



Different levels of expression of ALDH1A1 and DYRK1B in patients with glioblastoma multiforme and their overall survival

Diferentes niveles de expresión de ALDH1A1 y DYRK1B en pacientes con glioblastoma multiforme y su tiempo de supervivencia

Sánchez-Hernández, L.¹, Saavedra Sotelo, R.¹, Torres-Corona, D. D.¹, Aguirre-Quezada, D. E.², Gómez-García, E.¹

Centro Oncológico Estatal ISSEMyM, ¹Unidad de Investigación Básica y Aplicada en Salud, Av. Solidaridad Las Torres No. 101. Toluca, Estado de México 50180, México.

²Departamento de Patología. Av. Solidaridad Las Torres No. 101. Toluca, Estado de México 50180, México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Sánchez-Hernández, L., Saavedra Sotelo, R., Torres-Corona, D. D., Aguirre-Quezada, D. E., Gómez-García, E. (2020). Different levels of expression of ALDH1A1 and DYRK1B in patients with glioblastoma multiforme and their overall survival. *Revista Bio Ciencias* 7, e762. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e762>



ABSTRACT

Glioblastoma multiforme is the most malignant form of central nervous system astrocytoma. The overall survival median in patients with glioblastoma is 12 to 16 months after undergoing resection surgery, chemo radiotherapy and adjuvant treatment; However, it is still unclear which molecular factors are involved in the determination of overall survival. Recent reports pointed out a specific isoform of aldehyde dehydrogenase (ALDH1A1), a protein participating in cellular metabolic processes, as a potential biomarker in glioblastoma. In this study, the expression of ALDH1A1 in biopsies of glioblastoma from Mexican patients was identified and evaluated using immunohistochemical dyes, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and

RESUMEN

El glioblastoma multiforme es la forma más maligna de astrocitoma del sistema nervioso central. La mediana de supervivencia global con glioblastoma es de 12 a 16 meses después de la cirugía de resección, la quimioterapia y el tratamiento adyuvante; sin embargo, aún no está claro qué factores moleculares están involucrados en la determinación de la supervivencia global. Informes recientes muestran la isoforma A1A de aldehído deshidrogenasa (ALDH1A1), una proteína que participa en los procesos metabólicos celulares, como un biomarcador potencial en glioblastoma. En este estudio, identificamos y evaluamos la presencia de ALDH1A1 en biopsias de glioblastoma de pacientes mexicanos mediante inmunohistoquímica, reacción en cadena de la polimerasa por retrotranscripción y análisis de espectroscopía de masas. Por otro lado, también analizamos mediante pruebas inmunohistoquímicas y western blot la presencia de DYRK1B, una quinasa implicada en la regulación de la progresión tumoral y en la regulación del ciclo celular.

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: June 29th 2019.

Accepted/Aceptado: February 6th 2020.

Available on line/Publicado: February 6th 2020.

*Corresponding Author:

Eva Gómez-García, Centro Oncológico Estatal ISSEMyM. Av. Solidaridad Las Torres No. 101. Toluca. Estado de México 50180, México. Phone: +521(722) 276 6820. E-mail: dra.eva.gomez@gmail.com

mass spectroscopy analyses. On the other hand, the presence of DYRK1B, a kinase involved in the regulation of tumor progression and in the regulation of the cell cycle was also analyzed using immunohistochemical detection and western blot. The purpose of this study was to investigate whether the histological expression, as well as the expression pattern of both proteins (ALDH1A1 and DIRK1B) presented a significant correlation with the overall survival in patients diagnosed with glioblastoma. Different expression patterns were found and both ALDH1A1 and DYRK1B showed similar expression patterns and an important correlation with the overall survival of patients. These findings allowed to consider the expression levels of ALDH1A1 and DYRK1B as possible prognostic factors in the diagnosis or possible biomarkers for survival time in patients with glioblastoma.

KEY WORDS

Glioblastoma, ALDH1A1, DYRK1B, survival time, immunohistochemistry, mass spectrometry.

Introduction

Glioblastoma Multiforme (GBM) is the most malignant tumor of astrocytoma, and it is classified by the World Health Organization as a grade IV (Natsume A., 2008; Van Den Bent *et al.*, 2017). It also has the worst prognosis of malignant neoplasms of the central nervous system (Louis *et al.*, 2001; Louis *et al.*, 2016; Ostrom *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2017), and reported median survival for Glioblastoma is only 12 to 15 months (Wen & Kesari, 2008., Stupp & Roila, 2009). However, it is unclear which molecular mechanisms could be related to the survival rate of patients. It has been shown that proteins involved in the main cellular metabolic processes can be altered in diseases such as cancer, especially for those involved in processes that promote proliferation and survival. The family of aldehyde dehydrogenase enzymes (ALDH) is made up of more than 12 isoforms with sub-isoforms of cytosolic and mitochondrial enzymes (Jelski *et al.*, 2014; Tomita *et al.*, 2016; Visus *et al.*, 2007), all with molecular weights of approximately 55 kDa. Their main function is the catalysis of aldehydes oxidation. It has been shown that this family is involved in different metabolic processes (Adam *et al.*, 2012) including the oxidation

El propósito de este estudio fue investigar si la expresión histológica, así como el patrón de expresión de ambas proteínas (ALDH1A1 y DIRK1B) tuvieron una correlación relevante con la supervivencia general de los pacientes diagnosticados con glioblastoma. Encontramos diferentes patrones de expresión y observamos que tanto ALDH1A1 como DYRK1B tienen patrones de expresión muy similares entre sí y ambas mostraron una importante correlación con la supervivencia general de los pacientes. Estos hallazgos nos permiten considerar que los niveles de expresión de ALDH1A1 y DYRK1B pueden ser posibles factores pronósticos en el diagnóstico o posibles biomarcadores para el tiempo de supervivencia en pacientes con glioblastoma.

PALABRAS CLAVE

Glioblastoma, ALDH1A1, DYRK1B, tiempo de supervivencia, inmunohistoquímica, espectrometría de masas.

Introducción

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor más maligno de los astrocitomas, y es clasificado por la Organización Mundial de la Salud como grado IV (Natsume A., 2008; Van Den Bent *et al.*, 2017). También tiene el peor pronóstico de las neoplasias malignas del sistema nervioso central (Louis *et al.*, 2001; Louis *et al.*, 2016; Ostrom *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2017), y la mediana de la supervivencia para el Glioblastoma reportada es solo de 12 a 15 meses (Wen & Kesari, 2008; Stupp & Roila, 2009). Sin embargo, no está claro, qué mecanismos moleculares podrían estar relacionados con la tasa de supervivencia de los pacientes. Se ha demostrado que las proteínas involucradas en los principales procesos metabólicos celulares, pueden ser alteradas en enfermedades como el cáncer, especialmente para aquellos procesos involucrados en la promoción de la proliferación y la supervivencia. La familia de enzimas aldehído deshidrogenasa (ALDH) está compuesta por más de 12 isoformas con sub-isoformas de enzimas citosólicas y mitocondriales (Jelski *et al.*, 2014; Tomita *et al.*, 2016; Visus *et al.*, 2007), todas con pesos moleculares de aproximadamente 55 kDa. Su función principal es la catálisis de la oxidación de aldehídos. Se ha demostrado que esta familia está involucrada en diferentes procesos metabólicos (Alexandra *et al.*, 2012), incluida la oxidación a través del procesamiento metabólico de los ácidos carboxílicos (Jelski *et al.*, 2014).

through metabolic processing of carboxylic acids (Jelski *et al.*, 2014).

ALDH1A1 is a cytosolic isoform, abundantly found in the liver, and involved in the main pathway of alcohol metabolism, along with alcohol dehydrogenase. Another important function of ALDH1A1 is the conversion of retinol to retinoic acid (Tomita *et al.*, 2016), and recent studies suggested that this could influence differentiation processes and act as diagnostic biomarkers in lung cancer and glioblastoma (Adam *et al.*, 2012; Arnold *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2016; Kalantari *et al.*, 2016; Rasper *et al.*, 2010; Wang, Wang *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2011). Other researchers proposed that the expression of ALDH1A1 contributes to the progression of the glioma, where overexpression was found in the high-grade glioma compared to the rest of glioma grades (Xu *et al.*, 2015), while ALDH1A1 was reported to be a poor predictor in another study, according to the expression of ALDH1A1 in GBM (Schäfer *et al.*, 2012). DYRK1B protein (dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1B) (Ashford *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2007) had also been reported to participate in the regulation of the cell cycle (Gao *et al.*, 2009) and its gene expression can be altered in tumor cells (Pérez-Sánchez *et al.*, 2018), for instance being overexpressed in some types of human cancer, such as non-small-cell lung cancer, pancreatic ductal adenocarcinoma, colon carcinoma, cervical cancer, ovarian cancer (Chen *et al.*, 2017; Deng *et al.*, 2006) and glioblastoma (Zhou *et al.*, 2017). The purpose of this study was to investigate whether the protein expression of ALDH1A1 and DYRK1B had any correlation with GBM diagnosis or with survival times regarding their expression patterns.

