-07
smoothed signaling pathway (GO:0007224)	75	17	6.32	+	2.69	6.58E-04	3.07E-02
protein O-linked glycosylation (GO:0006493)	89	20	7.50	+	2.67	3.99E-04	2.04E-02
hair cycle process (GO:0022405)	85	19	7.16	+	2.65	5.97E-04	2.83E-02
molting cycle process (GO:0022404)	85	19	7.16	+	2.65	5.97E-04	2.82E-02
endoplasmic reticulum to Golgi vesicle-mediated transport (GO:0006888)	130	29	10.95	+	2.65	1.57E-05	1.43E-03

ubiquitin-dependent ERAD pathway (GO:0030433)	81	18	6.82	+	2.64	8.94E-04	3.83E-02
cellular response to unfolded protein (GO:0034620)	81	18	6.82	+	2.64	8.94E-04	3.82E-02
positive regulation of epithelial cell migration (GO:0010634)	149	33	12.55	+	2.63	4.33E-06	4.71E-04
positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling (GO:0043123)	190	42	16.00	+	2.62	3.45E-07	5.76E-05
positive regulation of protein localization to nucleus (GO:1900182)	87	19	7.33	+	2.59	6.71E-04	3.12E-02
aminoglycan metabolic process (GO:0006022)	134	29	11.29	+	2.57	2.33E-05	2.03E-03
protein glycosylation (GO:0006486)	218	47	18.36	+	2.56	8.84E-08	2.04E-05
macromolecule glycosylation (GO:0043413)	218	47	18.36	+	2.56	8.84E-08	2.01E-05
glycosaminoglycan metabolic process (GO:0030203)	123	26	10.36	+	2.51	8.41E-05	5.76E-03
bone morphogenesis (GO:0060349)	101	21	8.51	+	2.47	4.95E-04	2.46E-02
nephron development (GO:0072006)	130	27	10.95	+	2.47	1.17E-04	7.65E-03
glycoprotein metabolic process (GO:0009100)	333	69	28.05	+	2.46	3.76E-10	2.36E-07
glycosylation (GO:0070085)	237	49	19.96	+	2.45	1.52E-07	3.05E-05
hair cycle (GO:0042633)	98	20	8.25	+	2.42	8.07E-04	3.59E-02
molting cycle (GO:0042303)	98	20	8.25	+	2.42	8.07E-04	3.58E-02
regulation of protein localization to nucleus (GO:1900180)	138	28	11.62	+	2.41	1.00E-04	6.71E-03
regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling (GO:0043122)	252	51	21.22	+	2.40	1.88E-07	3.55E-05
negative regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway (GO:0030512)	94	19	7.92	+	2.40	1.20E-03	4.96E-02
regulation of epithelial to mesenchymal transition (GO:0010717)	94	19	7.92	+	2.40	1.20E-03	4.94E-02
ERAD pathway (GO:0036503)	99	20	8.34	+	2.40	8.87E-04	3.81E-02
myeloid leukocyte differentiation (GO:0002573)	119	24	10.02	+	2.39	3.88E-04	2.01E-02
response to unfolded protein (GO:0006986)	124	25	10.44	+	2.39	2.79E-04	1.56E-02
cellular response to transforming growth factor beta stimulus (GO:0071560)	144	29	12.13	+	2.39	7.91E-05	5.53E-03
response to endoplasmic reticulum stress (GO:0034976)	220	44	18.53	+	2.37	1.31E-06	1.75E-04
neural tube development (GO:0021915)	160	32	13.48	+	2.37	3.52E-05	2.88E-03
kidney epithelium development (GO:0072073)	131	26	11.03	+	2.36	2.32E-04	1.34E-02
stem cell population maintenance (GO:0019827)	111	22	9.35	+	2.35	8.34E-04	3.65E-02
regulation of endothelial cell migration (GO:0010594)	169	33	14.23	+	2.32	4.94E-05	3.80E-03
maintenance of cell number (GO:0098727)	113	22	9.52	+	2.31	9.33E-04	3.96E-02
intracellular receptor signaling pathway (GO:0030522)	145	28	12.21	+	2.29	2.62E-04	1.47E-02
regulation of epithelial cell migration (GO:0010632)	228	44	19.20	+	2.29	3.26E-06	3.68E-04
response to transforming growth factor beta (GO:0071559)	151	29	12.72	+	2.28	1.97E-04	1.19E-02
osteoblast differentiation (GO:0001649)	136	26	11.45	+	2.27	5.27E-04	2.58E-02
branching morphogenesis of an epithelial tube (GO:0048754)	133	25	11.20	+	2.23	7.87E-04	3.53E-02
regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway (GO:0017015)	139	26	11.71	+	2.22	5.94E-04	2.82E-02
response to UV (GO:0009411)	150	28	12.63	+	2.22	3.36E-04	1.81E-02
respiratory tube development (GO:0030323)	179	33	15.08	+	2.19	1.36E-04	8.65E-03
positive regulation of angiogenesis (GO:0045766)	163	30	13.73	+	2.19	3.40E-04	1.82E-02
positive regulation of vasculature development (GO:1904018)	163	30	13.73	+	2.19	3.40E-04	1.81E-02
glial cell differentiation (GO:0010001)	169	31	14.23	+	2.18	2.55E-04	1.44E-02
regulation of cellular response to transforming growth factor beta stimulus (GO:1903844)	142	26	11.96	+	2.17	7.00E-04	3.22E-02
ossification (GO:0001503)	279	51	23.50	+	2.17	2.17E-06	2.62E-04
morphogenesis of embryonic epithelium (GO:0016331)	149	27	12.55	+	2.15	5.90E-04	2.83E-02
respiratory system development (GO:0060541)	199	36	16.76	+	2.15	1.09E-04	7.18E-03
cartilage development (GO:0051216)	161	29	13.56	+	2.14	5.19E-04	2.55E-02
response to topologically incorrect protein (GO:0035966)	145	26	12.21	+	2.13	8.49E-04	3.70E-02
gliogenesis (GO:0042063)	219	39	18.44	+	2.11	5.58E-05	4.18E-03
lung development (GO:0030324)	175	31	14.74	+	2.10	3.48E-04	1.85E-02
epithelial tube morphogenesis (GO:0060562)	311	55	26.19	+	2.10	2.53E-06	2.98E-04
transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway (GO:0007178)	187	33	15.75	+	2.10	3.08E-04	1.69E-02
regulation of Wnt signaling pathway (GO:0030111)	346	61	29.14	+	2.09	7.81E-07	1.14E-04
protein processing (GO:0016485)	194	34	16.34	+	2.08	2.46E-04	1.39E-02
gastrulation (GO:0007369)	162	28	13.64	+	2.05	9.46E-04	4.01E-02
defense response to virus (GO:0051607)	251	43	21.14	+	2.03	6.11E-05	4.48E-03
blood vessel morphogenesis (GO:0048514)	421	72	35.46	+	2.03	2.22E-07	4.04E-05
defense response to symbiont (GO:0140546)	252	43	21.22	+	2.03	6.38E-05	4.65E-03
response to virus (GO:0009615)	353	60	29.73	+	2.02	2.55E-06	2.97E-04
skeletal system morphogenesis (GO:0048705)	230	39	19.37	+	2.01	1.97E-04	1.18E-02
bone development (GO:0060348)	214	36	18.02	+	2.00	3.08E-04	1.68E-02
response to tumor necrosis factor (GO:0034612)	214	36	18.02	+	2.00	3.08E-04	1.68E-02
Golgi vesicle transport (GO:0048193)	293	49	24.68	+	1.99	3.62E-05	2.93E-03
cellular response to growth factor stimulus (GO:0071363)	457	76	38.49	+	1.97	2.67E-07	4.76E-05
viral process (GO:0016032)	259	43	21.81	+	1.97	1.22E-04	7.95E-03
protein folding (GO:0006457)	219	36	18.44	+	1.95	5.39E-04	2.62E-02
response to growth factor (GO:0070848)	487	80	41.02	+	1.95	1.76E-07	3.44E-05
vasculature development (GO:0001944)	530	87	44.64	+	1.95	6.42E-08	1.53E-05
regulation of cellular response to growth factor stimulus (GO:0090287)	311	51	26.19	+	1.95	3.91E-05	3.08E-03
tube morphogenesis (GO:0035239)	666	109	56.09	+	1.94	1.18E-09	5.98E-07
morphogenesis of an epithelium (GO:0002009)	453	73	38.15	+	1.91	1.31E-06	1.76E-04
protein maturation (GO:0051604)	262	42	22.07	+	1.90	3.12E-04	1.69E-02
angiogenesis (GO:0001525)	325	52	27.37	+	1.90	5.66E-05	4.23E-03
positive regulation of cell migration (GO:0030335)	526	84	44.30	+	1.90	3.05E-07	5.37E-05



regulation of canonical Wnt signaling pathway (GO:0060828)	270	43	22.74	+	1.89	2.57E-04	1.45E-02
cell fate commitment (GO:0045165)	245	39	20.63	+	1.89	4.79E-04	2.39E-02
circulatory system development (GO:0072359)	890	141	74.96	+	1.88	2.48E-11	2.59E-08
chordate embryonic development (GO:0043009)	644	102	54.24	+	1.88	1.87E-08	5.86E-06
kidney development (GO:0001822)	292	46	24.59	+	1.87	1.96E-04	1.18E-02
growth (GO:0040007)	377	59	31.75	+	1.86	2.75E-05	2.36E-03
developmental growth (GO:0048589)	377	59	31.75	+	1.86	2.75E-05	2.34E-03
embryo development ending in birth or egg hatching (GO:0009792)	665	104	56.01	+	1.86	2.99E-08	8.51E-06
blood vessel development (GO:0001568)	508	79	42.78	+	1.85	1.50E-06	1.95E-04
in utero embryonic development (GO:0001701)	388	60	32.68	+	1.84	3.45E-05	2.83E-03
positive regulation of cell motility (GO:2000147)	550	85	46.32	+	1.84	7.95E-07	1.15E-04
regulation of angiogenesis (GO:0045765)	285	44	24.00	+	1.83	3.78E-04	1.99E-02
tube development (GO:0035295)	864	133	72.77	+	1.83	6.63E-10	3.71E-07
regulation of transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway (GO:0090092)	273	42	22.99	+	1.83	6.09E-04	2.85E-02
carbohydrate derivative biosynthetic process (GO:1901137)	599	92	50.45	+	1.82	3.39E-07	5.77E-05
renal system development (GO:0072001)	301	46	25.35	+	1.81	3.59E-04	1.89E-02
negative regulation of cytokine production (GO:0001818)	282	43	23.75	+	1.81	5.34E-04	2.61E-02
positive regulation of cellular component movement (GO:0051272)	564	86	47.50	+	1.81	1.08E-06	1.48E-04
embryonic organ development (GO:0048568)	453	69	38.15	+	1.81	1.41E-05	1.31E-03
regulation of vasculature development (GO:1901342)	289	44	24.34	+	1.81	5.83E-04	2.80E-02
wound healing (GO:0042060)	335	51	28.21	+	1.81	2.32E-04	1.35E-02
positive regulation of locomotion (GO:0040017)	566	85	47.67	+	1.78	2.32E-06	2.78E-04
embryonic morphogenesis (GO:0048598)	586	88	49.35	+	1.78	1.64E-06	2.06E-04
tissue morphogenesis (GO:0048729)	560	84	47.16	+	1.78	2.96E-06	3.38E-04
extracellular matrix organization (GO:0030198)	294	44	24.76	+	1.78	6.77E-04	3.14E-02
extracellular structure organization (GO:0043062)	295	44	24.84	+	1.77	9.56E-04	4.04E-02
heart development (GO:0007507)	538	80	45.31	+	1.77	5.91E-06	6.18E-04
external encapsulating structure organization (GO:0045229)	297	44	25.01	+	1.76	9.90E-04	4.16E-02
enzyme-linked receptor protein signaling pathway (GO:0007167)	608	90	51.21	+	1.76	1.79E-06	2.22E-04
urogenital system development (GO:0001655)	339	50	28.55	+	1.75	5.18E-04	2.55E-02
positive regulation of cell adhesion (GO:0045785)	476	70	40.09	+	1.75	3.22E-05	2.66E-03
anatomical structure formation involved in morphogenesis (GO:0048646)	913	134	76.89	+	1.74	7.41E-09	2.77E-06
positive regulation of cell differentiation (GO:0045597)	863	126	72.68	+	1.73	2.61E-08	7.87E-06
skeletal system development (GO:0001501)	509	74	42.87	+	1.73	2.83E-05	2.40E-03
gland development (GO:0048732)	406	59	34.19	+	1.73	2.09E-04	1.25E-02
positive regulation of developmental process (GO:0051094)	1314	189	110.66	+	1.71	1.69E-11	2.04E-08
intracellular protein transport (GO:0006886)	666	95	56.09	+	1.69	4.62E-06	4.96E-04
transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway (GO:0007169)	408	58	34.36	+	1.69	4.23E-04	2.13E-02
regulation of response to biotic stimulus (GO:0002831)	374	53	31.50	+	1.68	6.80E-04	3.14E-02
regulation of cell motility (GO:2000145)	976	138	82.20	+	1.68	3.93E-08	1.06E-05
positive regulation of protein localization (GO:1903829)	461	65	38.83	+	1.67	1.91E-04	1.16E-02
immune system development (GO:0002520)	710	100	59.80	+	1.67	3.47E-06	3.89E-04
embryo development (GO:0009790)	1044	147	87.93	+	1.67	1.54E-08	5.03E-06
regulation of binding (GO:0051098)	371	52	31.25	+	1.66	9.16E-04	3.90E-02
carbohydrate derivative metabolic process (GO:1901135)	978	137	82.37	+	1.66	5.84E-08	1.43E-05
regulation of cell migration (GO:0030334)	918	128	77.31	+	1.66	2.24E-07	4.04E-05
hemopoiesis (GO:0030097)	617	86	51.96	+	1.66	2.91E-05	2.45E-03
regulation of cytokine production (GO:0001817)	737	102	62.07	+	1.64	6.82E-06	7.03E-04
response to wounding (GO:0009611)	441	61	37.14	+	1.64	5.03E-04	2.49E-02
regulation of locomotion (GO:0040012)	1021	140	85.99	+	1.63	1.40E-07	2.88E-05
regulation of cellular component movement (GO:0051270)	1052	144	88.60	+	1.63	1.11E-07	2.39E-05
protein transport (GO:0015031)	1159	158	97.61	+	1.62	2.86E-08	8.30E-06
negative regulation of intracellular signal transduction (GO:1902532)	514	70	43.29	+	1.62	2.90E-04	1.60E-02
cellular macromolecule biosynthetic process (GO:0034645)	764	104	64.34	+	1.62	9.67E-06	9.65E-04
response to cytokine (GO:0034097)	819	111	68.98	+	1.61	5.84E-06	6.14E-04
hematopoietic or lymphoid organ development (GO:0048534)	666	90	56.09	+	1.60	5.51E-05	4.15E-03
regulation of anatomical structure morphogenesis (GO:0022603)	928	125	78.16	+	1.60	1.59E-06	2.02E-04
animal organ morphogenesis (GO:0009887)	988	133	83.21	+	1.60	7.48E-07	1.12E-04
regulation of cell adhesion (GO:0030155)	773	104	65.10	+	1.60	1.45E-05	1.34E-03
establishment of protein localization (GO:0045184)	1248	167	105.11	+	1.59	3.42E-08	9.57E-06
cellular response to lipid (GO:0071396)	494	66	41.60	+	1.59	7.32E-04	3.34E-02
cell morphogenesis involved in differentiation (GO:0000904)	535	71	45.06	+	1.58	5.04E-04	2.49E-02
anatomical structure morphogenesis (GO:0009653)	2185	287	184.02	+	1.56	7.61E-13	1.08E-09
regulation of cell differentiation (GO:0045595)	1568	205	132.06	+	1.55	4.75E-09	1.96E-06
cellular protein localization (GO:0034613)	1344	175	113.19	+	1.55	9.38E-08	2.07E-05
cell morphogenesis (GO:0000902)	686	89	57.77	+	1.54	2.10E-04	1.25E-02
cellular macromolecule localization (GO:0070727)	1349	175	113.61	+	1.54	1.01E-07	2.21E-05
regulation of cellular localization (GO:0060341)	748	97	63.00	+	1.54	1.03E-04	6.88E-03
cell adhesion (GO:0007155)	964	125	81.19	+	1.54	9.37E-06	9.42E-04
negative regulation of gene expression (GO:0010629)	888	115	74.79	+	1.54	2.22E-05	1.95E-03
regulation of multicellular organismal development (GO:2000026)	1356	175	114.20	+	1.53	1.41E-07	2.88E-05
protein localization to organelle (GO:0033365)	667	86	56.17	+	1.53	3.00E-04	1.65E-02
regulation of cellular macromolecule biosynthetic process (GO:2000112)	551	71	46.41	+	1.53	1.04E-03	4.35E-02
positive regulation of multicellular organismal process (GO:0051240)	1491	191	125.57	+	1.52	5.89E-08	1.42E-05
epithelium development (GO:0060429)	1054	135	88.77	+	1.52	7.66E-06	7.75E-04