Material and Methods

Cell viability assays

U-87 MG Cell Line from human brain (glioblastoma/astrocytoma) was cultured in DMEM-HG (Dulbecco's Modified Eagle Medium High-Glucose, Gibco by Life Technologies), supplemented with 10 % fetal bovine serum (Gibco by Life Technologies), 1 % L-glutamine (Sigma-Aldrich Cat # G7513), 100 U/mL of Penicillin and 100 mg/mL of Streptomycin (Gibco by Life Technologies), and maintained at 37 °C in a 95 % air and 5 % CO₂ atmosphere. Cell viability was determined by Trypan blue exclusion

ALDH1A1 es una isoforma citosólica, que se encuentra abundantemente en el hígado y participa en la vía de señalización del metabolismo del alcohol, junto con alcohol deshidrogenasa. Otra función importante de ALDH1A1 es la conversión de retinol a ácido retinoico (Tomita *et al.*, 2016), y estudios recientes sugieren que esto podría influir en los procesos de diferenciación y actuar como biomarcadores de diagnóstico en cáncer de pulmón y glioblastoma (Alexandra *et al.*, 2012; Arnold *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2016; Kalantari *et al.*, 2016; Rasper *et al.*, 2010; Wang, Wang, & Chen, 2018; Zhang *et al.*, 2011). Otros investigadores han propuesto que la expresión de ALDH1A1 contribuye a la progresión del glioma, donde la sobreexpresión fue encontrada en gliomas de alto grado en comparación con el resto de los grados de gliomas (Xu *et al.*, 2015). Mientras que en otro estudio se reportó que ALDH1A1 es un mal pronóstico, de acuerdo con la expresión de ALDH1A1 en GBM (Schäfer *et al.*, 2012). También se ha reportado que la DYRK1B (dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1B) (Ashford *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2007) participa en la regulación del ciclo celular (Gao *et al.*, 2009) y su expresión génica puede verse alterada en células tumorales (Pérez-Sánchez *et al.*, 2018), por ejemplo, siendo sobreexpresada en algunos tipos de cáncer humano, tales como cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma ductal pancreático, carcinoma de colon, cáncer cervical, cáncer de ovario (Chen *et al.*, 2017; Deng *et al.*, 2006) y glioblastoma (Zhou *et al.*, 2017). El propósito de este estudio fue investigar si la expresión proteica de ALDH1A1 y DYRK1B tiene alguna correlación con el diagnóstico de GBM o con los tiempos de supervivencia con respecto a sus patrones de expresión.

Material y Métodos

Ensayos de viabilidad celular

La línea celular U87 MG derivada de cerebro humano (glioblastoma/astrocitoma) fue cultivada en DMEM-HG (Dulbecco's Modified Eagle Medium High-Glucose, Gibco by Life Technologies), suplementada con 10 % de suero fetal bovino (Gibco by Life Technologies), 1 % L-glutamina (Sigma-Aldrich Cat # G7513), 100 U/mL penicilina y 100 mg/mL de estreptomycin (Gibco by Life Technologies), y se mantuvo a 37 °C en una atmósfera de 95 % de aire y 5 % de CO₂. La viabilidad celular se determinó mediante la técnica de exclusión de azul Tripán (Strober, 2015) (Invitrogen Cat # 15250061, USA) 48 h

technique (Strober, 2015) (Invitrogen Cat # 15250061, USA) at 48 h after exposure to ALDH1A1 at different concentrations (Invitrogen Cat # 11388H07E25, USA), results were analyzed by One-way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison Test.

Human biopsies

This study was approved by the Comité de Ética en Investigación of the Centro Oncológico Estatal (COE) ISSEMyM, Estado de México under the protocol number: COE/UEI/PG/14/2017. No informed consents were required, due to the retrospective nature of the study. Data on patients' medical history and evolution were obtained from medical records of the hospital and samples were obtained from paraffin blocks. Ten samples of patients with glioblastoma, and one sample of each grade of glioma; GI, GII and GIII were used. All diagnoses were confirmed by imaging and by the department of pathology of the COE. All the patients with glioblastoma considered in this study were monitored from the beginning of their treatment (surgery and radiotherapy) and up to their death.

Immunohistochemistry

Tissue sections from healthy brain, healthy liver and infiltrating ductal breast carcinoma were kindly donated from the department of pathology of the COE and were used as control tissues. Slides were blocked with 1 % peroxide (Sigma) for 5 min at room temperature, washed with Phosphate-Buffered Saline (PBS), and incubated overnight at 4 °C in the presence of antibodies for either ALDH1A1 (D9J7R) XP (Cell Signaling, Danver, MA, USA, Cat. # 36671S 1:400) or DYRK1B (Sigma Aldrich, Cat # HPA028786, 1:400). Subsequently, samples were washed with PBS, and incubated at room temperature for one hour with a secondary antibody, using a Mouse/Rabbit ImmunoDetector DAB HRP Brown kit (Cat. # BSB 0003) according to manufacturer's instructions. Sections were counterstained with Harris hematoxylin (Sigma-Aldrich, HHS32-1L) and mounted using DPX mounting media. Slides were examined under a light microscope (Leica DM500). Images were obtained with Leica Microsystems Microscope imaging software, at 40X amplification. Ten independent fields were counted and analyzed by means of a One-way ANOVA followed by Newman-Keuls Multiple Comparison Test, and graphics were performed using GraphPad Prisma software.

después de la exposición con ALDH1A1 en diferentes concentraciones (Invitrogen Cat # 11388H07E25, USA), los resultados fueron analizados por ANOVA de una vía, seguida de la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Biopsias humanas

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Centro Oncológico Estatal (COE) ISSEMyM, Estado de México bajo el protocolo número: COE/UEI/PG/14/2017. No se requirieron consentimientos informados, debido a la naturaleza retrospectiva del estudio. Los datos sobre la historia y evolución de los pacientes se obtuvieron de los registros médicos del hospital y las muestras se obtuvieron de bloques de parafina. Diez muestras de pacientes con glioblastoma y una muestra de cada grado de glioma; GI, GII y GIII fueron utilizadas. Todos los diagnósticos fueron confirmados por imágenes y por el departamento de patología del COE. Todos los pacientes con glioblastoma considerados en este estudio fueron monitoreados desde el comienzo de su tratamiento (cirugía y radioterapia) y hasta su fallecimiento.

Inmunohistoquímica

Las secciones de tejido de cerebro sano, hígado sano y carcinoma ductal mamario infiltrante fueron amablemente donados por el departamento de patología del COE y se utilizaron como tejidos control. Los portaobjetos se bloquearon con 1 % de peróxido (Sigma) durante 5 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incubaron durante toda la noche a 4 °C en presencia de anticuerpos para ALDH1A1 (D9J7R) XP (Cell Signaling, Danver, MA, USA, Cat. # 36671S 1: 400) o DYRK1B (Sigma Aldrich, Cat # HPA028786, 1: 400). Posteriormente, las muestras se lavaron con PBS y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora con el anticuerpo secundario, usando un kit Brown/Rabbit ImmunoDetector DAB HRP Brown (Cat. # BSB 0003) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las secciones se contra tiñeron con hematoxilina Harris (Sigma-Aldrich, HHS32-1L) y se montaron usando medios de montaje DPX. Los portaobjetos se examinaron con un microscopio óptico (Leica DM500). Las imágenes se obtuvieron con el software de imágenes de microscopios Leica Microsystems, con una amplificación de 40X. Diez campos independientes fueron contados y analizados por medio de un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls, y los gráficos se realizaron utilizando el software GraphPad Prisma.

Mass spectrometry

In order to detect the presence of ALDH1A1 by electrospray ionization, direct infusion mass spectrometry analysis (ESI-MS/MS) (Arnold *et al.*, 2015; Kirwan *et al.*, 2014). Peptide samples were analyzed using a QTRAP 4500 mass spectrometry system (Sciex, San Francisco, CA) with a NanoSource. Samples were dewaxed and incubated in an Extraction Buffer using the Qproteome FFPE Tissue Kit (QIAGEN, USA Cat. # 37623) according to manufacturer's instructions. Total protein was isolated and processed for the generation of peptides. Briefly, total extract protein was reduced/alkylated and digested with trypsin (Promega, Cat. # V5111). Resulting peptides were extracted, desalted using a ZipipC-18 system (Millipore, Cat. # ZTC18S096) and resuspended in 20 % acetonitrile and 0.1 % formic acid (Aebersold & Mann, 2003; Megger *et al.*, 2017). A human recombinant ALDH1A1 protein (Invitrogen Cat. # 11388H07E25) was used as a control and received the same preparation treatment.

The distribution of molecules in Q1 was analyzed at a scan rate of 100 to 1000 m/z, Da, with 4500 Volts/150°C, then the ions for analysis in MS3 were selected using a de-clustering potential of 120, and a collision energy of 20 (Arnold *et al.*, 2015). Database searching for protein identification was performed using "Mascot MS/MS ion search" (Matrix Science: available at <http://www.matrixscience.com>) against Swiss-Prot and NCBI nr databases for *Homo sapiens* (human) AA protein databases. Cleavage tolerances of ± 1.2 Da were used for the precursor ion and ± 0.6 Da for masses of ion fragments. Monoisotopic mass values and unrestricted mass values were considered. Additionally, matching peptide sequences were analyzed using MS-BLAST software (Washington University, Saint Louis, MO; Available at: <http://genetics.bwh.harvard.edu/msblast/>) against Swiss-Prot and NCBI nr databases to confirm that peptides matched.

Imaging

Representative images of 3 patients with Glioblastoma multiforme were taken from their clinical record of the hospital.

Reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR)

The presence of ALDH1A1 was additionally

Espectrometría de masas

Para detectar la presencia de ALDH1A1 mediante ionización por electrospray, se utilizó el análisis de espectrometría de masas por infusión directa (ESI-MS/MS) (Arnold *et al.*, 2015; Kirwan *et al.*, 2014). Las muestras de péptidos se analizaron usando un sistema de espectrometría de masas QTRAP 4500 (Sciex, San Francisco, CA) con una NanoSource. Las muestras se desparafinaron e incubaron en un buffer de extracción utilizando el kit Qproteome FFPE Tissue Kit (QIAGEN, USA Cat. # 37623) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las proteínas totales se aislaron y se procesaron para la generación de péptidos. Brevemente, el extracto total de proteínas se redujo/alquiló y digirió con tripsina (Promega, Cat. # V5111). Los péptidos resultantes fueron extraídos, desalados con un sistema ZipipC-18 (Millipore, Cat. # ZTC18S096) y resuspendidos en 20 % acetonitrilo y 0.1 % ácido fórmico (Aebersold & Mann, 2003; Megger *et al.*, 2017). La proteína ALDH1A1 humana recombinante (Invitrogen Cat. # 11388H07E25) se usó como control y recibió el mismo tratamiento de preparación.

La distribución de las moléculas en Q1 se analizó a una velocidad de exploración de 100 a 1000 m/z, Da, con 4500 Volts/150 °C, luego los iones para el análisis en MS3 fueron seleccionados usando un de-clustering potencial de 120 y una energía de colisión de 20 (Arnold *et al.*, 2015). La búsqueda en la base de datos para la identificación de proteínas se realizó utilizando el buscador de iones "Mascot MS/MS ion search" (Matrix Science: disponible en <http://www.matrixscience.com>) con la base de datos AA Swiss-Prot y NCBI nr para *Homo sapiens* (humano). Se utilizaron tolerancias de escisión de ± 1.2 Da para el ion precursor y ± 0.6 Da para las masas de los fragmentos de iones. Se consideraron los valores de masa monoisotópica y los valores no restringidos de masa. Adicionalmente, las secuencias de péptidos coincidentes se analizaron utilizando el software MS-BLAST software (Washington University, Saint Louis, MO; disponible en <http://genetics.bwh.harvard.edu/msblast/>) contra las bases de datos Swiss-Prot and NCBI nr para confirmar la coincidencia de los péptidos.

Imagen

Se tomaron imágenes representativas de 3 pacientes con glioblastoma multiforme de su registro clínico del hospital.

Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

La presencia de ALDH1A1 se evaluó adicionalmente

assessed using RT-PCR. For RNA extraction, biopsy samples were dewaxed (Bonin & Stanta, 2013) and then washed twice in cold PBS, pH 6.8. Then, total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Cat # 15596026, USA) following manufacturer's instructions. RNA concentration was measured by optical density using absorbance at 260 nm in a Multiskan GO light spectrometer (Thermo Scientific). RNA quality was verified by agarose gel electrophoresis by means of a BioDoc-UVP imaging system, as well as by 260/280 nm ratios. RT-PCR was performed using 5 µg of RNA which was treated with DNase (New England BioLabs, Cat # M0303S) and using MMLV reverse transcriptase (Invitrogen, Cat # 28025013, USA), following manufacturer's instructions. To amplify ALDH1A1, the following primers were used: forward 5'-CCG TGG CGT ACT ATG GAT GC-3' and reverse 5'-CGC AAT GTT TTG ATG CAG CCT-3', for β -Actin, the primers used were: forward 5'-TGG CACC ACA CCT TCT ACA-3' and reverse 5'-TCA CGC ACG ATT TCC C-3'.

Western blot assays

Total protein extraction was performed using a lysis buffer kit for tissue Qproteome FFPE Tissue Kit (QIAGEN, USA Cat. # 37623) following manufacturer's instructions. Samples containing 50 µg of total protein were separated on 12 % SDS-PAGE gels and transferred onto polyvinylidene-difluoride membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Membranes were blocked for 1 h at room temperature in 5 % skimmed milk, Tris-buffered saline with 0.1 % Tween-20, and then incubated at 4 °C overnight with primary antibodies against human ALDH1A1 (D9J7R) XP (Cell Signaling, Danver, MA, USA, Cat. # 36671S 1:1000) or DYRK1B (Sigma Aldrich, Cat # HPA028786, 1:1000). Blots were washed and incubated with a HRP-Goat/anti-rabbit secondary anti-body (Invitrogen Life Technologies, Cat. # 656120, 1:5000). As a positive control, blots were stripped and tested again with a monoclonal anti- β -actin antibody (Sigma-Aldrich, Cat. # A3854, 1:1000) and then with a goat anti-mouse antibody (Invitrogen, Cat. # 62-6520, 1:5000). Secondary antibodies were coupled with peroxidase (Life Technologies, Rockford, IL, USA) and proteins were revealed with Western Lightning® Plus-ECL, Enhanced Chemi-luminescence Substrate (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). Images from the films were digitally acquired with a BioDoc-It Imaging System (UVP).

utilizando RT-PCR. Para la extracción de RNA, las muestras de biopsia se desparafinaron (Bonin & Stanta, 2013) y se lavaron dos veces en PBS frío, pH 6.8. Después se extrajo el RNA total utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen, Cat # 15596026, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de RNA fue medida por densidad óptica utilizando la absorbancia de 260 nm en un espectrómetro de luz Multiskan GO (Thermo Scientific). La calidad del RNA fue verificada por electroforesis en geles de agarosa con ayuda de un sistema de imagen BioDoc-UVP, así como por la relación 260/280 nm. La RT-PCR se realizó utilizando 5 µg de RNA el cual fue tratado con DNasa (New England BioLabs, Cat # M0303S) y utilizando la transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen, Cat # 28025013, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para amplificar ALDH1A1, se usaron los siguientes cebadores: *forward* 5'-CCG TGG CGT ACT ATG GAT GC-3' y *reverse* 5'-CGC AAT GTT TTG ATG CAG CCT-3', para β -Actina, los cebadores utilizados fueron: *forward* 5'-TGG CACC ACA CCT TCT ACA-3' y *reverse* 5'-TCA CGC ACG ATT TCC C-3'.

Ensayos de Western blot

La extracción de proteína total se realizó usando un kit de buffer de lisis para tejido Qproteome FFPE Tissue Kit (QIAGEN, USA Cat. # 37623) siguiendo las instrucciones del fabricante. Muestras con 50 µg de contenido de proteína total fueron separadas en geles de SDS-PAGE al 12 % y transferidas en membranas de difluoruro de polivinilideno (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Las membranas fueron bloqueadas por 1 h a temperatura ambiente con leche descremada al 5 %, buffer Tris-salino con 0.1 % Tween-20, y luego se incubaron a 4 °C toda la noche con el anticuerpo primario contra ALDH1A1 (D9J7R) XP (Cell Signaling, Danver, MA, USA, Cat. # 36671S 1:1000) o DYRK1B humano (Sigma Aldrich, Cat # HPA028786, 1:1000). Las transferencias se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario HRP-Cabra/anti-conejo (Invitrogen Life Technologies, Cat. #656120, 1:5000). Como control positivo, las membranas fueron desnudadas y se volvieron a probar con el anticuerpo monoclonal anti- β -actina (Sigma-Aldrich, Cat. # A3854, 1:1000) y luego con un anti-ratón de cabra (Invitrogen, Cat.#62-6520, 1:5000). Los anticuerpos secundarios se acoplaron con peroxidasa (Life Technologies, Rockford, IL, USA) y las proteínas se revelaron con sustrato de quimioluminiscencia mejorada Western Lightning® Plus-ECL, (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). Las imágenes de las películas se adquirieron digitalmente con un sistema de imagen BioDoc-It (UVP).