cellular response to endogenous stimulus (GO:0071495)	1078	138	90.79	+	1.52	5.70E-06	6.04E-04
regulation of developmental process (GO:0050793)	2463	315	207.43	+	1.52	8.53E-13	1.11E-09
cellular response to organic substance (GO:0071310)	2014	257	169.62	+	1.52	2.69E-10	1.75E-07
negative regulation of multicellular organismal process (GO:0051241)	1020	130	85.90	+	1.51	1.24E-05	1.19E-03
intracellular transport (GO:0046907)	1343	171	113.11	+	1.51	4.62E-07	7.54E-05
negative regulation of signal transduction (GO:0009968)	1265	161	106.54	+	1.51	1.08E-06	1.48E-04
protein localization (GO:0008104)	1880	239	158.33	+	1.51	1.57E-09	7.44E-07
negative regulation of cell population proliferation (GO:0008285)	711	90	59.88	+	1.50	4.47E-04	2.24E-02
positive regulation of transcription by RNA polymerase II (GO:0045944)	1251	158	105.36	+	1.50	2.07E-06	2.53E-04
positive regulation of signal transduction (GO:0009967)	1529	193	128.77	+	1.50	1.37E-07	2.86E-05
cell migration (GO:0016477)	873	110	73.52	+	1.50	9.19E-05	6.24E-03
negative regulation of programmed cell death (GO:0043069)	905	114	76.22	+	1.50	7.25E-05	5.19E-03
tissue development (GO:0009888)	1687	212	142.08	+	1.49	4.03E-08	1.07E-05
positive regulation of cell population proliferation (GO:0008284)	939	118	79.08	+	1.49	5.88E-05	4.37E-03
organonitrogen compound biosynthetic process (GO:1901566)	1331	167	112.10	+	1.49	1.48E-06	1.93E-04
negative regulation of cell differentiation (GO:0045596)	662	83	55.75	+	1.49	8.11E-04	3.59E-02
regulation of protein localization (GO:0032880)	847	106	71.33	+	1.49	1.56E-04	9.82E-03
cell death (GO:0008219)	984	123	82.87	+	1.48	5.19E-05	3.95E-03
positive regulation of cellular biosynthetic process (GO:0031328)	2024	252	170.46	+	1.48	3.04E-09	1.40E-06
regulation of cell population proliferation (GO:0042127)	1663	207	140.06	+	1.48	1.16E-07	2.45E-05
programmed cell death (GO:0012501)	949	118	79.92	+	1.48	8.29E-05	5.72E-03
negative regulation of developmental process (GO:0051093)	898	111	75.63	+	1.47	1.81E-04	1.12E-02
cellular response to stress (GO:0033554)	1554	192	130.88	+	1.47	5.73E-07	8.90E-05
negative regulation of cell death (GO:0060548)	1006	124	84.73	+	1.46	7.93E-05	5.52E-03
response to abiotic stimulus (GO:0009628)	1106	136	93.15	+	1.46	4.04E-05	3.17E-03
apoptotic process (GO:0006915)	903	111	76.05	+	1.46	2.37E-04	1.36E-02
negative regulation of apoptotic process (GO:0043066)	887	109	74.70	+	1.46	2.66E-04	1.49E-02
positive regulation of gene expression (GO:0010628)	1132	139	95.34	+	1.46	3.86E-05	3.06E-03
positive regulation of phosphorus metabolic process (GO:0010562)	904	111	76.13	+	1.46	2.39E-04	1.37E-02
positive regulation of phosphate metabolic process (GO:0045937)	904	111	76.13	+	1.46	2.39E-04	1.37E-02
cellular response to cytokine stimulus (GO:0071345)	725	89	61.06	+	1.46	1.04E-03	4.35E-02
regulation of hydrolase activity (GO:0051336)	1002	123	84.39	+	1.46	9.78E-05	6.61E-03
positive regulation of biosynthetic process (GO:0009891)	2062	253	173.66	+	1.46	1.06E-08	3.68E-06
response to endogenous stimulus (GO:0009719)	1337	164	112.60	+	1.46	6.53E-06	6.78E-04
positive regulation of macromolecule biosynthetic process (GO:0010557)	1920	235	161.70	+	1.45	4.33E-08	1.11E-05
positive regulation of signaling (GO:0023056)	1698	207	143.01	+	1.45	4.91E-07	7.77E-05
negative regulation of transcription by RNA polymerase II (GO:0000122)	969	118	81.61	+	1.45	1.93E-04	1.17E-02
positive regulation of RNA biosynthetic process (GO:1902680)	1702	207	143.34	+	1.44	5.12E-07	8.02E-05
positive regulation of nucleic acid-templated transcription (GO:1903508)	1696	206	142.84	+	1.44	6.15E-07	9.45E-05
positive regulation of transcription, DNA-templated (GO:0045893)	1696	206	142.84	+	1.44	6.15E-07	9.36E-05
response to nitrogen compound (GO:1901698)	1046	127	88.09	+	1.44	1.32E-04	8.42E-03
peptidyl-amino acid modification (GO:0018193)	890	108	74.96	+	1.44	4.31E-04	2.17E-02
regulation of multicellular organismal process (GO:0051239)	2721	330	229.16	+	1.44	1.00E-10	9.25E-08
negative regulation of signaling (GO:0023057)	1370	166	115.38	+	1.44	1.04E-05	1.03E-03
response to organic substance (GO:0010033)	2683	325	225.96	+	1.44	1.61E-10	1.33E-07
positive regulation of cell communication (GO:0010647)	1693	205	142.58	+	1.44	7.66E-07	1.13E-04
response to organonitrogen compound (GO:0010243)	950	115	80.01	+	1.44	3.30E-04	1.78E-02
negative regulation of cell communication (GO:0010648)	1364	165	114.88	+	1.44	1.25E-05	1.19E-03
regulation of intracellular signal transduction (GO:1902531)	1704	206	143.51	+	1.44	8.18E-07	1.18E-04
regulation of signal transduction (GO:0009966)	2975	359	250.55	+	1.43	1.77E-11	1.98E-08
positive regulation of cellular protein metabolic process (GO:0032270)	1423	171	119.84	+	1.43	1.17E-05	1.14E-03
regulation of cellular catabolic process (GO:0031329)	866	104	72.93	+	1.43	7.26E-04	3.32E-02
positive regulation of RNA metabolic process (GO:0051254)	1828	219	153.95	+	1.42	7.25E-07	1.09E-04
positive regulation of intracellular signal transduction (GO:1902533)	988	118	83.21	+	1.42	4.23E-04	2.14E-02
macromolecule biosynthetic process (GO:0009059)	1291	154	108.73	+	1.42	4.62E-05	3.58E-03
cellular response to chemical stimulus (GO:0070887)	2599	308	218.89	+	1.41	4.88E-09	1.96E-06
positive regulation of nucleobase-containing compound metabolic process (GO:0045935)	2034	241	171.30	+	1.41	3.45E-07	5.81E-05
regulation of response to external stimulus (GO:0032101)	963	114	81.10	+	1.41	6.91E-04	3.18E-02
negative regulation of response to stimulus (GO:0048585)	1622	192	136.60	+	1.41	6.99E-06	7.11E-04
regulation of phosphorus metabolic process (GO:0051174)	1403	166	118.16	+	1.40	3.78E-05	3.04E-03
regulation of programmed cell death (GO:0043067)	1484	175	124.98	+	1.40	2.59E-05	2.24E-03
positive regulation of protein metabolic process (GO:0051247)	1510	178	127.17	+	1.40	2.00E-05	1.79E-03
regulation of phosphate metabolic process (GO:0019220)	1401	165	117.99	+	1.40	4.64E-05	3.58E-03
positive regulation of cellular component organization (GO:0051130)	1047	123	88.18	+	1.39	5.99E-04	2.82E-02
regulation of phosphorylation (GO:0042325)	1255	147	105.70	+	1.39	1.63E-04	1.02E-02
macromolecule localization (GO:0033036)	2302	269	193.87	+	1.39	1.77E-07	3.43E-05
regulation of apoptotic process (GO:0042981)	1456	170	122.62	+	1.39	5.14E-05	3.93E-03
cell projection organization (GO:0030030)	1131	132	95.25	+	1.39	4.22E-04	2.14E-02
nitrogen compound transport (GO:0071705)	1560	182	131.38	+	1.39	3.18E-05	2.64E-03
regulation of signaling (GO:0023051)	3355	391	282.56	+	1.38	1.17E-10	1.02E-07
regulation of response to stress (GO:0080134)	1374	160	115.72	+	1.38	1.11E-04	7.31E-03
regulation of protein phosphorylation (GO:0001932)	1108	129	93.32	+	1.38	5.58E-04	2.69E-02
positive regulation of protein modification process (GO:0031401)	1015	118	85.48	+	1.38	1.13E-03	4.70E-02
regulation of cell communication (GO:0010646)	3342	388	281.46	+	1.38	2.12E-10	1.66E-07
intracellular signal transduction (GO:0035556)	1475	171	124.22	+	1.38	6.94E-05	5.01E-03