Results and Discussion

Identification of ALDH1A1 in Glioblastoma tissue

Firstly, the clinical history of the patients was reviewed (Table 1), as well as tomographic images (Figure 1a-c) of the glioblastomas. Tissue biopsies were characterized, and the presence of ALDH1A1 was additionally assessed using RT-PCR (Figure 1d) and mass spectrometry (Figure 2).

Effect of ALDH1A1 in cell growth of U87-MG glioblastoma cells

To evaluate the effect of ALDH1A1 on cell viability, human glioblastoma U87-MG cells were treated with different concentrations of purified recombinant ALDH1A1 protein (Figure 3). The cultures were evaluated at 48 hours after treatment, the number of viable cells was quantified using Trypan blue exclusion assay. The vehicle without protein was used as a control. ALDH1A1 was observed to induce an increase in the number of viable cells due to the increase in proliferation, in a concentration-dependent way. The increase in cell viability was believed to be related to cellular metabolic processes since this has been also reported by other authors (Tomita et al., 2016; Yue et

Resultados y Discusión

Identificación de ALDH1A1 en tejido de glioblastoma

En primer lugar, se revisó la historia clínica de los pacientes (Tabla 1), así como las imágenes tomográficas (Figura 1a-c) de los glioblastomas. Se caracterizaron las biopsias de tejido, y la presencia de ALDH1A1 se evaluó adicionalmente usando RT-PCR (Figura 1d) y espectrometría de masas (Figura 2).

Efecto de ALDH1A1 en el crecimiento celular de células de glioblastoma U87-MG

Para evaluar el efecto de ALDH1A1 sobre la viabilidad celular, células de glioblastoma humano U87-MG fueron tratadas con diferentes concentraciones de proteína ALDH1A1 recombinante purificada (Figura 3). Los cultivos se evaluaron a las 48 horas después del tratamiento, se cuantificó el número de células viables usando el ensayo de exclusión de azul Tripano. El vehículo sin proteína se utilizó como control. Se observó que ALDH1A1 inducía un aumento en el número de células viables debido al aumento en la proliferación, de una manera dependiente de la concentración. Se cree que el aumento en la viabilidad celular está relacionado con los procesos metabólicos

Table 1.
Clinical characteristics of patient's GBM.
Tabla 1.
Características clínicas del paciente con GBM.

Glioma grade	Age (years)	Sex		Medical records					Tumo location					RT Cycles	CT	Time survival (months)
		Male	Female	DM	HT	Ht	SMOH	ALD	Fro	Par	Occ	Right	Left			
GBM	29		+			+			+				+	30	Tmz, Bvz	47
GBM	42	+					+	+	+	+			+	30	Tmz	8
GBM	47	+			+	+	+	+		+		+		25	Tmz	6
GBM	59	+			+	+	+	+		+	+	+		34	Tmz	15
GBM	60	+					+		+	+				0	neither	1
GBM	60	+					+		+	+		+	+	0	neither	1
GBM	61		+			+	+	+	+	+			+	30	Tmz, Cbp	3
GBM	62	+			+				+	+			+	22	Tmz	2
GBM	65	+			+		+	+	+				+	32	Tmz	4
GBM	72		+		+		+	+		+	+		+	29	Tmz	3

DM= Diabetes mellitus; HT= Hyperthyroidism; Ht= Hypertension; SMOH=Smoking; ALD= Alcoholic disease. Fro=Frontal; Par= Parietal; Occ= Occipital. Tmz= Temozolamide; Bvz= Bevacizumab; Cbp= Carboplatin.

DM= Diabetes mellitus; HT= Hipertiroidismo; Ht= Hipertensión; SMOH= Fumador; ALD= Alcohólico. Fro=Frontal; Par= Parietal; Occ= Occipital. Tmz= Temozolamida; Bvz= Bevacizumab; Cbp= Carboplatino.

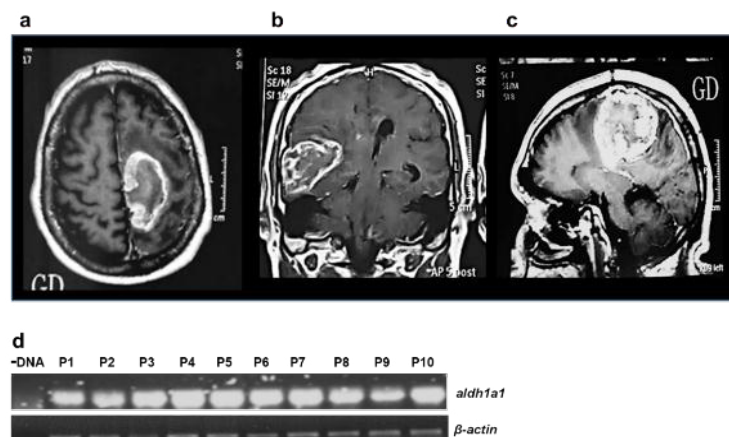


Figure 1. Glioblastoma (GBM). Representative magnetic resonance images of three different patients with GBM. Images show single tumors with central necrosis and peripheral reinforcement associated with the Gadolinium (GD) contrast medium associated with extensive peripheral ring edema were identified; a) Tumor in axial section. b) Tumor in coronal section and in c) Tumor in Parasagittal section. d) RT-PCR analysis specific for *aldh1a1* and β -actin in the samples of patient's with GBM, as negative control no DNA was added in the assay.

Figura 1. Glioblastoma (GBM). Imágenes representativas de resonancia magnética de tres pacientes diferentes con GBM. Las imágenes muestran tumores únicos con necrosis central y refuerzo periférico asociado con el medio de contraste de Gadolinio (GD) asociado con un extenso edema de anillo periférico; a) Tumor en corte axial. b) Tumor en corte coronal y en c) Tumor en corte parasagital. d) Análisis de RT-PCR específico para *aldh1a1* y β -actina en las muestras del paciente con GBM, como control negativo no se agregó DNA en el ensayo.

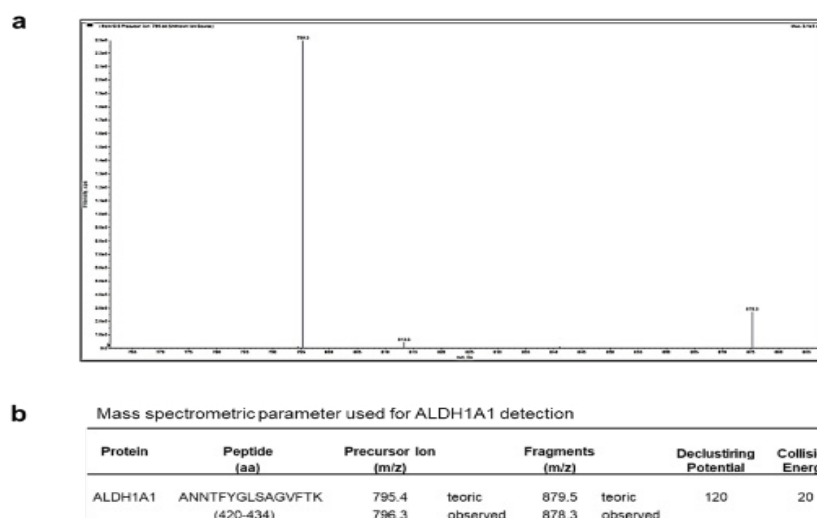


Figure 2. ALDH1A1 detected in Glioblastoma tissue. a) A representative mass spectrum of precursor ion 796.3 m/z of ALDH1A1 in MS3 using an ESI-MS/MS-based peptide method. The precursor ion corresponded to the peptide ANNTFYLSAGVFTK this sequence was analyzed by Blast-nucleotide and corresponded to the alpha chain of the aldehyde dehydrogenase (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). b) Mass spectrometric parameters used for ALDH1A1 detection.

Figura 2. ALDH1A1 detectado en tejido de glioblastoma. a) Un espectro de masas representativo del ion precursor 796.3 m/z de ALDH1A1 en MS3 usando un método de péptidos basado en ESI-MS/MS. El ion precursor corresponde al péptido ANNTFYLSAGVFTK, esta secuencia fue analizada por Blast-nucleotide y correspondió a la cadena alfa de la aldehído deshidrogenasa (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). b) Parámetros espectrométricos de masas utilizados para la detección de ALDH1A1.