positive regulation of cellular metabolic process (GO:0031325)	3329	384	280.37	+	1.37	5.84E-10	3.39E-07
regulation of cell death (GO:0010941)	1631	188	137.36	+	1.37	3.79E-05	3.03E-03
cellular localization (GO:0051641)	2260	260	190.34	+	1.37	1.10E-06	1.49E-04
regulation of cellular protein metabolic process (GO:0032268)	2409	277	202.89	+	1.37	4.48E-07	7.39E-05
locomotion (GO:0040011)	1244	143	104.77	+	1.36	4.19E-04	2.13E-02
positive regulation of nitrogen compound metabolic process (GO:0051173)	3142	361	264.62	+	1.36	3.78E-09	1.64E-06
regulation of protein modification process (GO:0031399)	1558	179	131.21	+	1.36	7.08E-05	5.09E-03
positive regulation of response to stimulus (GO:0048584)	2213	254	186.38	+	1.36	1.62E-06	2.05E-04
positive regulation of molecular function (GO:0044093)	1569	179	132.14	+	1.35	1.08E-04	7.19E-03
establishment of localization in cell (GO:0051649)	1631	186	137.36	+	1.35	8.10E-05	5.62E-03
positive regulation of macromolecule metabolic process (GO:0010604)	3507	399	295.36	+	1.35	1.27E-09	6.23E-07
negative regulation of macromolecule biosynthetic process (GO:0010558)	1522	172	128.18	+	1.34	2.25E-04	1.32E-02
biosynthetic process (GO:0009058)	2390	270	201.29	+	1.34	2.38E-06	2.82E-04
regulation of protein metabolic process (GO:0051246)	2577	291	217.03	+	1.34	9.30E-07	1.30E-04
positive regulation of cellular process (GO:0048522)	5740	648	483.42	+	1.34	2.66E-16	4.16E-12
negative regulation of transcription, DNA-templated (GO:0045892)	1313	148	110.58	+	1.34	8.26E-04	3.64E-02
negative regulation of nucleic acid-templated transcription (GO:1903507)	1315	148	110.75	+	1.34	8.33E-04	3.66E-02
negative regulation of biosynthetic process (GO:0009890)	1610	181	135.59	+	1.33	1.89E-04	1.16E-02
positive regulation of metabolic process (GO:0009893)	3816	429	321.38	+	1.33	8.70E-10	4.54E-07
negative regulation of RNA biosynthetic process (GO:1902679)	1317	148	110.92	+	1.33	8.43E-04	3.68E-02
regulation of response to stimulus (GO:0048583)	4001	448	336.96	+	1.33	5.22E-10	3.15E-07
negative regulation of cellular biosynthetic process (GO:0031327)	1581	177	133.15	+	1.33	2.87E-04	1.59E-02
cellular biosynthetic process (GO:0044249)	2255	252	189.92	+	1.33	1.27E-05	1.21E-03
regulation of immune system process (GO:0002682)	1500	167	126.33	+	1.32	6.00E-04	2.82E-02
negative regulation of macromolecule metabolic process (GO:0010605)	2751	306	231.69	+	1.32	1.50E-06	1.93E-04
animal organ development (GO:0048513)	3179	353	267.73	+	1.32	1.81E-07	3.46E-05
organic substance biosynthetic process (GO:1901576)	2325	258	195.81	+	1.32	1.39E-05	1.30E-03
response to stress (GO:0006950)	3400	376	286.35	+	1.31	8.94E-08	2.00E-05
positive regulation of biological process (GO:0048518)	6255	691	526.79	+	1.31	1.08E-15	8.50E-12
negative regulation of nitrogen compound metabolic process (GO:0051172)	2399	265	202.04	+	1.31	1.51E-05	1.38E-03
response to oxygen-containing compound (GO:1901700)	1524	168	128.35	+	1.31	7.86E-04	3.54E-02
negative regulation of cellular metabolic process (GO:0031324)	2539	279	213.83	+	1.30	1.21E-05	1.17E-03
organic substance transport (GO:0071702)	1928	211	162.38	+	1.30	2.15E-04	1.28E-02
negative regulation of cellular process (GO:0048523)	4867	531	409.90	+	1.30	2.14E-10	1.60E-07
negative regulation of metabolic process (GO:0009892)	2968	323	249.96	+	1.29	3.73E-06	4.12E-04
cellular protein modification process (GO:0006464)	2725	296	229.50	+	1.29	1.33E-05	1.25E-03
protein modification process (GO:0036211)	2725	296	229.50	+	1.29	1.33E-05	1.24E-03
protein metabolic process (GO:0019538)	3953	428	332.92	+	1.29	8.24E-08	1.93E-05
cellular protein metabolic process (GO:0044267)	3349	361	282.05	+	1.28	2.10E-06	2.55E-04
negative regulation of biological process (GO:0048519)	5288	569	445.35	+	1.28	2.17E-10	1.54E-07
phosphorus metabolic process (GO:0006793)	1878	202	158.16	+	1.28	7.79E-04	3.52E-02
regulation of cellular component organization (GO:0051128)	2345	252	197.50	+	1.28	1.31E-04	8.44E-03
response to external stimulus (GO:0009605)	2422	260	203.98	+	1.27	1.17E-04	7.67E-03
phosphate-containing compound metabolic process (GO:0006796)	1854	199	156.14	+	1.27	8.54E-04	3.71E-02
macromolecule modification (GO:0043412)	2948	316	248.28	+	1.27	1.80E-05	1.63E-03
multicellular organism development (GO:0007275)	4129	441	347.74	+	1.27	2.18E-07	4.02E-05
cellular developmental process (GO:0048869)	3440	367	289.72	+	1.27	3.72E-06	4.14E-04
cell differentiation (GO:0030154)	3418	364	287.86	+	1.26	4.85E-06	5.17E-04
cellular macromolecule metabolic process (GO:0044260)	4236	449	356.75	+	1.26	3.32E-07	5.73E-05
system development (GO:0048731)	3719	394	313.21	+	1.26	2.83E-06	3.26E-04
regulation of molecular function (GO:0065009)	3079	326	259.31	+	1.26	2.95E-05	2.47E-03
regulation of catalytic activity (GO:0050790)	2364	250	199.10	+	1.26	3.95E-04	2.03E-02
regulation of cellular biosynthetic process (GO:0031326)	4095	433	344.88	+	1.26	8.64E-07	1.22E-04
regulation of biosynthetic process (GO:0009889)	4155	438	349.93	+	1.25	9.88E-07	1.37E-04
regulation of transcription by RNA polymerase II (GO:0006357)	2619	276	220.57	+	1.25	2.25E-04	1.32E-02
organonitrogen compound metabolic process (GO:1901564)	5000	526	421.10	+	1.25	4.16E-08	1.09E-05
regulation of localization (GO:0032879)	2762	290	232.61	+	1.25	1.75E-04	1.09E-02
regulation of cellular metabolic process (GO:0031323)	6040	633	508.69	+	1.24	7.49E-10	4.05E-07
regulation of macromolecule biosynthetic process (GO:0010556)	3932	412	331.15	+	1.24	4.52E-06	4.89E-04
regulation of gene expression (GO:0010468)	4833	506	407.03	+	1.24	1.74E-07	3.45E-05
regulation of primary metabolic process (GO:0080090)	5847	611	492.43	+	1.24	3.40E-09	1.52E-06
developmental process (GO:0032502)	5561	580	468.35	+	1.24	1.48E-08	4.94E-06
regulation of nitrogen compound metabolic process (GO:0051171)	5689	591	479.13	+	1.23	1.85E-08	5.91E-06
cellular component biogenesis (GO:0044085)	2630	272	221.50	+	1.23	7.09E-04	3.25E-02
anatomical structure development (GO:0048856)	5029	520	423.54	+	1.23	4.64E-07	7.50E-05
regulation of transcription, DNA-templated (GO:0006355)	3455	357	290.98	+	1.23	7.57E-05	5.39E-03
regulation of RNA biosynthetic process (GO:2001141)	3465	358	291.82	+	1.23	7.69E-05	5.41E-03
regulation of nucleic acid-templated transcription (GO:1903506)	3456	357	291.06	+	1.23	7.59E-05	5.36E-03
regulation of macromolecule metabolic process (GO:0060255)	6190	638	521.32	+	1.22	9.79E-09	3.49E-06
macromolecule metabolic process (GO:0043170)	5847	601	492.43	+	1.22	5.31E-08	1.34E-05
regulation of nucleobase-containing compound metabolic process (GO:0019219)	4059	417	341.85	+	1.22	2.14E-05	1.89E-03
regulation of RNA metabolic process (GO:0051252)	3753	385	316.08	+	1.22	6.50E-05	4.71E-03
response to chemical (GO:0042221)	4035	413	339.83	+	1.22	3.53E-05	2.87E-03

nitrogen compound metabolic process (GO:0006807)	6583	673	554.42	+	1.21	9.05E-09	3.30E-06
regulation of metabolic process (GO:0019222)	6720	686	565.96	+	1.21	6.75E-09	2.58E-06
localization (GO:0051179)	5157	524	434.32	+	1.21	3.23E-06	3.67E-04
primary metabolic process (GO:0044238)	7091	719	597.20	+	1.20	5.65E-09	2.22E-06
cellular metabolic process (GO:0044237)	7138	719	601.16	+	1.20	2.02E-08	6.21E-06
organic substance metabolic process (GO:0071704)	7577	758	638.13	+	1.19	1.46E-08	4.96E-06
metabolic process (GO:0008152)	8019	801	675.36	+	1.19	4.49E-09	1.90E-06
cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	5659	561	476.60	+	1.18	1.95E-05	1.76E-03
cellular response to stimulus (GO:0051716)	6479	631	545.66	+	1.16	3.14E-05	2.62E-03
cellular component organization (GO:0016043)	5459	531	459.76	+	1.15	2.43E-04	1.39E-02
regulation of biological process (GO:0050789)	11735	1099	988.32	+	1.11	2.11E-07	3.94E-05
cellular process (GO:0009987)	15176	1412	1278.12	+	1.10	3.87E-13	7.58E-10
regulation of cellular process (GO:0050794)	11275	1049	949.58	+	1.10	4.13E-06	4.52E-04
biological regulation (GO:0065007)	12469	1154	1050.14	+	1.10	8.34E-07	1.19E-04
biological_process (GO:0008150)	17859	1607	1504.08	+	1.07	4.02E-14	1.57E-10
system process (GO:0003008)	2049	128	172.57	-	.74	3.93E-04	2.03E-02
nervous system process (GO:0050877)	1440	77	121.28	-	.63	2.30E-05	2.01E-03
G protein-coupled receptor signaling pathway (GO:0007186)	1221	62	102.83	-	.60	2.09E-05	1.86E-03
adaptive immune response (GO:0002250)	652	31	54.91	-	.56	8.05E-04	3.59E-02
Unclassified (UNCLASSIFIED)	2730	127	229.92	-	.55	4.02E-14	2.10E-10
sensory perception (GO:0007600)	984	40	82.87	-	.48	3.30E-07	5.74E-05
detection of stimulus (GO:0051606)	685	20	57.69	-	.35	2.79E-08	8.24E-06
regulation of neurotransmitter levels (GO:0001505)	217	5	18.28	-	.27	8.82E-04	3.81E-02
protein-DNA complex subunit organization (GO:0071824)	250	5	21.05	-	.24	8.48E-05	5.78E-03
detection of stimulus involved in sensory perception (GO:0050906)	559	9	47.08	-	.19	5.73E-11	5.61E-08
protein-DNA complex assembly (GO:0065004)	212	3	17.85	-	.17	5.44E-05	4.12E-03
sensory perception of chemical stimulus (GO:0007606)	545	6	45.90	-	.13	7.44E-13	1.17E-09
B cell receptor signaling pathway (GO:0050853)	129	1	10.86	-	.09	7.37E-04	3.34E-02
detection of chemical stimulus (GO:0009593)	526	4	44.30	-	.09	5.51E-14	1.73E-10
sensory perception of smell (GO:0007608)	470	3	39.58	-	.08	4.18E-13	7.28E-10
detection of chemical stimulus involved in sensory perception (GO:0050907)	489	3	41.18	-	.07	8.60E-14	2.25E-10
detection of chemical stimulus involved in sensory perception of smell (GO:0050911)	443	2	37.31	-	.05	2.73E-13	6.11E-10
phagocytosis, recognition (GO:0006910)	106	0	8.93	-	< 0.01	3.57E-04	1.89E-02
purine ribonucleoside triphosphate biosynthetic process (GO:0009206)	96	0	8.09	-	< 0.01	8.03E-04	3.60E-02
ribonucleoside triphosphate biosynthetic process (GO:0009201)	102	0	8.59	-	< 0.01	5.50E-04	2.66E-02
purine nucleoside triphosphate biosynthetic process (GO:0009145)	97	0	8.17	-	< 0.01	8.24E-04	3.64E-02

## BIBLIOGRAFÍA

- Abate-Shen, C. (2002). Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nat Rev Cancer*, 2(10), 777-785. <https://doi.org/10.1038/nrc907>
- Abdel-Fattah, R., Xiao, A., Bomgardner, D., Pease, C. S., Lopes, M. B., & Hussaini, I. M. (2006). Differential expression of HOX genes in neoplastic and non-neoplastic human astrocytes. *J Pathol*, 209(1), 15-24. <https://doi.org/10.1002/path.1939>
- Agnihotri, S., Burrell, K. E., Wolf, A., Jalali, S., Hawkins, C., Rutka, J. T., & Zadeh, G. (2013). Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 61(1), 25-41. <https://doi.org/10.1007/s00005-012-0203-0>
- Al-Allaf, F. A., Tolmachov, O. E., Zambetti, L. P., Tchetchelnitski, V., & Mehmet, H. (2013). Remarkable stability of an instability-prone lentiviral vector plasmid in Escherichia coli Stbl3. *3 Biotech*, 3(1), 61-70. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0070-8>
- Ali Syeda, Z., Langden, S. S. S., Munkhzul, C., Lee, M., & Song, S. J. (2020). Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer. *Int J Mol Sci*, 21(5). <https://doi.org/10.3390/ijms21051723>
- Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F. D., Gygi, S. P., & Bartel, D. P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 455(7209), 64-71. <https://doi.org/10.1038/nature07242>
- Bailey, J. M., Creamer, B. A., & Hollingsworth, M. A. (2009). What a fish can learn from a mouse: principles and strategies for modeling human cancer in mice. *Zebrafish*, 6(4), 329-337. <https://doi.org/10.1089/zeb.2009.0626>
- Balss, J., Meyer, J., Mueller, W., Korshunov, A., Hartmann, C., & von Deimling, A. (2008). Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol*, 116(6), 597-602. <https://doi.org/10.1007/s00401-008-0455-2>
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215-233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
- Bartel, D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, 173(1), 20-51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>
- Battle, E., & Clevers, H. (2017). Cancer stem cells revisited. *Nat Med*, 23(10), 1124-1134. <https://doi.org/10.1038/nm.4409>
- Beier, D., Schriefer, B., Brawanski, K., Hau, P., Weis, J., Schulz, J. B., & Beier, C. P. (2012). Efficacy of clinically relevant temozolomide dosing schemes in glioblastoma cancer stem cell lines. *J Neurooncol*, 109(1), 45-52. <https://doi.org/10.1007/s11060-012-0878-4>
- Ben-Porath, I., Thomson, M. W., Carey, V. J., Ge, R., Bell, G. W., Regev, A., &