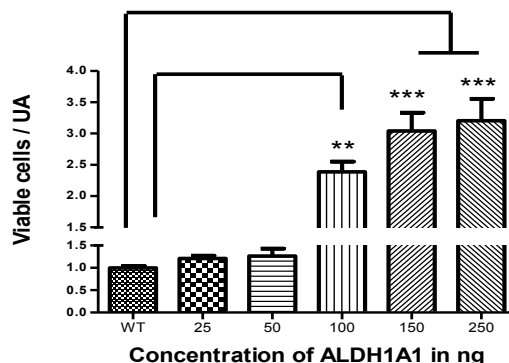


Figure 3. ALDH1A1 increased cell viability in U87-MG glioblastoma cells. ALDH1A1 induced an increase in the number of viable cells in a concentration-dependent way. Effect of ALDH1A1 on viability of U-87 MG cells. The graph shows arbitrary unit of the viable U-87 MG cells, as determined by the Trypan blue exclusion 48 hours after treated with different concentrations of purified recombinant ALDH1A1. Controls were treatment with the vehicle without protein. The concentrations of 25 and 50 ng/μL did not show significant difference in comparison with the control group. The control was different from the groups; 100 ng/μL, 150 ng/μL and 250 ng/μL. The concentration of 250 ng/μL was different in comparison with the control but was not for the 150 ng/μL or 100 ng/μL concentration. One-way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison Test. ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$. Bar are mean + S.D., $n = 3$.

Figura 3. ALDH1A1 aumenta la viabilidad celular en células U87-MG de glioblastoma. ALDH1A1 indujo un aumento en el número de células viables de una manera dependiente de la concentración. Efecto de ALDH1A1 en la viabilidad celular en células U87-MG. La gráfica muestra unidades arbitrarias de la células U87-MG viables, determinada por exclusión del azul Tripano a las 48 horas después de tratarse con diferentes concentraciones de ALDH1A1 purificada recombinante. Los controles fueron tratados con el vehículo sin proteína. Las concentraciones de 25 y 50 ng/μL no mostraron diferencia significativa en comparación con el grupo control. El control es diferente de los grupos; 100 ng/μL, 150 ng/μL y 250 ng/μL. La concentración de 250 ng/μL es diferente en comparación con el grupo control, pero no lo es para la concentración de 150 ng/μL o 100 ng/μL. ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$. Las barras son medias + S.D., $n = 3$.

al., 2015) regarding the participation of ALDH1A1 in the process of cell growth and proliferation.

Glioblastoma tissues presented immunoreactivity to ALDH1A1 and DYRK1B

ALDH1A1 and DYRK1B expression was assessed in glioblastoma tissues by immunohistochemical staining. Different expression patterns were observed and classified according to their intensity in tumor cells (Figure 3, 4). Three categories were established: focal, weak scattered and negative in neoplasm (but positive in endothelium). DYRK1B also showed immunoreactivity in glioblastoma tissue, and its expression pattern was very similar to that of ALDH1A1, equal variances were observed between ALDH1A1 and DYRK1B ($p = 0.2881$), therefore the same classification was used. With the previous observations, ALDH1A1 and DYRK1B expression was assessed in low-grade gliomas (Figure 4) by immunohistochemistry. Interestingly, in grade I it was negative; in grade II it showed a weak focal, while in grade III a weak scattered expression

celulares, ya que otros autores también lo han informado (Tomita et al., 2016; Yue et al., 2015) con respecto a la participación de ALDH1A1 en el proceso de crecimiento celular y proliferación.

Tejidos de glioblastoma presentaron inmunoreactividad a ALDH1A1 y DYRK1B

La expresión de ALDH1A1 y DYRK1B se evaluó en los tejidos de glioblastoma mediante tinción inmunohistoquímica. Se observaron diferentes patrones de expresión y se clasificaron según su intensidad en las células tumorales (Figura 3, 4). Se establecieron tres categorías: focal, débil disperso y negativo en neoplasia (pero positiva en endotelio). DYRK1B también mostró inmunorreactividad en tejido de glioblastoma, y su patrón de expresión era muy similar al de ALDH1A1, se observaron varianzas iguales entre ALDH1A1 y DYRK1B, ($p = 0.2881$), por lo que se utilizó la misma clasificación. Con las observaciones anteriores, la expresión de ALDH1A1 y DYRK1B fue evaluada en gliomas de bajo grado (Figura 4)

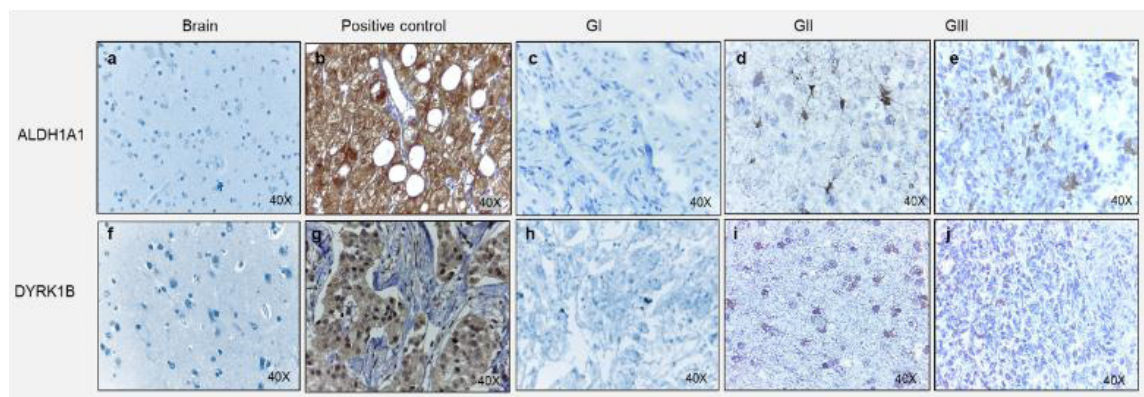


Figure 4. Expression of ALDH1A1 and DYRK1B into gliomas. Representative images of immunohistochemical assays for ALDH1A1 and DYRK1B in different grade gliomas. For ALDH1A1; a) Healthy brain, b) Healthy liver as a positive control, c) Glioma Grade I (GI), d) Glioma Grade II (GII), e) Glioma Grade III (GIII). For DYRK1B; f) Healthy brain, g) Invasive ductal breast carcinoma as a positive control, h) Glioma Grade I (GI), i) Glioma Grade II (GII), j) Glioma Grade III (GIII). Images at 40X magnification.

Figura 4. Expresión de ALDH1A1 y DYRK1B en gliomas. Imágenes representativas de ensayos inmunohistoquímicos para ALDH1A1 y DYRK1B en diferentes grados de gliomas. Para ALDH1A1; a) Cerebro sano, b) Hígado sano como control positivo, c) Glioma Grado I (GI), d) Glioma Grado II (GII), e) Glioma Grado III (GIII). Para DYRK1B; f) Cerebro sano, g) Carcinoma ductal invasivo de mama como control positivo, h) Glioma Grado I (GI), i) Glioma Grado II (GII), j) Glioma Grado III (GIII). Imágenes en magnificación 40X.

was observed. These differences in expression patterns in the glioblastoma (Figure 5) were believed to be related to the progress of the disease, and it is important to continue investigating this point. ALDH1A1 and DYRK1B expression was observed in tumors samples by western blot technique as well (Figure 6a-b), in the focal group, the signal was more intense regarding weak scattered and negative neoplasm compared to the healthy brain sample, while for DYRK1B the signal was more intense in focal and weak scattered compared to the healthy brain sample.

DYRK1B and ALDH1A1 expression patterns have significant correlation with overall survival

The number of positive cells per field for ALDH1A1 and DYRK1B was quantified, analyzed and evaluated against overall survival per patient (Figure 6e). For each patient, the tropism between ALDH1A1 and DYRK1B in the samples was equivalent. Because immunoreactivity patterns showed interesting results, the correlation of the quantity of positive cells *versus* the survival time was analyzed, with a value of -0.874, therefore this trend was believed to play an important role in the development of the disease. The greatest overall survival was observed in the classification of

por inmunohistoquímica. Interesantemente, en el grado I fue negativo; en el grado II mostró un focal débil, mientras que en el grado III se observó una expresión débil disperso. Se cree que estas diferencias en los patrones de expresión en el glioblastoma (Figura 5) pueden tener alguna relación con el progreso de la enfermedad, y es importante continuar investigando. La expresión de ALDH1A1 y DYRK1B también se observó en las muestras de tumores mediante la técnica de Western blot (Figura 6a-b), en el grupo focal, la señal fue más intensa con respecto a la débil disperso y neoplasia negativa en comparación con la muestra de cerebro sano, mientras que para DYRK1B la señal fue más intensa en focal y débil disperso en comparación con la muestra de cerebro sano.