- Weinberg, R. A. (2008). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet*, *40*(5), 499-507. <https://doi.org/10.1038/ng.127>
- Bhatlekar, S., Fields, J. Z., & Boman, B. M. (2014). HOX genes and their role in the development of human cancers. *J Mol Med (Berl)*, *92*(8), 811-823. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1181-y>
- Bhatlekar, S., Fields, J. Z., & Boman, B. M. (2018). Role of HOX Genes in Stem Cell Differentiation and Cancer. *Stem Cells Int*, *2018*, 3569493. <https://doi.org/10.1155/2018/3569493>
- Bohnsack, M. T., Czaplinski, K., & Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna*, *10*(2), 185-191. <https://doi.org/10.1261/rna.5167604>
- Boisselier, B., Dugay, F., Belaud-Rotureau, M. A., Coutolleau, A., Garcion, E., Menei, P., Guardiola, P., & Rousseau, A. (2018). Whole genome duplication is an early event leading to aneuploidy in IDH-wild type glioblastoma. *Oncotarget*, *9*(89), 36017-36028. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26330>
- Bondos, S. E., Geraldo Mendes, G., & Jons, A. (2020). Chapter Six - Context-dependent HOX transcription factor function in health and disease. In V. N. Uversky (Ed.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 174, pp. 225-262). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2020.05.003>
- Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, *3*(7), 730-737. <https://doi.org/10.1038/nm0797-730>
- Booth, J., Nicolay, D. J., Doucette, J. R., & Nazarali, A. J. (2007). Hoxd1 is expressed by oligodendroglial cells and binds to a region of the human myelin oligodendrocyte glycoprotein promoter in vitro. *Cell Mol Neurobiol*, *27*(5), 641-650. <https://doi.org/10.1007/s10571-007-9150-4>
- Buccoliero, A. M., Castiglione, F., Degl'Innocenti, D. R., Ammanati, F., Giordano, F., Sanzo, M., Mussa, F., Genitori, L., & Taddei, G. L. (2009). Hox-D Genes Expression in Pediatric Low-grade Gliomas: Real-time-PCR Study. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *29*(1), 1-6. <https://doi.org/10.1007/s10571-008-9282-1>
- Buccoliero, A. M., Castiglione, F., Rossi Degl'Innocenti, D., Ammanati, F., Giordano, F., Sanzo, M., Mussa, F., Genitori, L., & Taddei, G. L. (2009). Hox-D genes expression in pediatric low-grade gliomas: real-time-PCR study. *Cell Mol Neurobiol*, *29*(1), 1-6. <https://doi.org/10.1007/s10571-008-9282-1>
- Caglar, H. O., & Duzgun, Z. (2023). Identification of upregulated genes in glioblastoma and glioblastoma cancer stem cells using bioinformatics analysis. *Gene*, *848*, 146895. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146895>
- Cairncross, J. G., Ueki, K., Zlatescu, M. C., Lisle, D. K., Finkelstein, D. M., Hammond, R. R., Silver, J. S., Stark, P. C., Macdonald, D. R., Ino, Y., Ramsay, D. A., & Louis, D. N. (1998). Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst*, *90*(19), 1473-1479. <https://doi.org/10.1093/jnci/90.19.1473>
- Campbell, L. L., & Polyak, K. (2007). Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells

- or clonal evolution? *Cell Cycle*, 6(19), 2332-2338. <https://doi.org/10.4161/cc.6.19.4914>
- Capper, D., Jones, D. T. W., Sill, M., Hovestadt, V., Schrimpf, D., Sturm, D., Koelsche, C., Sahm, F., Chavez, L., Reuss, D. E., Kratz, A., Wefers, A. K., Huang, K., Pajtler, K. W., Schweizer, L., Stichel, D., Olar, A., Engel, N. W., Lindenberg, K., . . . Pfister, S. M. (2018). DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature*, 555(7697), 469-474. <https://doi.org/10.1038/nature26000>
- Carrio, M., Arderiu, G., Myers, C., & Boudreau, N. J. (2005). Homeobox D10 induces phenotypic reversion of breast tumor cells in a three-dimensional culture model. *Cancer Res*, 65(16), 7177-7185. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-04-1717>
- Casas, B. S., Vitória, G., do Costa, M. N., Madeiro da Costa, R., Trindade, P., Maciel, R., Navarrete, N., Rehen, S. K., & Palma, V. (2018). hiPSC-derived neural stem cells from patients with schizophrenia induce an impaired angiogenesis. *Transl Psychiatry*, 8(1), 48. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0095-9>
- Ceccarelli, M., Barthel, F. P., Malta, T. M., Sabedot, T. S., Salama, S. R., Murray, B. A., Morozova, O., Newton, Y., Radenbaugh, A., Pagnotta, S. M., Anjum, S., Wang, J., Manyam, G., Zoppoli, P., Ling, S., Rao, A. A., Grifford, M., Cherniack, A. D., Zhang, H., . . . Verhaak, R. G. (2016). Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell*, 164(3), 550-563. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.028>
- Chakravadhanula, M., Ozols, V. V., Hampton, C. N., Zhou, L., Catchpoole, D., & Bhardwaj, R. D. (2014). Expression of the HOX genes and HOTAIR in atypical teratoid rhabdoid tumors and other pediatric brain tumors. *Cancer Genet*, 207(9), 425-428. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2014.05.014>
- Chen, D. Y., Liu, H., Takeda, S., Tu, H. C., Sasagawa, S., Van Tine, B. A., Lu, D., Cheng, E. H., & Hsieh, J. J. (2010). Taspase1 functions as a non-oncogene addiction protease that coordinates cancer cell proliferation and apoptosis. *Cancer Res*, 70(13), 5358-5367. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-10-0027>
- Chen, J., Li, Y., Yu, T.-S., McKay, R. M., Burns, D. K., Kernie, S. G., & Parada, L. F. (2012). A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*, 488(7412), 522-526. <https://doi.org/10.1038/nature11287>
- Chen, L., Boleslaw Olszewski, M., Kruithof-de Julio, M., & Snaar-Jagalska, B. E. (2020). Zebrafish Microenvironment Elevates EMT and CSC-Like Phenotype of Engrafted Prostate Cancer Cells. *Cells*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/cells9040797>
- Chen, L., Zhang, J., Han, L., Zhang, A., Zhang, C., Zheng, Y., Jiang, T., Pu, P., Jiang, C., & Kang, C. (2012). Downregulation of miR-221/222 sensitizes glioma cells to temozolomide by regulating apoptosis independently of p53 status. *Oncol Rep*, 27(3), 854-860. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1535>
- Chopra, V. S., & Mishra, R. K. (2006). "Mir"acles in hox gene regulation. *Bioessays*, 28(5), 445-448. <https://doi.org/10.1002/bies.20401>
- Clemenceau, A., Boucherat, O., Landry-Truchon, K., Lamontagne, M., Biardel, S.,

- Joubert, P., Gobeil, S., Secco, B., Laplante, M., Morissette, M., Obeidat, M., Timens, W., Jeannotte, L., & Bossé, Y. (2018). Lung cancer susceptibility genetic variants modulate HOXB2 expression in the lung. *Int J Dev Biol*, 62(11-12), 857-864. <https://doi.org/10.1387/ijdb.180210yb>
- Costa, B. M., Smith, J. S., Chen, Y., Chen, J., Phillips, H. S., Aldape, K. D., Zardo, G., Nigro, J., James, C. D., Fridlyand, J., Reis, R. M., & Costello, J. F. (2010). Reversing HOXA9 oncogene activation by PI3K inhibition: epigenetic mechanism and prognostic significance in human glioblastoma. *Cancer research*, 70(2), 453-462. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2189>
- Court, F., Le Boiteux, E., Fogli, A., Müller-Barthélémy, M., Vours-Barrière, C., Chautard, E., Pereira, B., Biau, J., Kemeny, J. L., Khalil, T., Karayan-Tapon, L., Verrelle, P., & Arnaud, P. (2019). Transcriptional alterations in glioma result primarily from DNA methylation-independent mechanisms. *Genome Res*, 29(10), 1605-1621. <https://doi.org/10.1101/gr.249219.119>
- Couturier, C. P., Ayyadhury, S., Le, P. U., Nadaf, J., Monlong, J., Riva, G., Allache, R., Baig, S., Yan, X., Bourgey, M., Lee, C., Wang, Y. C. D., Wee Yong, V., Guiot, M. C., Najafabadi, H., Misic, B., Antel, J., Bourque, G., Ragoussis, J., & Petrecca, K. (2020). Single-cell RNA-seq reveals that glioblastoma recapitulates a normal neurodevelopmental hierarchy. *Nat Commun*, 11(1), 3406. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17186-5>
- Cui, Y., Zhang, C., Li, Y., Ma, S., Cao, W., & Guan, F. (2021). HOXD1 functions as a novel tumor suppressor in kidney renal clear cell carcinoma. *Cell Biol Int*, 45(6), 1246-1259. <https://doi.org/10.1002/cbin.11568>
- da Silva-Diz, V., Lorenzo-Sanz, L., Bernat-Peguera, A., Lopez-Cerda, M., & Munoz, P. (2018). Cancer cell plasticity: Impact on tumor progression and therapy response. *Semin Cancer Biol*, 53, 48-58. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.08.009>
- Davis, H. E., Morgan, J. R., & Yarmush, M. L. (2002). Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophys Chem*, 97(2-3), 159-172. [https://doi.org/10.1016/s0301-4622\(02\)00057-1](https://doi.org/10.1016/s0301-4622(02)00057-1)
- Dell'Albani, P. (2008). Stem cell markers in gliomas. *Neurochem Res*, 33(12), 2407-2415. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9723-8>
- Dews, M., Fox, J. L., Hultine, S., Sundaram, P., Wang, W., Liu, Y. Y., Furth, E., Enders, G. H., El-Deiry, W., Schelter, J. M., Cleary, M. A., & Thomas-Tikhonenko, A. (2010). The myc-miR-17~92 axis blunts TGF{beta} signaling and production of multiple TGF{beta}-dependent antiangiogenic factors. *Cancer Res*, 70(20), 8233-8246. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-10-2412>
- Di Leva, G., Garofalo, M., & Croce, C. M. (2014). MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*, 9, 287-314. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104715>
- Diana, A., Gaido, G., & Murtas, D. (2019). MicroRNA Signature in Human Normal and Tumoral Neural Stem Cells. *Int J Mol Sci*, 20(17). <https://doi.org/10.3390/ijms20174123>
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97(6), 703-716. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80783-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80783-7)



- Donocoff, R. S., Teteloshvili, N., Chung, H., Shoulson, R., & Creusot, R. J. (2020). Optimization of tamoxifen-induced Cre activity and its effect on immune cell populations. *Sci Rep*, *10*(1), 15244. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72179-0>
- Duan, R., Han, L., Wang, Q., Wei, J., Chen, L., Zhang, J., Kang, C., & Wang, L. (2015). HOXA13 is a potential GBM diagnostic marker and promotes glioma invasion by activating the Wnt and TGF- $\beta$  pathways. *Oncotarget*, *6*(29), 27778-27793. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4813>
- Duboule, D. (2007). The rise and fall of Hox gene clusters. *Development*, *134*(14), 2549-2560. <https://doi.org/10.1242/dev.001065>
- Duboule, D., & Morata, G. (1994). Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet*, *10*(10), 358-364. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(94\)90132-5](https://doi.org/10.1016/0168-9525(94)90132-5)
- Eckel-Passow, J. E., Lachance, D. H., Molinaro, A. M., Walsh, K. M., Decker, P. A., Sicotte, H., Pekmezci, M., Rice, T., Kosel, M. L., Smirnov, I. V., Sarkar, G., Caron, A. A., Kollmeyer, T. M., Praska, C. E., Chada, A. R., Halder, C., Hansen, H. M., McCoy, L. S., Bracci, P. M., . . . Jenkins, R. B. (2015). Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N Engl J Med*, *372*(26), 2499-2508. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407279>
- Ehrlich, M. (2002). DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*, *21*(35), 5400-5413. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205651>
- Ehrlich, M., & Lacey, M. (2013). DNA methylation and differentiation: silencing, upregulation and modulation of gene expression. *Epigenomics*, *5*(5), 553-568. <https://doi.org/10.2217/epi.13.43>
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., & Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, *4*(11), 1313-1317. <https://doi.org/10.1038/3305>
- Esparza, R., Azad, T. D., Feroze, A. H., Mitra, S. S., & Cheshier, S. H. (2015). Glioblastoma stem cells and stem cell-targeting immunotherapies. *J Neurooncol*, *123*(3), 449-457. <https://doi.org/10.1007/s11060-015-1729-x>
- Fang, L., Xu, Y., & Zou, L. (2014). Overexpressed homeobox B9 regulates oncogenic activities by transforming growth factor- $\beta$ 1 in gliomas. *Biochem Biophys Res Commun*, *446*(1), 272-279. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.095>
- Fedele, M., Cerchia, L., Pegoraro, S., Sgarra, R., & Manfioletti, G. (2019). Proneural-Mesenchymal Transition: Phenotypic Plasticity to Acquire Multitherapy Resistance in Glioblastoma. *Int J Mol Sci*, *20*(11). <https://doi.org/10.3390/ijms20112746>
- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., & Chambon, P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun*, *237*(3), 752-757. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7124>
- Feinberg, A. P., & Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, *301*(5895), 89-92. <https://doi.org/10.1038/301089a0>
- Felker, A., Nieuwenhuize, S., Dolbois, A., Blazkova, K., Hess, C., Low, L. W., Burger, S., Samson, N., Carney, T. J., Bartunek, P., Nevado, C., & Mosimann, C.

- (2016). In Vivo Performance and Properties of Tamoxifen Metabolites for CreERT2 Control. *PLoS One*, 11(4), e0152989. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152989>
- Feng, Y., Zhang, T., Wang, Y., Xie, M., Ji, X., Luo, X., Huang, W., & Xia, L. (2021). Homeobox Genes in Cancers: From Carcinogenesis to Recent Therapeutic Intervention. *Front Oncol*, 11, 770428. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.770428>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Pineros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2018). *Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer <https://gco.iarc.fr/tomorrow>
- Figuroa, M. E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P. S., Patel, J., Shih, A., Li, Y., Bhagwat, N., Vasanthakumar, A., Fernandez, H. F., Tallman, M. S., Sun, Z., Wolniak, K., Peeters, J. K., Liu, W., Choe, S. E., Fantin, V. R., Paietta, E., Löwenberg, B., . . . Melnick, A. (2010). Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*, 18(6), 553-567. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.11.015>
- Fishman, M. C. (2001). Genomics. Zebrafish--the canonical vertebrate. *Science*, 294(5545), 1290-1291. <https://doi.org/10.1126/science.1066652>
- Freund, C. L., & McInnes, R. R. (1995). Guidebook to the Homeobox Genes. *American Journal of Human Genetics*, 57(3), 736-737. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1801285/>
- Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 19(1), 92-105. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>
- Gabriely, G., Yi, M., Narayan, R. S., Niers, J. M., Wurdinger, T., Imitola, J., Ligon, K. L., Kesari, S., Esau, C., Stephens, R. M., Tannous, B. A., & Krichevsky, A. M. (2011). Human glioma growth is controlled by microRNA-10b. *Cancer Res*, 71(10), 3563-3572. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-10-3568>
- Gage, F. H., Ray, J., & Fisher, L. J. (1995). Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci*, 18, 159-192. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.18.030195.001111>
- Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F., & Vescovi, A. (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*, 64(19), 7011-7021. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-04-1364>
- Gallo, M., Ho, J., Coutinho, F. J., Vanner, R., Lee, L., Head, R., Ling, E. K., Clarke, I. D., & Dirks, P. B. (2013). A tumorigenic MLL-homeobox network in human glioblastoma stem cells. *Cancer Res*, 73(1), 417-427. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-12-1881>
- Gangemi, R. M. R., Griffero, F., Marubbi, D., Perera, M., Capra, M. C., Malatesta, P., Ravetti, G. L., Zona, G. L., Daga, A., & Corte, G. (2009). SOX2 Silencing in Glioblastoma Tumor-Initiating Cells Causes Stop of Proliferation and Loss of Tumorigenicity. *Stem Cells*, 27(1), 40-48. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0493>
- Garcia-Fernandez, J. (2005). Hox, ParaHox, ProtoHox: facts and guesses. *Heredity*

- (*Edinb*), 94(2), 145-152. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800621>
- Garros-Regulez, L., Garcia, I., Carrasco-Garcia, E., Lantero, A., Aldaz, P., Moreno-Cugnon, L., Arrizabalaga, O., Undabeitia, J., Torres-Bayona, S., Villanua, J., Ruiz, I., Egaña, L., Sampron, N., & Matheu, A. (2016). Targeting SOX2 as a Therapeutic Strategy in Glioblastoma. *Front Oncol*, 6, 222. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00222>
- Gaur, A. B., Holbeck, S. L., Colburn, N. H., & Israel, M. A. (2011). Downregulation of Pcd4 by mir-21 facilitates glioblastoma proliferation in vivo. *Neuro Oncol*, 13(6), 580-590. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nor033>
- Gavalas, A., Ruhrberg, C., Livet, J., Henderson, C. E., & Krumlauf, R. (2003). Neuronal defects in the hindbrain of Hoxa1, Hoxb1 and Hoxb2 mutants reflect regulatory interactions among these Hox genes. *Development*, 130(23), 5663-5679. <https://doi.org/10.1242/dev.00802>
- Geiger, G. A., Fu, W., & Kao, G. D. (2008). Temozolomide-mediated radiosensitization of human glioma cells in a zebrafish embryonic system. *Cancer Res*, 68(9), 3396-3404. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-07-6396>
- Gonçalves, C. S., Le Boiteux, E., Arnaud, P., & Costa, B. M. (2020). HOX gene cluster (de)regulation in brain: from neurodevelopment to malignant glial tumours. *Cell Mol Life Sci*, 77(19), 3797-3821. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03508-9>
- Gordon, D. J., Resio, B., & Pellman, D. (2012). Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat Rev Genet*, 13(3), 189-203. <https://doi.org/10.1038/nrg3123>
- Gousias, K., Markou, M., Voulgaris, S., Goussia, A., Voulgari, P., Bai, M., Polyzoidis, K., Kyritsis, A., & Alamanos, Y. (2009). Descriptive epidemiology of cerebral gliomas in northwest Greece and study of potential predisposing factors, 2005-2007. *Neuroepidemiology*, 33(2), 89-95. <https://doi.org/10.1159/000222090>
- Gouti, M., & Gavalas, A. (2008). Hoxb1 controls cell fate specification and proliferative capacity of neural stem and progenitor cells. *Stem Cells*, 26(8), 1985-1997. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0182>
- Grier, D. G., Thompson, A., Kwasniewska, A., McGonigle, G. J., Halliday, H. L., & Lappin, T. R. (2005). The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J Pathol*, 205(2), 154-171. <https://doi.org/10.1002/path.1710>
- Gu, S., Jin, L., Zhang, F., Huang, Y., Grimm, D., Rossi, J. J., & Kay, M. A. (2011). Thermodynamic stability of small hairpin RNAs highly influences the loading process of different mammalian Argonautes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(22), 9208-9213. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018023108>
- Guo, L., Peng, Y., Sun, L., Han, X., Xu, J., & Mao, D. (2017). Ovarian cancer variant rs2072590 is associated with HOXD1 and HOXD3 gene expression. *Oncotarget*, 8(61), 103410-103414. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21902>
- Gupta, P. B., Pastushenko, I., Skibinski, A., Blanpain, C., & Kuperwasser, C. (2019). Phenotypic Plasticity: Driver of Cancer Initiation, Progression, and Therapy Resistance. *Cell Stem Cell*, 24(1), 65-78. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.11.011>

- Haldi, M., Ton, C., Seng, W. L., & McGrath, P. (2006). Human melanoma cells transplanted into zebrafish proliferate, migrate, produce melanin, form masses and stimulate angiogenesis in zebrafish. *Angiogenesis*, *9*(3), 139-151. <https://doi.org/10.1007/s10456-006-9040-2>
- Han, L., Liu, D., Li, Z., Tian, N., Han, Z., Wang, G., Fu, Y., Guo, Z., Zhu, Z., Du, C., & Tian, Y. (2015). HOXB1 Is a Tumor Suppressor Gene Regulated by miR-3175 in Glioma. *PLoS one*, *10*(11), e0142387-e0142387. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142387>
- Harris, W. J., Huang, X., Lynch, J. T., Spencer, G. J., Hitchin, J. R., Li, Y., Ciceri, F., Blaser, J. G., Greystoke, B. F., Jordan, A. M., Miller, C. J., Ogilvie, D. J., & Somerville, T. C. (2012). The histone demethylase KDM1A sustains the oncogenic potential of MLL-AF9 leukemia stem cells. *Cancer Cell*, *21*(4), 473-487. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.014>
- He, B., Zhao, Z., Cai, Q., Zhang, Y., Zhang, P., Shi, S., Xie, H., Peng, X., Yin, W., Tao, Y., & Wang, X. (2020). miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in Cancer. *Int J Biol Sci*, *16*(14), 2628-2647. <https://doi.org/10.7150/ijbs.47203>
- He, Q., Huang, W., Liu, D., Zhang, T., Wang, Y., Ji, X., Xie, M., Sun, M., Tian, D., Liu, M., & Xia, L. (2021). Homeobox B5 promotes metastasis and poor prognosis in Hepatocellular Carcinoma, via FGFR4 and CXCL1 upregulation. *Theranostics*, *11*(12), 5759-5777. <https://doi.org/10.7150/thno.57659>
- Hegi, M. E., Diserens, A. C., Godard, S., Dietrich, P. Y., Regli, L., Ostermann, S., Otten, P., Van Melle, G., de Tribolet, N., & Stupp, R. (2004). Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res*, *10*(6), 1871-1874. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-03-0384>
- Hegi, M. E., Diserens, A. C., Gorlia, T., Hamou, M. F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E., Hau, P., Mirimanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C., & Stupp, R. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*, *352*(10), 997-1003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043331>
- Hemmati, H. D., Nakano, I., Lazareff, J. A., Masterman-Smith, M., Geschwind, D. H., Bronner-Fraser, M., & Kornblum, H. I. (2003). Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(25), 15178-15183. <https://doi.org/10.1073/pnas.2036535100>
- Hirabayashi, Y., & Gotoh, Y. (2010). Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. *Nat Rev Neurosci*, *11*(6), 377-388. <https://doi.org/10.1038/nrn2810>
- Hombria, J. C., & Lovegrove, B. (2003). Beyond homeosis--HOX function in morphogenesis and organogenesis. *Differentiation*, *71*(8), 461-476. <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2003.7108004.x>
- Hu, X., Chen, D., Cui, Y., Li, Z., & Huang, J. (2013). Targeting microRNA-23a to inhibit glioma cell invasion via HOXD10. *Sci Rep*, *3*, 3423. <https://doi.org/10.1038/srep03423>
- Huang, T., Chen, Y., Zeng, Y., Xu, C., Huang, J., Hu, W., Chen, X., & Fu, H. (2021). Long non-coding RNA PSMA3-AS1 promotes glioma progression through

- modulating the miR-411-3p/HOXA10 pathway. *BMC Cancer*, 21(1), 844. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08465-5>
- Huse, J. T., Phillips, H. S., & Brennan, C. W. (2011). Molecular subclassification of diffuse gliomas: seeing order in the chaos. *Glia*, 59(8), 1190-1199. <https://doi.org/10.1002/glia.21165>
- Hutlet, B., Theys, N., Coste, C., Ahn, M. T., Doshishti-Agolli, K., Lizen, B., & Gofflot, F. (2016). Systematic expression analysis of Hox genes at adulthood reveals novel patterns in the central nervous system. *Brain Struct Funct*, 221(3), 1223-1243. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0965-8>
- Idaikkadar, P., Morgan, R., & Michael, A. (2019). HOX Genes in High Grade Ovarian Cancer. *Cancers*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/cancers11081107>
- Ignatova, T. N., Kukekov, V. G., Laywell, E. D., Suslov, O. N., Vrionis, F. D., & Steindler, D. A. (2002). Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia*, 39(3), 193-206. <https://doi.org/10.1002/glia.10094>
- Isaev, K., Jiang, L., Wu, S., Lee, C. A., Watters, V., Fort, V., Tsai, R., Coutinho, F. J., Hussein, S. M. I., Zhang, J., Wu, J., Dirks, P. B., Schramek, D., & Reimand, J. (2021). Pan-cancer analysis of non-coding transcripts reveals the prognostic onco-lncRNA HOXA10-AS in gliomas. *Cell Rep*, 37(3), 109873. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109873>
- Jesuthasan, S. (2002). Genetics and development. Zebrafish in the spotlight. *Science*, 297(5586), 1484-1485. <https://doi.org/10.1126/science.1076115>
- Jia, Z., Wang, K., Zhang, A., Wang, G., Kang, C., Han, L., & Pu, P. (2013). miR-19a and miR-19b overexpression in gliomas. *Pathol Oncol Res*, 19(4), 847-853. <https://doi.org/10.1007/s12253-013-9653-x>
- Johnson, S., Chen, H., & Lo, P. K. (2013). In vitro Tumorsphere Formation Assays. *Bio Protoc*, 3(3). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.325>
- Jurcic, J. G., Soignet, S. L., & Maslak, A. P. (2007). Diagnosis and treatment of acute promyelocytic leukemia. *Curr Oncol Rep*, 9(5), 337-344. <https://doi.org/10.1007/s11912-007-0045-9>
- Kalidasan, V., Ng, W. H., Ishola, O. A., Ravichantar, N., Tan, J. J., & Das, K. T. (2021). A guide in lentiviral vector production for hard-to-transfect cells, using cardiac-derived c-kit expressing cells as a model system. *Sci Rep*, 11(1), 19265. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98657-7>
- Kang, M. K., & Kang, S. K. (2007). Tumorigenesis of chemotherapeutic drug-resistant cancer stem-like cells in brain glioma. *Stem Cells Dev*, 16(5), 837-847. <https://doi.org/10.1089/scd.2007.0006>
- Kelly, Z., Moller-Levet, C., McGrath, S., Butler-Manuel, S., Kavitha Madhuri, T., Kierzek, A. M., Pandha, H., Morgan, R., & Michael, A. (2016). The prognostic significance of specific HOX gene expression patterns in ovarian cancer. *Int J Cancer*, 139(7), 1608-1617. <https://doi.org/10.1002/ijc.30204>
- Kingston, R. E., Chen, C. A., & Rose, J. K. (2003). Calcium phosphate transfection. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 9, Unit 9.1. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0901s63>
- Kleihues, P., & Ohgaki, H. (2000). Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors. *Toxicol Pathol*, 28(1), 164-170. <https://doi.org/10.1177/019262330002800121>

- Klein, D., Benchellal, M., Kleff, V., Jakob, H. G., & Ergün, S. (2013). Hox genes are involved in vascular wall-resident multipotent stem cell differentiation into smooth muscle cells. *Sci Rep*, 3, 2178. <https://doi.org/10.1038/srep02178>
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res*, 47(D1), D155-d162. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>
- Krivtsov, A. V., Twomey, D., Feng, Z., Stubbs, M. C., Wang, Y., Faber, J., Levine, J. E., Wang, J., Hahn, W. C., Gilliland, D. G., Golub, T. R., & Armstrong, S. A. (2006). Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature*, 442(7104), 818-822. <https://doi.org/10.1038/nature04980>
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc*, 2018(6). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>
- Kuo, T. L., Cheng, K. H., Chen, L. T., & Hung, W. C. (2019). Deciphering The Potential Role of Hox Genes in Pancreatic Cancer. *Cancers*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/cancers11050734>
- Kurscheid, S., Bady, P., Sciuscio, D., Samarzija, I., Shay, T., Vassallo, I., Crieckinge, W. V., Daniel, R. T., van den Bent, M. J., Marosi, C., Weller, M., Mason, W. P., Domany, E., Stupp, R., Delorenzi, M., & Hegi, M. E. (2015). Chromosome 7 gain and DNA hypermethylation at the HOXA10 locus are associated with expression of a stem cell related HOX-signature in glioblastoma. *Genome Biol*, 16(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0583-7>
- Kwon, M., & Firestein, B. L. (2013). DNA Transfection: Calcium Phosphate Method. In R. Zhou & L. Mei (Eds.), *Neural Development: Methods and Protocols* (pp. 107-110). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-444-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-444-9_10)
- Lacroix, B., & Maddox, A. S. (2012). Cytokinesis, ploidy and aneuploidy. *J Pathol*, 226(2), 338-351. <https://doi.org/10.1002/path.3013>
- Langston, A. W., & Gudas, L. J. (1994). Retinoic acid and homeobox gene regulation. *Curr Opin Genet Dev*, 4(4), 550-555. [https://doi.org/10.1016/0959-437x\(94\)90071-a](https://doi.org/10.1016/0959-437x(94)90071-a)
- Lappin, T. R. J., Grier, D. G., Thompson, A., & Halliday, H. L. (2006). HOX genes: seductive science, mysterious mechanisms. *The Ulster medical journal*, 75(1), 23-31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16457401>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1891803/>
- Larjavaara, S., Mäntylä, R., Salminen, T., Haapasalo, H., Raitanen, J., Jääskeläinen, J., & Auvinen, A. (2007). Incidence of gliomas by anatomic location. *Neuro Oncol*, 9(3), 319-325. <https://doi.org/10.1215/15228517-2007-016>
- Lathia, J. D., Gallagher, J., Myers, J. T., Li, M., Vasanthi, A., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B., Huang, A. Y., & Rich, J. N. (2011). Direct in vivo evidence for tumor propagation by glioblastoma cancer stem cells. *PLoS One*, 6(9), e24807. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024807>
- Laywell, E. D., Rakic, P., Kukekov, V. G., Holland, E. C., & Steindler, D. A. (2000). Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(25), 13883-13888. <https://doi.org/10.1073/pnas.250471697>
- Le Boiteux, E., Court, F., Guichet, P. O., Vaurs-Barrière, C., Vaillant, I., Chautard,