Los patrones de expresión de DYRK1B y ALDH1A1 tienen una correlación significativa con la supervivencia general

El número de células positivas por campo para ALDH1A1 y DYRK1B se cuantificó, analizó y evaluó frente a la supervivencia general por paciente (Figura 6e). Para cada paciente, el tropismo entre ALDH1A1 y DYRK1B en las muestras fue equivalente. Debido a que los patrones de inmunoreactividad mostraron resultados interesantes, se analizó la correlación de la cantidad de células positivas vs

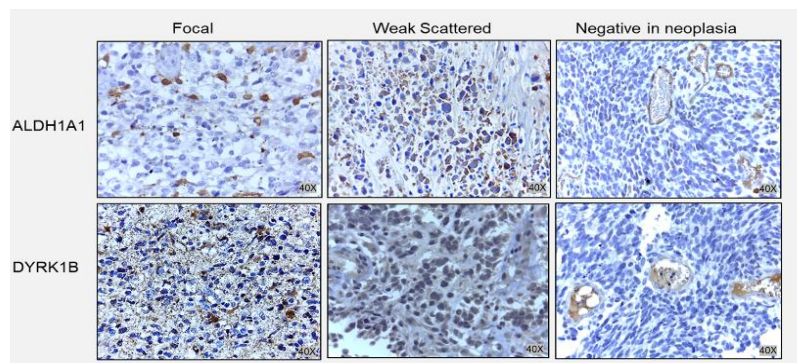


Figure 5. Expression patterns of ALDH1A1 and DYRK1B in Glioblastoma. Representative images of immunohistochemical assays for ALDH1A1 and DYRK1B. Healthy human brain tissue was used as a negative control for ALDH1A1 and DYRK1B, healthy liver tissue was used as a positive control for ALDH1A1, and invasive ductal breast carcinoma tissue was used as a positive control for DYRK1B. Three different expression patterns were observed in the tissues of glioblastoma tissue patients; Focal, Weak Scattered and Negative in neoplasm (but positive in endothelium). Images at 40X magnification.

Figura 5. Patrones de expresión de ALDH1A1 y DYRK1B en Glioblastoma. Imágenes representativas de ensayos inmunohistoquímicos para ALDH1A1 y DYRK1B. Se usó tejido cerebral humano sano como control negativo para ALDH1A1 y DYRK1B, se utilizó tejido hepático sano como control positivo para ALDH1A1 y se utilizó tejido de carcinoma ductal invasivo como control positivo para DYRK1B. Se observaron tres patrones de expresión diferentes en los tejidos de pacientes con tejido de glioblastoma; focal, débil disperso y negativo en neoplasia (pero positivo en endotelio). Imágenes en magnificación 40X.

negative neoplasm expression, while the classification of weak scattered expression had the lowest.

Discussion

Glioblastoma multiforme is a disease with particularly poor prognosis and a short overall survival. It has been shown that proteins involved in main cell metabolic processes can be altered in diseases such as cancer, especially in those involved in processes that promote proliferation and survival. The presence of DYRK1B in glioblastoma, which has been characterized for this specific type of cancer (Vilenchik et al., 2019), and which has been stably found in clinical samples, has shown an expression pattern similar to ALDH1A1, and an inverse correlation with overall survival of patients of this study, although there was a controversy regarding the presence of ALDH1A1 and survival, such as Adam et al. 2012 who described ALDH1A1 as a marker of astrocytic differentiation during brain development and a better prognosis marker in patients suffering from primary glioblastoma. This will hopefully allow for new lines of research regarding signaling pathways in glioblastoma to emerge, hoping to elucidate the mechanisms towards which pathways for cell cycle signaling and apoptosis converge. There are other reports such as Rasper et al. 2010 where they

el tiempo de supervivencia con un valor de -0.874 , por lo que se cree que esta tendencia juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. La mayor supervivencia global se observó en la clasificación de expresión de neoplasia negativa, mientras que la clasificación de expresión débil disperso tuvo la más baja.

Discusión

El glioblastoma multiforme es una enfermedad con un pronóstico particularmente pobre y una supervivencia general corta. Se ha demostrado que las proteínas involucradas en los principales procesos metabólicos de las células pueden alterarse en enfermedades como el cáncer, especialmente en aquellas involucradas en procesos que promueven la proliferación y la supervivencia. La presencia de DYRK1B en el glioblastoma, que se ha caracterizado en este tipo específico de cáncer (Vilenchik et al., 2019), y que han sido encontradas de manera estable en muestras clínicas, ha mostrado un patrón de expresión similar a ALDH1A1, y una correlación inversa con la supervivencia general de los pacientes en este estudio, aunque existe controversia con respecto a la presencia de ALDH1A1 y la supervivencia, como Adam et al. 2012 que describieron ALDH1A1 como un marcador de diferenciación astrocítica durante el desarrollo cerebral y un mejor marcador de pronóstico en pacientes que sufren glioblastoma primario. Con suerte, esto permitirá que surjan nuevas

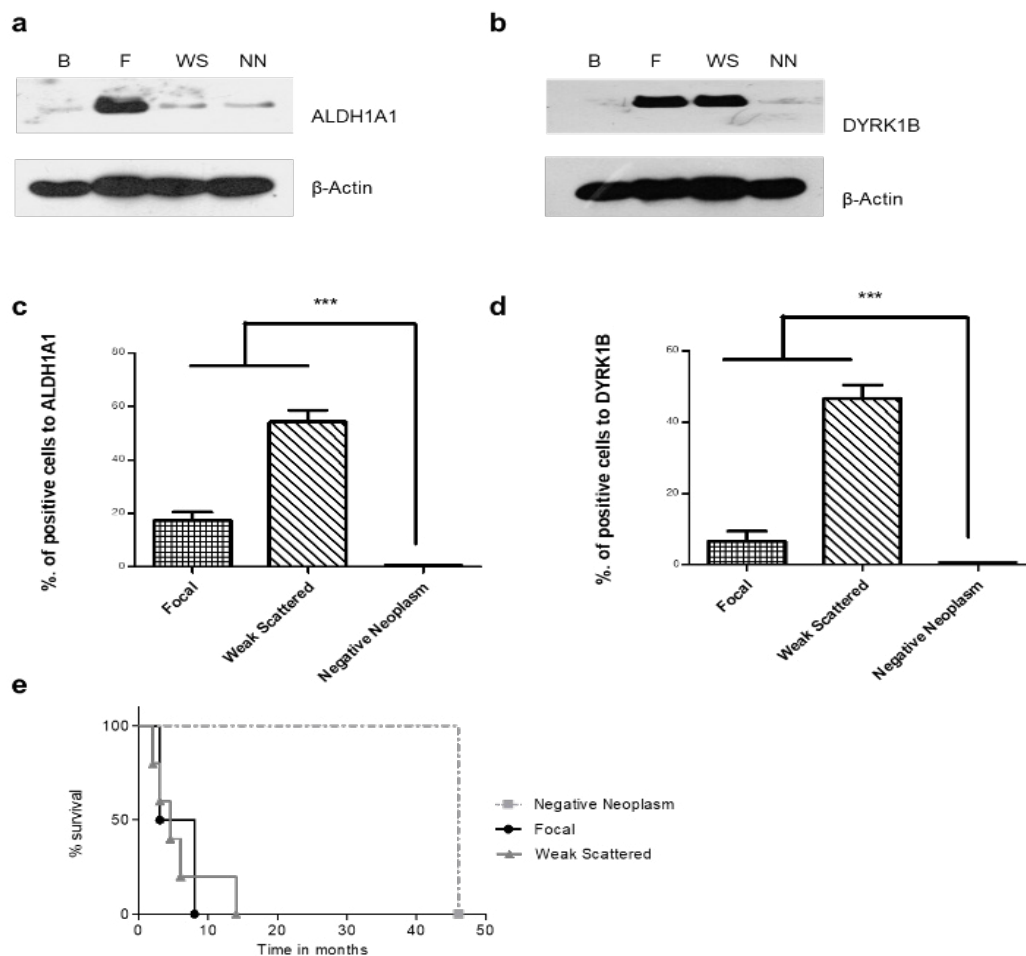


Figure 6. Expression of ALDH1A1 and DYRK1B in Glioblastoma tissues and time of survival in patient's Glioblastoma.

A representative image of western blot. a-b) Show ALDH1A1 and DYRK1B expression and β -actin as a control, determined by Western blot. c-d) Percentage of positive cells for ALDH1A1 and DYRK1B respect to their observed expression pattern. One-way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison Test. e) Graph of survival time with respect to ALDH1A and DYRK1B expression pattern. Kaplan-Meier, n=10.

Figure 6. Expresión de ALDH1A1 y DYRK1B en tejidos de Glioblastoma y tiempo de supervivencia en pacientes con Glioblastoma.