- E., Verrelle, P., Costa, B. M., Karayan-Tapon, L., Fogli, A., & Arnaud, P. (2021). Widespread overexpression from the four DNA hypermethylated HOX clusters in aggressive (IDHwt) glioma is associated with H3K27me3 depletion and alternative promoter usage. *Mol Oncol*, *15*(8), 1995-2010. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12944>
- Lee, J. H., Lee, J. E., Kahng, J. Y., Kim, S. H., Park, J. S., Yoon, S. J., Um, J. Y., Kim, W. K., Lee, J. K., Park, J., Kim, E. H., Lee, J. H., Lee, J. H., Chung, W. S., Ju, Y. S., Park, S. H., Chang, J. H., Kang, S. G., & Lee, J. H. (2018). Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations. *Nature*, *560*(7717), 243-247. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0389-3>
- Lee, J. Y., Hur, H., Yun, H. J., Kim, Y., Yang, S., Kim, S. I., & Kim, M. H. (2015). HOXB5 Promotes the Proliferation and Invasion of Breast Cancer Cells. *Int J Biol Sci*, *11*(6), 701-711. <https://doi.org/10.7150/ijbs.11431>
- Lessard, J. C. (2013). Transformation of *E. coli* via electroporation. *Methods Enzymol*, *529*, 321-327. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-418687-3.00027-6>
- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, *120*(1), 15-20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.035>
- Lewis, C. A., Brault, C., Peck, B., Bensaad, K., Griffiths, B., Mitter, R., Chakravarty, P., East, P., Dankworth, B., Alibhai, D., Harris, A. L., & Schulze, A. (2015). SREBP maintains lipid biosynthesis and viability of cancer cells under lipid- and oxygen-deprived conditions and defines a gene signature associated with poor survival in glioblastoma multiforme. *Oncogene*, *34*(40), 5128-5140. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.439>
- Li, B., Jin, H., Yu, Y., Gu, C., Zhou, X., Zhao, N., & Feng, Y. (2009). HOXA10 is overexpressed in human ovarian clear cell adenocarcinoma and correlates with poor survival. *Int J Gynecol Cancer*, *19*(8), 1347-1352. <https://doi.org/10.1111/IGC.0b013e3181a83f1d>
- Li, C., Ma, J., Groenewoud, A., Ren, J., Liu, S., Snaar-Jagalska, B. E., & Ten Dijke, P. (2022). Establishment of Embryonic Zebrafish Xenograft Assays to Investigate TGF- $\beta$  Family Signaling in Human Breast Cancer Progression. *Methods Mol Biol*, *2488*, 67-80. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2277-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2277-3_6)
- Li, M., Xiao, A., Floyd, D., Olmez, I., Lee, J., Godlewski, J., Bronisz, A., Bhat, K. P. L., Sulman, E. P., Nakano, I., & Purow, B. (2017). CDK4/6 inhibition is more active against the glioblastoma proneural subtype. *Oncotarget*, *8*(33), 55319-55331. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19429>
- Li, S., Zhang, W., Wu, C., Gao, H., Yu, J., Wang, X., Li, B., Jun, Z., Zhang, W., Zhou, P., Shi, J., Wang, L., Gao, Y., Li, S., & Tao, B. (2018). HOXC10 promotes proliferation and invasion and induces immunosuppressive gene expression in glioma. *Febs j*, *285*(12), 2278-2291. <https://doi.org/10.1111/febs.14476>
- Li, X., Zheng, L., Zhang, F., Hu, J., Chou, J., Liu, Y., Xing, Y., & Xi, T. (2016). STARD13-correlated ceRNA network inhibits EMT and metastasis of breast cancer. *Oncotarget*, *7*(17), 23197-23211. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8099>

- Li, Y., Ma, K., Xie, Q., Zhang, X., Zhang, X., Chen, K., Kong, L., & Qian, R. (2021). Identification of HOXD10 as a Marker of Poor Prognosis in Glioblastoma Multiforme. *Onco Targets Ther*, *14*, 5183-5195. <https://doi.org/10.2147/ott.S336225>
- Liu, H., Zhang, M., Xu, S., Zhang, J., Zou, J., Yang, C., Zhang, Y., Gong, C., Kai, Y., & Li, Y. (2018). HOXC8 promotes proliferation and migration through transcriptional up-regulation of TGFbeta1 in non-small cell lung cancer. *Oncogenesis*, *7*(2), 1. <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0016-4>
- Liu, Y., Jiang, K., Zhi, T., & Xu, X. (2021). miR-720 is a key regulator of glioma migration and invasion by controlling TARSL2 expression. *Hum Cell*, *34*(5), 1504-1516. <https://doi.org/10.1007/s13577-021-00551-x>
- Lizen, B., Moens, C., Mouheiche, J., Sacré, T., Ahn, M. T., Jeannotte, L., Salti, A., & Gofflot, F. (2017). Conditional Loss of Hoxa5 Function Early after Birth Impacts on Expression of Genes with Synaptic Function. *Front Mol Neurosci*, *10*, 369. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00369>
- Loeffler, M., & Potten, C. (1997). Stem cells and cellular pedigrees - A conceptual introduction. In (pp. 1-27). <https://doi.org/10.1016/B978-012563455-7/50002-7>
- Lopez-Bertoni, H., Johnson, A., Rui, Y., Lal, B., Sall, S., Malloy, M., Coulter, J. B., Lugo-Fagundo, M., Shudir, S., Khela, H., Caputo, C., Green, J. J., & Laterra, J. (2022). Sox2 induces glioblastoma cell stemness and tumor propagation by repressing TET2 and deregulating 5hmC and 5mC DNA modifications. *Signal Transduct Target Ther*, *7*(1), 37. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00857-0>
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W., & Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, *114*(2), 97-109. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*, *131*(6), 803-820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- Lu, C., Ward, P. S., Kapoor, G. S., Rohle, D., Turcan, S., Abdel-Wahab, O., Edwards, C. R., Khanin, R., Figueroa, M. E., Melnick, A., Wellen, K. E., O'Rourke, D. M., Berger, S. L., Chan, T. A., Levine, R. L., Mellinghoff, I. K., & Thompson, C. B. (2012). IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*, *483*(7390), 474-478. <https://doi.org/10.1038/nature10860>
- Lund, A. H. (2010). miR-10 in development and cancer. *Cell Death Differ*, *17*(2), 209-214. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.58>
- Lv, T., Miao, Y., Xu, T., Sun, W., Sang, Y., Jia, F., & Zhang, X. (2020). Circ-EPB41L5 regulates the host gene EPB41L5 via sponging miR-19a to repress glioblastoma tumorigenesis. *Aging (Albany NY)*, *12*(1), 318-339. <https://doi.org/10.18632/aging.102617>
- Lytle, J. R., Yario, T. A., & Steitz, J. A. (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl*



- Acad Sci U S A*, 104(23), 9667-9672.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0703820104>
- Ma, W., Jin, H., Liu, W., Li, X., Zhou, X., Guo, X., Tian, R., Cui, Q., Luo, J., Jiao, Y., Yu, Y., Yang, H., & Zhao, H. (2019). Homeobox B8 Targets Sterile Alpha Motif Domain-Containing Protein 9 and Drives Glioma Progression. *Neurosci Bull*.  
<https://doi.org/10.1007/s12264-019-00436-y>
- Maconochie, M., Nonchev, S., Morrison, A., & Krumlauf, R. (1996). Paralogous Hox genes: function and regulation. *Annu Rev Genet*, 30, 529-556.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.genet.30.1.529>
- Malta, T. M., de Souza, C. F., Sabedot, T. S., Silva, T. C., Mosella, M. S., Kalkanis, S. N., Snyder, J., Castro, A. V. B., & Nounshmehr, H. (2018). Glioma CpG island methylator phenotype (G-CIMP): biological and clinical implications. *Neuro Oncol*, 20(5), 608-620. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox183>
- Manohar, C. F., Salwen, H. R., Furtado, M. R., & Cohn, S. L. (1996). Up-regulation of HOXC6, HOXD1, and HOXD8 homeobox gene expression in human neuroblastoma cells following chemical induction of differentiation. *Tumour Biol*, 17(1), 34-47. <https://doi.org/10.1159/000217965>
- Marabita, F., Almgren, M., Lindholm, M. E., Ruhrmann, S., Fagerström-Billai, F., Jagodic, M., Sundberg, C. J., Ekström, T. J., Teschendorff, A. E., Tegnér, J., & Gomez-Cabrero, D. (2013). An evaluation of analysis pipelines for DNA methylation profiling using the Illumina HumanMethylation450 BeadChip platform. *Epigenetics*, 8(3), 333-346. <https://doi.org/10.4161/epi.24008>
- Mark, M., Rijli, F. M., & Chambon, P. (1997). Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis. *Pediatr Res*, 42(4), 421-429.  
<https://doi.org/10.1203/00006450-199710000-00001>
- Masui, K., Mischel, P. S., & Reifenberger, G. (2016). Molecular classification of gliomas. *Handb Clin Neurol*, 134, 97-120. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802997-8.00006-2>
- McCutcheon, S., & Spray, D. C. (2022). Glioblastoma-Astrocyte Connexin 43 Gap Junctions Promote Tumor Invasion. *Mol Cancer Res*, 20(2), 319-331.  
<https://doi.org/10.1158/1541-7786.Mcr-21-0199>
- McNulty, C. L., Peres, J. N., Bardine, N., van den Akker, W. M., & Durston, A. J. (2005). Knockdown of the complete Hox paralogous group 1 leads to dramatic hindbrain and neural crest defects. *Development*, 132(12), 2861-2871.  
<https://doi.org/10.1242/dev.01872>
- Meacham, C. E., & Morrison, S. J. (2013). Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*, 501(7467), 328-337. <https://doi.org/10.1038/nature12624>
- Messali, A., Villacorta, R., & Hay, J. W. (2014). A review of the economic burden of glioblastoma and the cost effectiveness of pharmacologic treatments. *Pharmacoeconomics*, 32(12), 1201-1212. <https://doi.org/10.1007/s40273-014-0198-y>
- Milanovic, D., Maier, P., Lohr, F., Wenz, F., & Herskind, C. (2007). Inhibition of 13-cis retinoic acid-induced gene expression of homeobox B7 by thalidomide. *Int J Cancer*, 121(6), 1205-1211. <https://doi.org/10.1002/ijc.22815>
- Milanović, D., Maier, P., Schanne, D., Wenz, F., & Herskind, C. (2014). The Influence of Retinoic Acid and Thalidomide on the Radiosensitivity of U343 Glioblastoma Cells. *Anticancer research*, 34, 1885-1891.

- Mongan, N. P., & Gudas, L. J. (2007). Diverse actions of retinoid receptors in cancer prevention and treatment. *Differentiation*, 75(9), 853-870. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2007.00206.x>
- Montavon, T., & Soshnikova, N. (2014). Hox gene regulation and timing in embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 34, 76-84. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.06.005>
- Muftuoglu, Y., & Pajonk, F. (2021). Targeting Glioma Stem Cells. *Neurosurg Clin N Am*, 32(2), 283-289. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2021.01.002>
- Murat, A., Migliavacca, E., Gorlia, T., Lambiv, W. L., Shay, T., Hamou, M. F., de Tribolet, N., Regli, L., Wick, W., Kouwenhoven, M. C., Hainfellner, J. A., Heppner, F. L., Dietrich, P. Y., Zimmer, Y., Cairncross, J. G., Janzer, R. C., Domany, E., Delorenzi, M., Stupp, R., & Hegi, M. E. (2008). Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *J Clin Oncol*, 26(18), 3015-3024. <https://doi.org/10.1200/jco.2007.15.7164>
- Nakada, M., Nakada, S., Demuth, T., Tran, N. L., Hoelzinger, D. B., & Berens, M. E. (2007). Molecular targets of glioma invasion [journal article]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(4), 458. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6342-5>
- Namihira, M., & Nakashima, K. (2013). Mechanisms of astrocytogenesis in the mammalian brain. *Curr Opin Neurobiol*, 23(6), 921-927. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.06.002>
- Nguyen, T. A., Jo, M. H., Choi, Y. G., Park, J., Kwon, S. C., Hohng, S., Kim, V. N., & Woo, J. S. (2015). Functional Anatomy of the Human Microprocessor. *Cell*, 161(6), 1374-1387. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.010>
- Nogueira, V., Park, Y., Chen, C. C., Xu, P. Z., Chen, M. L., Tonic, I., Unterman, T., & Hay, N. (2008). Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell*, 14(6), 458-470. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.11.003>
- Noordermeer, D., & Duboule, D. (2013). Chromatin architectures and Hox gene collinearity. *Curr Top Dev Biol*, 104, 113-148. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-416027-9.00004-8>
- Norouzi, M., Yasamineh, S., Montazeri, M., Dadashpour, M., Sheervalilou, R., Abasi, M., & Pilehvar-Soltanahmadi, Y. (2019). Recent advances on nanomaterials-based fluorimetric approaches for microRNAs detection. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 104, 110007. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110007>
- Noushmehr, H., Weisenberger, D. J., Diefes, K., Phillips, H. S., Pujara, K., Berman, B. P., Pan, F., Pelloski, C. E., Sulman, E. P., Bhat, K. P., Verhaak, R. G., Hoadley, K. A., Hayes, D. N., Perou, C. M., Schmidt, H. K., Ding, L., Wilson, R. K., Van Den Berg, D., Shen, H., . . . Aldape, K. (2010). Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell*, 17(5), 510-522. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.03.017>
- Nunes, M. C., Roy, N. S., Keyoung, H. M., Goodman, R. R., McKhann, G., 2nd, Jiang, L., Kang, J., Nedergaard, M., & Goldman, S. A. (2003). Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nat Med*, 9(4), 439-447.

<https://doi.org/10.1038/nm837>

- Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P. L., Burkhard, C., Schüler, D., Probst-Hensch, N. M., Maiorka, P. C., Baeza, N., Pisani, P., Yonekawa, Y., Yasargil, M. G., Lütolf, U. M., & Kleihues, P. (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*, *64*(19), 6892-6899. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-04-1337>
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2009). Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci*, *100*(12), 2235-2241. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01308.x>
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2013). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*, *19*(4), 764-772. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-12-3002>
- Okamoto, O. K., Oba-Shinjo, S. M., Lopes, L., & Nagahashi Marie, S. K. (2007). Expression of HOXC9 and E2F2 are up-regulated in CD133(+) cells isolated from human astrocytomas and associate with transformation of human astrocytes. *Biochim Biophys Acta*, *1769*(7-8), 437-442. <https://doi.org/10.1016/j.bbexp.2007.05.002>
- Ordóñez-Morán, P., Dafflon, C., Imajo, M., Nishida, E., & Huelsken, J. (2015). HOXA5 Counteracts Stem Cell Traits by Inhibiting Wnt Signaling in Colorectal Cancer. *Cancer Cell*, *28*(6), 815-829. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.11.001>
- Orr, B., Godek, K. M., & Compton, D. (2015). Aneuploidy. *Curr Biol*, *25*(13), R538-542. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.05.010>
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Stetson, L., Virk, S. M., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2015). Epidemiology of gliomas. *Cancer Treat Res*, *163*, 1-14. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-12048-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-12048-5_1)
- Ozawa, T., Riester, M., Cheng, Y. K., Huse, J. T., Squatrito, M., Helmy, K., Charles, N., Michor, F., & Holland, E. C. (2014). Most human non-GCIMP glioblastoma subtypes evolve from a common proneural-like precursor glioma. *Cancer Cell*, *26*(2), 288-300. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.06.005>
- Papagiannakopoulos, T., Shapiro, A., & Kosik, K. S. (2008). MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res*, *68*(19), 8164-8172. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-08-1305>
- Peng, G., Liu, Y., Yang, C., & Shen, C. (2022). MicroRNA-25 promotes cell proliferation, migration and invasion in glioma by directly targeting cell adhesion molecule 2. *Exp Ther Med*, *23*(1), 16. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10938>
- Peterson, S. M., & Freeman, J. L. (2009). Cancer cytogenetics in the zebrafish. *Zebrafish*, *6*(4), 355-360. <https://doi.org/10.1089/zeb.2009.0600>
- Petrini, M., Felicetti, F., Bottero, L., Errico, M. C., Morsilli, O., Boe, A., De Feo, A., & Carè, A. (2013). HOXB1 restored expression promotes apoptosis and differentiation in the HL60 leukemic cell line. *Cancer cell international*, *13*(1), 101-101. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-101>
- Pfeifer, G. P. (2018). Defining Driver DNA Methylation Changes in Human Cancer. *Int J Mol Sci*, *19*(4). <https://doi.org/10.3390/ijms19041166>
- Philippidou, P., & Dasen, J. S. (2013). Hox genes: choreographers in neural development, architects of circuit organization. *Neuron*, *80*(1), 12-34.

- <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.020>
- Ponzoni, M., Bachetti, T., Corrias, M. V., Brignole, C., Pastorino, F., Calarco, E., Bensa, V., Giusto, E., Ceccherini, I., & Perri, P. (2022). Recent advances in the developmental origin of neuroblastoma: an overview. *J Exp Clin Cancer Res*, *41*(1), 92. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02281-w>
- Prager, B. C., Bhargava, S., Mahadev, V., Hubert, C. G., & Rich, J. N. (2020). Glioblastoma Stem Cells: Driving Resilience through Chaos. *Trends Cancer*, *6*(3), 223-235. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.01.009>
- Qiang, L., Yang, Y., Ma, Y.-J., Chen, F.-H., Zhang, L.-B., Liu, W., Qi, Q., Lu, N., Tao, L., Wang, X.-T., You, Q.-D., & Guo, Q.-L. (2009). Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines. *Cancer Letters*, *279*(1), 13-21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.01.016>
- Quagliata, L., Quintavalle, C., Lanzafame, M., Matter, M. S., Novello, C., di Tommaso, L., Pressiani, T., Rimassa, L., Tornillo, L., Roncalli, M., Cillo, C., Pallante, P., Piscuoglio, S., Ng, C. K., & Terracciano, L. M. (2018). High expression of HOXA13 correlates with poorly differentiated hepatocellular carcinomas and modulates sorafenib response in in vitro models. *Lab Invest*, *98*(1), 95-105. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.107>
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, *414*(6859), 105-111. <https://doi.org/10.1038/35102167>
- Rheinbay, E., Suvà, M. L., Gillespie, S. M., Wakimoto, H., Patel, A. P., Shahid, M., Oksuz, O., Rabkin, S. D., Martuza, R. L., Rivera, M. N., Louis, D. N., Kasif, S., Chi, A. S., & Bernstein, B. E. (2013). An aberrant transcription factor network essential for Wnt signaling and stem cell maintenance in glioblastoma. *Cell Rep*, *3*(5), 1567-1579. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.04.021>
- Ringrose, L., & Paro, R. (2007). Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development*, *134*(2), 223-232. <https://doi.org/10.1242/dev.02723>
- Rivera, A. L., Pelloski, C. E., Gilbert, M. R., Colman, H., De La Cruz, C., Sulman, E. P., Bekele, B. N., & Aldape, K. D. (2010). MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma. *Neuro Oncol*, *12*(2), 116-121. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nop020>
- Robertson, D. W., Katzenellenbogen, J. A., Long, D. J., Rorke, E. A., & Katzenellenbogen, B. S. (1982). Tamoxifen antiestrogens. A comparison of the activity, pharmacokinetics, and metabolic activation of the cis and trans isomers of tamoxifen. *J Steroid Biochem*, *16*(1), 1-13. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(82\)90137-6](https://doi.org/10.1016/0022-4731(82)90137-6)
- Rock, K., McArdle, O., Forde, P., Dunne, M., Fitzpatrick, D., O'Neill, B., & Faul, C. (2012). A clinical review of treatment outcomes in glioblastoma multiforme--the validation in a non-trial population of the results of a randomised Phase III clinical trial: has a more radical approach improved survival? *Br J Radiol*, *85*(1017), e729-733. <https://doi.org/10.1259/bjr/83796755>
- Rodrigues, M. F., Esteves, C. M., Xavier, F. C., & Nunes, F. D. (2016). Methylation

- status of homeobox genes in common human cancers. *Genomics*, 108(5-6), 185-193. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2016.11.001>
- Roussel, M. F., & Hatten, M. E. (2011). Cerebellum development and medulloblastoma. *Curr Top Dev Biol*, 94, 235-282. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-380916-2.00008-5>
- Samuel, S., & Naora, H. (2005). Homeobox gene expression in cancer: insights from developmental regulation and deregulation. *Eur J Cancer*, 41(16), 2428-2437. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.08.014>
- Schnabel, E., Knoll, M., Schwager, C., Warta, R., Mock, A., Campos, B., König, L., Jungk, C., Wick, W., Unterberg, A., Debus, J., Herold-Mende, C., & Abdollahi, A. (2021). Prognostic Value of microRNA-221/2 and 17-92 Families in Primary Glioblastoma Patients Treated with Postoperative Radiotherapy. *Int J Mol Sci*, 22(6). <https://doi.org/10.3390/ijms22062960>
- Schonberg, D. L., Lubelski, D., Miller, T. E., & Rich, J. N. (2014). Brain tumor stem cells: Molecular characteristics and their impact on therapy. *Mol Aspects Med*, 39, 82-101. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2013.06.004>
- Schwartzbaum, J. A., Fisher, J. L., Aldape, K. D., & Wrensch, M. (2006). Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol*, 2(9), 494-503; quiz 491 p following 516. <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0289>
- Se, Y. B., Kim, S. H., Kim, J. Y., Kim, J. E., Dho, Y. S., Kim, J. W., Kim, Y. H., Woo, H. G., Kim, S. H., Kang, S. H., Kim, H. J., Kim, T. M., Lee, S. T., Choi, S. H., Park, S. H., Kim, I. H., Kim, D. G., & Park, C. K. (2017). Underexpression of HOXA11 Is Associated with Treatment Resistance and Poor Prognosis in Glioblastoma. *Cancer Res Treat*, 49(2), 387-398. <https://doi.org/10.4143/crt.2016.106>
- Sejda, A., Grajkowska, W., Trubicka, J., Szutowicz, E., Wojdacz, T., Kloc, W., & Iżycka-Świeszewska, E. (2022). WHO CNS5 2021 classification of gliomas: a practical review and road signs for diagnosing pathologists and proper patho-clinical and neuro-oncological cooperation. *Folia Neuropathol*, 60(2), 137-152. <https://doi.org/10.5114/fn.2022.118183>
- Sell, S. (2006). Cancer stem cells and differentiation therapy. *Tumour Biol*, 27(2), 59-70. <https://doi.org/10.1159/000092323>
- Shah, M., & Allegrucci, C. (2013). Stem cell plasticity in development and cancer: epigenetic origin of cancer stem cells. *Subcell Biochem*, 61, 545-565. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-4525-4\\_24](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4525-4_24)
- Shah, M., Cardenas, R., Wang, B., Persson, J., Mongan, N. P., Grabowska, A., & Allegrucci, C. (2017). HOXC8 regulates self-renewal, differentiation and transformation of breast cancer stem cells. *Molecular cancer*, 16(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0605-z>
- Shah, N., & Sukumar, S. (2010). The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nat Rev Cancer*, 10(5), 361-371. <https://doi.org/10.1038/nrc2826>
- Shi, Y., Kirwan, P., & Livesey, F. J. (2012). Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. *Nat Protoc*, 7(10), 1836-1846. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.116>
- Sidaway, P. (2017). CNS cancer: Glioblastoma subtypes revisited. *Nat Rev Clin Oncol*, 14(10), 587. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.122>
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., & Dirks,

- P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 63(18), 5821-5828.
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., & Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432(7015), 396-401. <https://doi.org/10.1038/nature03128>
- Smith, J., Zyoud, A., & Allegrucci, C. (2019). A Case of Identity: HOX Genes in Normal and Cancer Stem Cells. *Cancers*, 11(4), 512. <https://doi.org/10.3390/cancers11040512>
- Song, W.-S., Yang, Y.-P., Huang, C.-S., Lu, K.-H., Liu, W.-H., Wu, W.-W., Lee, Y.-Y., Lo, W.-L., Lee, S.-D., Chen, Y.-W., Huang, P.-I., & Chen, M.-T. (2016). Sox2, a stemness gene, regulates tumor-initiating and drug-resistant properties in CD133-positive glioblastoma stem cells. *Journal of the Chinese Medical Association*, 79(10), 538-545. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcma.2016.03.010>
- Sottoriva, A., Spiteri, I., Piccirillo, S. G., Touloumis, A., Collins, V. P., Marioni, J. C., Curtis, C., Watts, C., & Tavaré, S. (2013). Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(10), 4009-4014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219747110>
- Stoletov, K., Montel, V., Lester, R. D., Gonias, S. L., & Klemke, R. (2007). High-resolution imaging of the dynamic tumor cell vascular interface in transparent zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(44), 17406-17411. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703446104>
- Sun, J., Wang, M., Zhong, Y., Ma, X., Sun, S., Xu, C., Peng, L., Li, G., Zhang, L., Liu, Z., Ai, D., & Liu, B. (2022). A Glb1-2A-mCherry reporter monitors systemic aging and predicts lifespan in middle-aged mice. *Nat Commun*, 13(1), 7028. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34801-9>
- Swift, S., Lorens, J., Achacoso, P., & Nolan, G. P. (2001). Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 10, Unit 10.17C. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1017cs31>
- Sylvester, P. W. (2011). Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods Mol Biol*, 716, 157-168. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-012-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-012-6_9)
- Tabuse, M., Ohta, S., Ohashi, Y., Fukaya, R., Misawa, A., Yoshida, K., Kawase, T., Saya, H., Thirant, C., Chneiweiss, H., Matsuzaki, Y., Okano, H., Kawakami, Y., & Toda, M. (2011). Functional analysis of HOXD9 in human gliomas and glioma cancer stem cells. *Molecular cancer*, 10, 60-60. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-60>
- Takahashi, Y., Hamada, J., Murakawa, K., Takada, M., Tada, M., Nogami, I., Hayashi, N., Nakamori, S., Monden, M., Miyamoto, M., Katoh, H., & Moriuchi, T. (2004). Expression profiles of 39 HOX genes in normal human adult organs and anaplastic thyroid cancer cell lines by quantitative real-time RT-PCR system. *Exp Cell Res*, 293(1), 144-153. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.09.024>
- Tamimi, A. F., & Juweid, M. (2017). Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. In S. De Vleeschouwer (Ed.), *Glioblastoma*. Codon Publications

- Copyright: The Authors. <https://doi.org/10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch8>
- Tan, Y., Zhang, B., Wu, T., Skogerbø, G., Zhu, X., Guo, X., He, S., & Chen, R. (2009). Transcriptional inhibition of Hoxd4 expression by miRNA-10a in human breast cancer cells. *BMC Mol Biol*, 10, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-12>
- Taylor, J. W., Chi, A. S., & Cahill, D. P. (2013). Tailored therapy in diffuse gliomas: using molecular classifiers to optimize clinical management. *Oncology (Williston Park)*, 27(6), 504-514.
- Teglund, S., & Toftgård, R. (2010). Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta*, 1805(2), 181-208. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.01.003>
- Teo, W. W., Merino, V. F., Cho, S., Korangath, P., Liang, X., Wu, R. C., Neumann, N. M., Ewald, A. J., & Sukumar, S. (2016). HOXA5 determines cell fate transition and impedes tumor initiation and progression in breast cancer through regulation of E-cadherin and CD24. *Oncogene*, 35(42), 5539-5551. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.95>
- Tomolonis, J. A., Agarwal, S., & Shohet, J. M. (2018). Neuroblastoma pathogenesis: deregulation of embryonic neural crest development. *Cell Tissue Res*, 372(2), 245-262. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2747-0>
- Torp, S. H., Solheim, O., & Skjulsvik, A. J. (2022). The WHO 2021 Classification of Central Nervous System tumours: a practical update on what neurosurgeons need to know—a minireview. *Acta Neurochir (Wien)*, 164(9), 2453-2464. <https://doi.org/10.1007/s00701-022-05301-y>
- Tsuboi, M., Taniuchi, K., Shimizu, T., Saito, M., & Saibara, T. (2017). The transcription factor HOXB7 regulates ERK kinase activity and thereby stimulates the motility and invasiveness of pancreatic cancer cells. *J Biol Chem*, 292(43), 17681-17702. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.772780>
- Tunici, P., Bissola, L., Lualdi, E., Pollo, B., Cajola, L., Broggi, G., Sozzi, G., & Finocchiaro, G. (2004). Genetic alterations and in vivo tumorigenicity of neurospheres derived from an adult glioblastoma. *Mol Cancer*, 3, 25. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-3-25>
- Turcan, S., Rohle, D., Goenka, A., Walsh, L. A., Fang, F., Yilmaz, E., Campos, C., Fabius, A. W., Lu, C., Ward, P. S., Thompson, C. B., Kaufman, A., Guryanova, O., Levine, R., Heguy, A., Viale, A., Morris, L. G., Huse, J. T., Mellinghoff, I. K., & Chan, T. A. (2012). IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature*, 483(7390), 479-483. <https://doi.org/10.1038/nature10866>
- van den Bent, M. J., Looijenga, L. H., Langenberg, K., Dinjens, W., Graveland, W., Uytendewilligen, L., Sillevius Smitt, P. A., Jenkins, R. B., & Kros, J. M. (2003). Chromosomal anomalies in oligodendroglial tumors are correlated with clinical features. *Cancer*, 97(5), 1276-1284. <https://doi.org/10.1002/cncr.11187>
- Van Tongelen, A., Lorient, A., & De Smet, C. (2017). Oncogenic roles of DNA hypomethylation through the activation of cancer-germline genes. *Cancer Lett*, 396, 130-137. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.03.029>
- Ventura, A., & Jacks, T. (2009). MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell*, 136(4), 586-591. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.005>