Una imagen representativa de Western blot. a-b) Muestra la expresión de ALDH1A1, DYRK1B y como control β -actina, determinado por Western blot. c-d) Porcentaje de células positivas para ALDH1A1 y DYRK1B con respecto a su patrón de expresión observado. ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. e) Gráfica del tiempo de supervivencia con respecto al patrón de expresión de ALDH1A y DYRK1B. Kaplan-Meier, n=10.

reported that ALDH1+ cells were found close to tumor vessels or around necrotic areas, hypothesizing GBM Tumor Stem Cells to be predominantly localized in the proximity of tumor vessels showing close interaction with endothelial cells, as well Tomita *et al.* 2016 indicated that ALDH1A is a novel stem cell marker and is present in different types of cancers. Many more

líneas de investigación sobre las vías de señalización en el glioblastoma, con la esperanza de dilucidar los mecanismos en los que convergen las vías para la señalización del ciclo celular y apoptosis. Hay otros informes, como Rasper *et al.* 2010 donde informan que se encontraron células ALDH1+ cerca de los vasos tumorales o alrededor de áreas necróticas, hipotetizando que las células madre tumorales de GBM se

questions have been raised on this topic, and it is necessary to continue investigating the consequences of over-expression of DYRK1B in glioblastoma, and the differences in histological patterns of expression. The relationship between ALDH1A1 expression and the clinical prognosis in different degrees of glioma (Adam et al., 2012; Liu et al., 2017; Xu et al., 2015) and among patients with GBM is increasingly evident. Altogether, the high ALDH1A1 expression is proposed as poor prognostic. In addition, ALDH1A1 is considered as a promising objective to improve the treatment of GBM according to its previous role as a mediator for temozolomide resistance in patients with GBM (Schäfer et al., 2012), where a greater number of research studies on its behavior is required at the molecular level. On the other hand, although ALDH1A1 has been reported in several types of cancers (Gong et al., 2014), including glioblastoma, it is also important to investigate further why these different expression patterns occur. Correlation analyses of ALDH1A1 and DYRK1B expression patterns vs overall survival left many questions unanswered. DYRK1B, as well as ALDH1A1, were believed to have an important participation in the progression of the disease, and should be more thoroughly studied in GBM, given their potential as prognostic markers (Gong et al., 2014; Rasper et al., 2010) or new therapeutic targets. Although ALDH1A1 and DYRK1B (Friedman, 2013; He et al., 2018; Huangfu & Anderson, 2005; Olmez et al., 2015) are completely different proteins, it is necessary to carry out more studies in order to determine the pathways in which they are involved, and whether there is any one they share. One perspective for the future is to quantify ALDH1A1 expression levels with respect to DYRK1B using qPCR, and to evaluate how this correlates with the activation of other growth-dependent kinases active in the neurological system, such as Akt, Erk, or cyclin D1. Moreover, determining ALDH1A1 and DYRK1B expression levels in plasma compared to the levels found in the tumor tissue would help assess whether disruptions in the expression of these two genes can be detected in earlier stages of the disease through peripheral blood screening. The finding in this project allowed to observe the detection of DYRK1B in glioblastoma, with different expression patterns and an expression behavior that closely resembles the one observed in ALDH1A1 as well as the tendency that these patterns have regarding the survival time.

localizan predominantemente en la proximidad de los vasos tumorales que muestran una estrecha interacción con células endoteliales, también Tomita et al. 2016 indicaron que ALDH1A es un nuevo marcador de células madre y está presente en diferentes tipos de cáncer. Se han planteado muchas preguntas al respecto, y es necesario continuar investigando las consecuencias de la sobreexpresión de DYRK1B en el glioblastoma y las diferencias en los patrones histológicos de expresión. La relación entre la expresión de ALDH1A1 y el pronóstico clínico en diferentes grados de glioma (Alexandra et al., 2012; Liu et al., 2017; Xu et al., 2015) y entre pacientes con GBM es cada vez más evidente. En conjunto, la alta expresión de ALDH1A1 se propone como pronóstico pobre. Además, ALDH1A1 se considera un objetivo prometedor para mejorar el tratamiento de GBM de acuerdo con su papel previo como mediador de la resistencia a la temozolomida en pacientes con GBM (Schäfer et al., 2012), lo que requiere un mayor número de investigaciones de su comportamiento a nivel molecular. Por otro lado, aunque ALDH1A1 ha sido reportado en varios tipos de cánceres (Gong et al., 2014), incluido el glioblastoma, también es importante que investiguemos más el por qué ocurren estos diferentes patrones de expresión. Los análisis de correlación de los patrones de expresión de ALDH1A1 y DYRK1B vs la supervivencia general dejan muchas preguntas sin respuesta. Se cree que DYRK1B, así como ALDH1A1, tienen una participación importante en la progresión de la enfermedad y deben estudiarse más a fondo en GBM, dado su potencial como marcadores pronósticos (Gong et al., 2014; Rasper et al., 2010) o nuevos objetivos terapéuticos. Aunque ALDH1A1 y DYRK1B (Friedman, 2013; He et al., 2018; Huangfu & Anderson, 2005; Olmez et al., 2015) son proteínas completamente diferentes, es necesario realizar más estudios para determinar las vías en las que están involucrados, y si hay alguna otra que compartan. Una perspectiva que tenemos para el futuro es cuantificar los niveles de expresión de ALDH1A1 con respecto a DYRK1B usando qPCR, y evaluar cómo esto se correlaciona con la activación de otras quinasas dependientes del crecimiento activas en el sistema neurológico, tal como Akt, Erk, o ciclina D1. Además, determinar los niveles de expresión de ALDH1A1 y DYRK1B en plasma en comparación con los niveles encontrados en el tejido tumoral ayudaría a evaluar si las interrupciones en la expresión de estos dos genes pueden detectarse en etapas más tempranas de la enfermedad a través de exámenes de sangre periférica. El hallazgo en este proyecto permitió observar la detección de DYRK1B en el glioblastoma, con diferentes patrones de expresión y un comportamiento de expresión que se parece mucho al observado en ALDH1A1, así como la tendencia que tienen estos patrones con respecto al tiempo de supervivencia.

Conclusion

The most relevant finding in this project was the detection of DYRK1B in GBM, with different expression patterns and an expression behavior that closely resembles the one observed for ALDH1A1. These findings allowed to consider that ALDH1A1 and DYRK1B expression levels may be prognostic factors in the diagnosis or possible biomarkers for overall survival in patients with glioblastoma.

Acknowledgments

This work was supported by the Instituto de Seguridad Social del Estado de México y Municipios (ISSEMyM), the Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT) and the Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex), grant number 848-2007. We want to thank Andrés Reyes and Verónica Fabela for laboratory assistance.

References

- Aebersold, R. & Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422(6928), 198–207. <https://doi.org/10.1038/nature01511>
- Alexandra Adam, S., Schnell, O., Pöschl, J., Eigenbrod, S., Kretzschmar, H. A., Tonn, J. C. and Schüller, U. (2012). ALDH1A1 is a marker of astrocytic differentiation during brain development and correlates with better survival in glioblastoma patients. *Brain Pathology*, 22(6), 788–797. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2012.00592.x>
- Arnold, S. L., Kent, T., Hogarth, C. A., Schlatt, S., Prasad, B., Haenisch, M. and Isoherranen, N. (2015). Importance of ALDH1A enzymes in determining human testicular retinoic acid concentrations. *Journal of Lipid Research*, 56(2), 342–357. <https://doi.org/10.1194/jlr.M054718>
- Ashford, A. L., Oxley, D., Kettle, J., Hudson, K., Guichard, S., Cook, S. J. and Lochhead, P. A. (2014). A novel DYRK1B inhibitor AZ191 demonstrates that DYRK1B acts independently of GSK3 β to phosphorylate cyclin D1 at Thr 286, not Thr 288. *Biochemical Journal*, 457(1), 43–56. <https://doi.org/10.1042/BJ20130461>
- Bonin, S. & Stanta, G. (2013). Nucleic acid extraction methods from fixed and paraffin-embedded tissues in cancer diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 13, 271–282. <https://doi.org/10.1586/erm.13.14>
- Chen, Y., Wang, S., He, Z., Sun, F., Huang, Y., Ni, Q. and Cheng, C. (2017). DYRK1B overexpression is associated with breast cancer growth and a poor prognosis. *Human Pathology*, 66, 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.02.033>
- Cheng, P., Wang, J., Waghmare, I., Sartini, S., Coviello, V., Zhang, Z. and Nakano, I. (2016). FOXD1-ALDH1A3 signaling is a determinant for the self-renewal and tumorigenicity of mesenchymal glioma stem cells. *Cancer Research*, 76(24), 7219–7230. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2860>
- Deng, X., Ewton, D. Z., Li, S., Naqvi, A., Mercer, S. E., Landas, S. and Friedman, E. (2006). The kinase Mirk/DYRK1B mediates cell survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Research*, 66(8), 4149–4158. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3089>
- Friedman, E. (2013). MIRK/DYRK1B kinase in ovarian cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 5560–5575. <https://doi.org/10.3390/ijms14035560>

Conclusión

El hallazgo más relevante en este proyecto fue la detección de DYRK1B en GBM, con diferentes patrones de expresión y un comportamiento de expresión que se parece mucho al observado para ALDH1A1. Estos hallazgos permiten considerar que los niveles de expresión de ALDH1A1 y DYRK1B pueden ser factores pronósticos en el diagnóstico o posibles biomarcadores para la supervivencia general en pacientes con glioblastoma.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Instituto de Seguridad Social del Estado de México y Municipios (ISSEMyM), el Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT) y la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex), beca número 848-2007. Queremos agradecer a Andrés Reyes y Verónica Fabela por la asistencia de laboratorio.