- Verhaak, R. G., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., Miller, C. R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J. P., Alexe, G., Lawrence, M., O'Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B. A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., . . . Hayes, D. N. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, *17*(1), 98-110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>
- Vescovi, A. L., Galli, R., & Reynolds, B. A. (2006). Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer*, *6*(6), 425-436. <https://doi.org/10.1038/nrc1889>
- Vinnitsky, V. (2014). The development of a malignant tumor is due to a desperate asexual self-cloning process in which cancer stem cells develop the ability to mimic the genetic program of germline cells. *Intrinsically Disordered Proteins*, *2*(1), e29997. <https://doi.org/10.4161/idp.29997>
- Visvader, J. E., & Lindeman, G. J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*, *8*(10), 755-768. <https://doi.org/10.1038/nrc2499>
- Vojdani, S., Ghaderian, S. M. H., Zali, A., Rakhshan, A., Oraee Yazdani, S., Poursheikhani, A., Bidari Zerehpoush, F., & Sharifi, G. (2021). Altered expression of EGFR and miR-34a derived from serum and tumoral tissue was associated with glioblastoma multiform. *Exp Mol Pathol*, *121*, 104655. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2021.104655>
- Vora, P., Venugopal, C., McFarlane, N., & Singh, S. K. (2015). Culture and Isolation of Brain Tumor Initiating Cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, *34*, 3.3.1-3.3.13. <https://doi.org/10.1002/9780470151808.sc0303s34>
- Wainwright, E. N., & Scaffidi, P. (2017). Epigenetics and Cancer Stem Cells: Unleashing, Hijacking, and Restricting Cellular Plasticity. *Trends Cancer*, *3*(5), 372-386. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.04.004>
- Wang, H., Sun, T., Hu, J., Zhang, R., Rao, Y., Wang, S., Chen, R., McLendon, R. E., Friedman, A. H., Keir, S. T., Bigner, D. D., Li, Q. J., Wang, H., & Wang, X. F. (2014). miR-33a promotes glioma-initiating cell self-renewal via PKA and NOTCH pathways. *J Clin Invest*, *124*(10), 4489-4502. <https://doi.org/10.1172/jci75284>
- Wang, Q., Hu, B., Hu, X., Kim, H., Squatrito, M., Scarpace, L., deCarvalho, A. C., Lyu, S., Li, P., Li, Y., Barthel, F., Cho, H. J., Lin, Y. H., Satani, N., Martinez-Ledesma, E., Zheng, S., Chang, E., Sauv e, C. G., Olar, A., . . . Verhaak, R. G. W. (2017). Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell*, *32*(1), 42-56.e46. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.06.003>
- Wang, X., Sun, Y., Xu, T., Qian, K., Huang, B., Zhang, K., Song, Z., Qian, T., Shi, J., & Li, L. (2019). HOXB13 promotes proliferation, migration, and invasion of glioblastoma through transcriptional upregulation of lncRNA HOXC-AS3. *J Cell Biochem*, *120*(9), 15527-15537. <https://doi.org/10.1002/jcb.28819>
- Wang, X., Zhou, R., Xiong, Y., Zhou, L., Yan, X., Wang, M., Li, F., Xie, C., Zhang, Y., Huang, Z., Ding, C., Shi, K., Li, W., Liu, Y., Cao, Z., Zhang, Z. N., Zhou, S., Chen, C., Zhang, Y., . . . Wang, Y. (2021). Sequential fate-switches in stem-like cells drive the tumorigenic trajectory from human neural stem cells to malignant glioma. *Cell Res*, *31*(6), 684-702.



- <https://doi.org/10.1038/s41422-020-00451-z>
- Wang, Y., Hung, C., Koh, D., Cheong, D., & Hooi, S. C. (2001). Differential expression of Hox A5 in human colon cancer cell differentiation: a quantitative study using real-time RT-PCR. *Int J Oncol*, 18(3), 617-622. <https://doi.org/10.3892/ijo.18.3.617>
- Wang, Z., Zhang, H., Xu, S., Liu, Z., & Cheng, Q. (2021). The adaptive transition of glioblastoma stem cells and its implications on treatments. *Signal Transduct Target Ther*, 6(1), 124. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00491-w>
- Welker, A. M., Jaros, B. D., An, M., & Beattie, C. E. (2017). Changes in tumor cell heterogeneity after chemotherapy treatment in a xenograft model of glioblastoma. *Neuroscience*, 356, 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.05.010>
- Wick, W., Meisner, C., Hentschel, B., Platten, M., Schilling, A., Wiestler, B., Sabel, M. C., Koeppen, S., Ketter, R., Weiler, M., Tabatabai, G., von Deimling, A., Gramatzki, D., Westphal, M., Schackert, G., Loeffler, M., Simon, M., Reifenberger, G., & Weller, M. (2013). Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation. *Neurology*, 81(17), 1515-1522. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182a95680>
- Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5), 855-862. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90530-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90530-4)
- Wilson, R. C., Tambe, A., Kidwell, M. A., Noland, C. L., Schneider, C. P., & Doudna, J. A. (2015). Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis. *Mol Cell*, 57(3), 397-407. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.030>
- Wolf, L. V., Yeung, J. M., Doucette, J. R., & Nazarali, A. J. (2001). Coordinated expression of Hoxa2, Hoxd1 and Pax6 in the developing diencephalon. *NeuroReport*, 12(2). [https://journals.lww.com/neuroreport/Fulltext/2001/02120/Coordinated\\_expression\\_of\\_Hoxa2,\\_Hoxd1\\_and\\_Pax6\\_in.30.aspx](https://journals.lww.com/neuroreport/Fulltext/2001/02120/Coordinated_expression_of_Hoxa2,_Hoxd1_and_Pax6_in.30.aspx)
- Wolf, L. V., Yeung, J. M., Doucette, J. R., & Nazarali, A. J. (2001). Coordinated expression of Hoxa2, Hoxd1 and Pax6 in the developing diencephalon. *Neuroreport*, 12(2), 329-333. <https://doi.org/10.1097/00001756-200102120-00030>
- Xu, J., Liao, X., & Wong, C. (2010). Downregulations of B-cell lymphoma 2 and myeloid cell leukemia sequence 1 by microRNA 153 induce apoptosis in a glioblastoma cell line DBTRG-05MG. *Int J Cancer*, 126(4), 1029-1035. <https://doi.org/10.1002/ijc.24823>
- Xu, K., Qiu, C., Pei, H., Mehmood, M. A., Wang, H., Li, L., & Xia, Q. (2018). Homeobox B3 promotes tumor cell proliferation and invasion in glioblastoma. *Oncology letters*, 15(3), 3712-3718. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.7750>
- Yan, H., Parsons, D. W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G. J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K. W., Velculescu, V. E., Vogelstein, B., & Bigner, D. D. (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*, 360(8), 765-773. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808710>

- Yang, P., Kang, W., Pan, Y., Zhao, X., & Duan, L. (2019). Overexpression of HOXC6 promotes cell proliferation and migration via MAPK signaling and predicts a poor prognosis in glioblastoma. *Cancer management and research*, *11*, 8167-8179. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S209904>
- Yang, Q., Wei, B., Peng, C., Wang, L., & Li, C. (2022). Identification of serum exosomal miR-98-5p, miR-183-5p, miR-323-3p and miR-19b-3p as potential biomarkers for glioblastoma patients and investigation of their mechanisms. *Curr Res Transl Med*, *70*(1), 103315. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2021.103315>
- Yang, W., Wang, L., Roehn, G., Pearlstein, R. D., Ali-Osman, F., Pan, H., Goldbrunner, R., Krantz, M., Harms, C., & Paschen, W. (2013). Small ubiquitin-like modifier 1-3 conjugation [corrected] is activated in human astrocytic brain tumors and is required for glioblastoma cell survival. *Cancer Sci*, *104*(1), 70-77. <https://doi.org/10.1111/cas.12047>
- Yang, X. J., Cui, W., Gu, A., Xu, C., Yu, S. C., Li, T. T., Cui, Y. H., Zhang, X., & Bian, X. W. (2013). A novel zebrafish xenotransplantation model for study of glioma stem cell invasion. *PLoS One*, *8*(4), e61801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061801>
- Yao, B., Christian, K. M., He, C., Jin, P., Ming, G. L., & Song, H. (2016). Epigenetic mechanisms in neurogenesis. *Nat Rev Neurosci*, *17*(9), 537-549. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.70>
- Yao, J., Hagiwara, A., Raymond, C., Shabani, S., Pope, W. B., Salamon, N., Lai, A., Ji, M., Nghiemphu, P. L., Liao, L. M., Cloughesy, T. F., & Ellingson, B. M. (2020). Human IDH mutant 1p/19q co-deleted gliomas have low tumor acidity as evidenced by molecular MRI and PET: a retrospective study. *Sci Rep*, *10*(1), 11922. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68733-5>
- Yaz, G., Kabadere, S., Öztopçu, P., Durmaz, R., & Uyar, R. (2004). Comparison of the Antiproliferative Properties of Antiestrogenic Drugs (Nafoxidine and Clomiphene) on Glioma Cells In Vitro. *American Journal of Clinical Oncology*, *27*(4). [https://journals.lww.com/amjclinicaloncology/fulltext/2004/08000/comparison\\_of\\_the\\_antiproliferative\\_properties\\_of.11.aspx](https://journals.lww.com/amjclinicaloncology/fulltext/2004/08000/comparison_of_the_antiproliferative_properties_of.11.aspx)
- Ying, M., Wang, S., Sang, Y., Sun, P., Lal, B., Goodwin, C. R., Guerrero-Cazares, H., Quinones-Hinojosa, A., Lattera, J., & Xia, S. (2011). Regulation of glioblastoma stem cells by retinoic acid: role for Notch pathway inhibition. *Oncogene*, *30*(31), 3454-3467. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.58>
- Young, T., & Deschamps, J. (2009). Hox, Cdx, and anteroposterior patterning in the mouse embryo. *Curr Top Dev Biol*, *88*, 235-255. [https://doi.org/10.1016/s0070-2153\(09\)88008-3](https://doi.org/10.1016/s0070-2153(09)88008-3)
- Zhang, G., Chen, L., Khan, A. A., Li, B., Gu, B., Lin, F., Su, X., & Yan, J. (2018). miRNA-124-3p/neuropilin-1(NRP-1) axis plays an important role in mediating glioblastoma growth and angiogenesis. *Int J Cancer*, *143*(3), 635-644. <https://doi.org/10.1002/ijc.31329>
- Zhang, Y., Wang, S. X., Ma, J. W., Li, H. Y., Ye, J. C., Xie, S. M., Du, B., & Zhong, X. Y. (2015). EGCG inhibits properties of glioma stem-like cells and synergizes with temozolomide through downregulation of P-glycoprotein inhibition. *J Neurooncol*, *121*(1), 41-52. <https://doi.org/10.1007/s11060-014->

1604-1

- Zhao, L., Zhao, Y., Tang, F. L., Xiong, L., Su, C., Mei, L., Zhu, X. J., & Xiong, W. C. (2019). pHluorin-BACE1-mCherry Acts as a Reporter for the Intracellular Distribution of Active BACE1 In Vitro and In Vivo. *Cells*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/cells8050474>
- Zhao, S., Huang, J., & Ye, J. (2015). A fresh look at zebrafish from the perspective of cancer research. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 34(1), 80-80. <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0196-8>
- Zhao, W., Geng, D., Li, S., Chen, Z., & Sun, M. (2018). LncRNA HOTAIR influences cell growth, migration, invasion, and apoptosis via the miR-20a-5p/HMGA2 axis in breast cancer. *Cancer Med*, 7(3), 842-855. <https://doi.org/10.1002/cam4.1353>
- Zhao, X. W., Zhan, Y. B., Bao, J. J., Zhou, J. Q., Zhang, F. J., Bin, Y., Bai, Y. H., Wang, Y. M., Zhang, Z. Y., & Liu, X. Z. (2017). Clinicopathological analysis of HOXD4 expression in diffuse gliomas and its correlation with IDH mutations and 1p/19q co-deletion. *Oncotarget*, 8(70), 115657-115666. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23371>
- Zheng, L., Zhang, Z., Zhang, S., Guo, Q., Zhang, F., Gao, L., Ni, H., Guo, X., Xiang, C., & Xi, T. (2018). RNA Binding Protein RNPC1 Inhibits Breast Cancer Cell Metastasis via Activating STARD13-Related ceRNA Network. *Mol Pharm*, 15(6), 2123-2132. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b01123>
- Zheng, S., Chheda, M. G., & Verhaak, R. G. (2012). Studying a complex tumor: potential and pitfalls. *Cancer J*, 18(1), 107-114. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e3182431c57>
- Zhou, Q., Liu, J., Quan, J., Liu, W., Tan, H., & Li, W. (2018). MicroRNAs as potential biomarkers for the diagnosis of glioma: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Sci*, 109(9), 2651-2659. <https://doi.org/10.1111/cas.13714>