- Gao, J., Zheng, Z., Rawal, B., Schell, M. J., Bepler, G. and Haura, E. B. (2009). MIRK/DYRK1B, a novel therapeutic target, mediates cell survival in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Biology & Therapy*, 8(17), 1671–1679. <https://doi.org/10.4161/cbt.8.17.9322>
- Gong, Y., Wang, J., Huo, L., Wei, W., Ueno, N. T. and Woodward, W. A. (2014). Aldehyde dehydrogenase 1 expression in inflammatory breast cancer as measured by immunohistochemical staining. *Clinical Breast Cancer*, 14(3). <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2013.12.006>
- He, M., Gu, J., Zhu, J., Wang, X., Wang, C., Duan, C. and Li, J. (2018). Up-regulation of DYRK1B promote astrocyte activation following lipopolysaccharide-induced neuroinflammation. *Neuropeptides*, 69(April), 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2018.04.008>
- Huangfu, D. & Anderson, K. V. (2005). Signaling from Smo to Ci / Gli : conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates. 3–14. <https://doi.org/10.1242/dev.02169>
- Jelski, W., Laniewska-Dunaj, M., Orywal, K., Kochanowicz, J., Rutkowski, R. and Szmitkowski, M. (2014). The Activity of Alcohol Dehydrogenase (ADH) Isoenzymes and Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) in the Sera of Patients with Brain Cancer. *Neurochemical Research*, 39(12), 2313–2318. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1402-3>
- Jin, K., Park, S., Ewton, D. Z. and Friedman, E. (2007). The survival kinase MIRK/DYRK1B is a downstream effector of oncogenic K-ras in pancreatic cancer. *Cancer Research*, 67(15), 7247–7255. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4099>
- Kalantari, E., Saadi, F. H., Asgari, M., Sharifabrizi, A., Roudi, R. and Madjd, Z. (2016). Increased Expression of ALDH1A1 in Prostate Cancer is Correlated With Tumor Aggressiveness: A Tissue Microarray Study of Iranian Patients. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM / Official Publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*, 00(00), 1–7. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000343>
- Kirwan, J. A., Weber, R. J. M., Broadhurst, D. I. and Viant, M. R. (2014). Direct infusion mass spectrometry metabolomics dataset: A benchmark for data processing and quality control. *Scientific Data*, 1, 1–13. <https://doi.org/10.1038/sdata.2014.12>
- Liu, X. Y., Xu, X. X., Yin, X. L., Zhang, X. X., Li, X. L. and Lu, X. H. (2017). Relationship between Glioblastoma Heterogeneity and Survival Time: An MR Imaging Texture Analysis. 1–7. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A5279>
- Louis, D. N., Holland, E. C. and Cairncross, J. G. (2001). Glioma classification: A molecular reappraisal. *The American Journal of Pathology*, 159(3), 779–786. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61750-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61750-6)
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., Deimling, A. Von, Figarella, D., Webster, B. and Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- Megger, D. A., Padden, J., Rosowski, K., Uszkoreit, J., Bracht, T., Eisenacher, M. and Sitek, B. (2017). One Sample, One Shot - Evaluation of sample preparation protocols for the mass spectrometric proteome analysis of human bile fluid without extensive fractionation. *Journal of Proteomics*, 154, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.11.021>
- Natsume A. Y. J. (2008). Gene therapy for high-grade glioma: current approaches and future directions. *Cell Adhes Migr*, 2, 186e91.
- Olmez, I., Shen, W., McDonald, H. and Ozpolat, B. (2015). Dedifferentiation of patient-derived glioblastoma multiforme cell lines results in a cancer stem cell-like state with mitogen-independent growth. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(6), 1262–1272. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12479>
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Liao, P., Vecchione-Koval, T., Wolinsky, Y., Kruchko, C. and Barnholtz-Sloan, J. S. (2017). CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. *Neuro-Oncology*, 19(suppl_5), v1–v88. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox158>
- Park, M., Koo, S., Jong, L., Chang, H., Gu, S., Eui, K. and Ahn, S. (2017). Elderly patients with newly diagnosed glioblastoma: can preoperative imaging descriptors improve the predictive power of a survival model? *Journal of Neuro-Oncology*, pp 423–431. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2544-3>
- Pérez-Sánchez, G., Jiménez, A., Quezada-Ramírez, M. A., Estudillo, E., Ayala-Sarmiento, A. E., Mendoza-Hernández, G. and Segovia, J. (2018). Annexin A1, Annexin A2, and DYRK1B are upregulated during GAS1-induced cell cycle arrest. *Journal of Cellular Physiology*, 233(5), 4166–4182. <https://doi.org/10.1002/jcp.26226>
- Rasper, M., Schäfer, A., Piontek, G., Teufel, J., Brockhoff, G., Ringel, F. and Schlegel, J. (2010). Aldehyde dehydrogenase

- 1 positive glioblastoma cells show brain tumor stem cell capacity. *Neuro-Oncology* 12(10), 1024–1033. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noq070>
- Schäfer, A., Teufel, J., Ringel, F., Bettstetter, M., Hoepner, I., Rasper, M. and Schlegel, J. (2012). Aldehyde dehydrogenase 1A1-a new mediator of resistance to temozolomide in glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 14(12), 1452–1464. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos270>
- Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. (November), 3–5. <https://doi.org/10.1002/0471142735.jma03bs111>
- Stupp, R. & Roila, F. (2009). Malignant glioma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 20(SUPPL. 4), 126–128. https://academic.oup.com/annonc/article/20/suppl_4/iv126/148299
- Tomita, H., Tanaka, K., Tanaka, T. and Hara, A. (2016). Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget*, 7(10), 11018–11032. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6920>
- Van Den Bent, M. J., Weller, M., Wen, P. Y., Kros, J. M., Aldape, K. and Chang, S. (2017). A clinical perspective on the 2016 WHO brain tumor classification and routine molecular diagnostics. *Neuro-Oncology*, 19(5), 614–624. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now277>
- Visus, C., Ito, D., Amoscatto, A., Maciejewska-Franczak, M., Abdelsalem, A., Dhir, R. and DeLeo, A. B. (2007). Identification of human aldehyde dehydrogenase 1 family member a1 as a novel CD8+ T-cell-defined tumor antigen in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Research*, 67(21), 10538–10545. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1346>
- Vilenchik, M., Kuznetsova, A., Frid, M., Duey, M., Damiani, A., De Leon, L. and Potapova, O. (2019). Implication of DYRK1B kinase in dormant glioblastoma cancers and utilization of DYRK1B inhibitors as a novel therapeutic strategy for glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 37(15_suppl):e14670-e14670. https://cancerres.aacrjournals.org/content/79/13_Supplement/3038#
- Wang, Y., Wang, W. and Chen, Z. (2018). Expression of Aldehyde Dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) as a Prognostic Biomarker in Colorectal Cancer Using Immunohistochemistry. 2864–2872. <https://doi.org/10.12659/MSM.910109>
- Wen P. & Kesari S. (2008). Malignant gliomas in adults. *The New England Journal of Medical*, 359 (5), 492-507 DOI: 10.1056/NEJMr0708126
- Xu, S. L., Liu, S., Cui, W., Shi, Y., Liu, Q., Duan, J. J. and Bian, X. W. (2015). Aldehyde dehydrogenase 1A1 circumscribes high invasive glioma cells and predicts poor prognosis. *American Journal of Cancer Research*, 5(4), 1471–1483. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4473324/>
- Yue, L., Huang, Z. M., Fong, S., Leong, S., Jakowatz, J. G., Charruyer-Reinwald, A. and Ghadially, R. (2015). Targeting ALDH1 to decrease tumorigenicity, growth and metastasis of human melanoma. *Melanoma Research*, 25(2), 138–148. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000144>
- Zhang, Q., Taguchi, A., Schliekelman, M., Wong, C.-H., Chin, A., Kuick, R. and Hanash, S. (2011). Comprehensive Proteomic Profiling of Aldehyde Dehydrogenases in Lung Adenocarcinoma Cell Lines. *International Journal of Proteomics*, 2011, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2011/145010>
- Zhou, Q., Phoa, A. F., Abbassi, R. H., Hoque, M., Reekie, T. A., Font, J. S. and Kassiou, M. (2017). Structural Optimization and Pharmacological Evaluation of Inhibitors Targeting Dual-Specificity Tyrosine Phosphorylation-Regulated Kinases (DYRK) and CDC-like kinases (CLK) in Glioblastoma. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(5), 2052–2070. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01840>