

Universidad de Costa Rica
Sede Rodrigo Facio



Trabajo final de graduación para optar por el grado de Licenciatura en Microbiología y Química
Clínica

**Modulación inmunológica inducida por quimioterapia en células tumorales espectadoras en un
modelo *in vitro* de Glioblastoma Multiforme**

María Fernanda Castro Berrocal

B81816

Julio, 2023


Los que aquí firmamos damos fe que este trabajo posee todas las correcciones indicadas el día de la presentación oral de este Trabajo Final de Graduación



Dr. Javier Mora Rodríguez
Tutor



Dra. Lucia Figueroa Protti
Lector



Dra. Elvira Salas HidaGo
Lector



Dra. Melissa Granados
Presidente del Tribunal



Dr. Jorge Arias
Profesor designado

Agradecimientos y dedicatoria

Agradezco primeramente a Dios, por darme las fuerzas y la sabiduría para lograr llevar a cabo el desarrollo y ejecución de esta investigación y guiar mis pasos; a mis padres, hermana y novio, por ser un pilar importante en mi vida; quienes con su apoyo, cariño y motivación han logrado sustentar el esfuerzo y la culminación de forma exitosa de este trabajo. A Chloe; mi perrita, por ser mi compañía en cada traspasada y ser mi fiel compañera en cada momento de mi vida.

Agradezco enormemente a mi tutor de trabajo el Dr. Javier Mora por confiar en mí y darme la oportunidad de participar en una de sus investigaciones, además de incentivar el amor por la ciencia y por investigar cada una de las variables que se presentaban durante cada mes de ejecución del trabajo. Además, a cada uno de los profesores, en especial a la Dra. Lucia Figueroa y la Dra. Elvira Salas que con su guía y conocimiento me ayudaron a culminar cada una de las partes metodológicas, por su tiempo y compañía durante largos periodos; aportando con sus consejos y enseñanzas.

A mis compañeros de carrera y amigos, que con su conocimiento y fortalezas me ayudaron a sobrellevar cada una de las etapas de esta carrera, ellos con su alegría y ganas de superación indujeron en mí las mismas ilusiones para llegar hasta acá.

A la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica por ser mi lugar de aprendizaje durante toda la carrera, por brindarme una enseñanza de tan alto nivel y por siempre darme las bases y los conocimientos que he obtenido por estos 5 años, logrando forjar en mí ser un profesional integral.

Resumen

Glioblastoma multiforme es una neoplasia cerebral que se presenta en un porcentaje considerable de la población mundial, y en la mayoría de las ocasiones la supervivencia de los pacientes se encuentra altamente limitada. El tratamiento utilizado para glioblastoma multiforme sigue en investigación, debido a la alta resistencia desarrollada por las células cancerosas, lo cual limita la efectividad del mismo y produce un abordaje ineficiente. Por esta razón, el manejo terapéutico está conformado por una alta cantidad de técnicas que se complementan entre ellas, para generar en conjunto un efecto sinérgico de combate.

La temozolomida es un agente quimioterapéutico utilizado de primera línea contra la neoplasia cerebral, sin embargo, su resistencia ha limitado en mayor medida su efectividad. El desarrollo de nuevas herramientas de abordaje, permitieron un gran auge en la inmunoterapia, la cual desencadena una activación del sistema inmune en el microambiente tumoral generando una respuesta adecuada para la eliminación de las células malignas. Como parte de estos nuevos conceptos, la muerte celular inmunogénica, se define como el proceso por el cual distintos tratamientos inducen una activación inmune en respuesta a los factores y mediadores liberados por células en proceso de muerte.

Dentro del contexto anterior, el presente proyecto explora el efecto que se genera en respuesta a diferentes tratamientos citotóxicos sobre células vecinas o espectadoras al interactuar con los mediadores y factores liberados por células en proceso de muerte. Para esto, se utilizó un modelo *in vitro* de células de glioblastoma multiforme de la línea SF-295, analizando el perfil de citoquinas liberadas y el nivel de expresión de los puntos de control inmunológicos generados por estas células tumorales en respuesta a los mediadores solubles liberados por células tumorales en proceso de muerte por diferentes tratamientos citotóxicos.

Mediante el estudio realizado se logró determinar que el tipo de muerte celular predominante inducido tanto por la temozolomida como por la epirubicina fue la necrosis celular, seguido de la apoptosis en menor proporción. Además, se observó que el predominio de citoquinas liberadas por las células tumorales posterior al impacto del tratamiento quimioterapéutico fue protumoral, con el fin de inhibir la posible respuesta por parte de las células T y de mecanismos inmunes, potenciado aún más con la expresión de puntos de control inmune como Ligando 1 de muerte programada (PD-L1) e Coestimulador inducible de células T (ICOS).

Índice de abreviaturas

<u>Abreviatura</u>	<u>Significado</u>
Cel. Treg	Célula T reguladora
CPA	Célula presentadora de antígenos
CT	Células T
CTLA-4	Proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxico
DAMPs	Patrones moleculares asociados al daño
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GCV	Ganciclovir
ICOS	Coestimulador inducible de células T
IP10	Proteína 10 inducible por interferón
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
OMS	Organización mundial de la Salud
PD-L1	Ligando 1 de muerte programada
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFB	Suero fetal Bovino
TAM	Macrófagos asociados a tumores
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

Índice de Figuras

Figura 1. Metilaciones producidas en la cadena ADN producto del profármaco de la temozolamida.....	14
Figura 2. Mecanismo de muerte celular inmunogénica llevado a cabo por células tumorales y la respuesta del sistema inmune innato y adaptativo.....	17
Figura 3. Efecto Bystander producido por la célula tumoral en contacto con la quimioterapia sobre el microambiente tumoral y sus células vecinas.....	19
Figura 4. Mecanismo general de la función efectora de la apoptosis, vías de inhibición pro-supervivencia tumoral.....	21
Figura 5. Mecanismos extrínsecos de la apoptosis promotores de la inhibición de efectos antitumorales que promueven la oncogénesis.....	22
Figura 6. Estímulo desencadenante de activación de las células T por medio de la interacción de la célula presentadora de antígenos con el receptor de células T (TCR).....	24
Figura 7. Señales coestimuladoras e inhibitorias que desencadena la familia B7/CD28 en la interacción entre la célula presentadora de antígenos (color azul) y la célula T (color verde).	25
Figura 8. Determinación del porcentaje celular correspondiente a la condición viable y a los diferentes mecanismos de muerte celular (apoptosis y necrosis) expuestas a diferentes concentraciones de (A) epirubicina en $\mu\text{g}/\text{mL}$ y (B) temozolomida en μM	33
Figura 9. Comparación de muerte celular de la línea SF-295 con respecto a diferentes concentraciones de los dos tipos de quimioterapias utilizadas. En el caso de la epirubicina se utilizó 0,0125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,025 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y para la temozolomida 100, 200, 400 y 600 μM respectivamente, en orden de la concentración uno a la cuatro.....	34
Figura 10. Nivel de expresión de los puntos de control inmunológico A: PD-L1, B: HVEM y C: ICOSLG en relación con diferentes condiciones experimentales a las 2 y 24 horas del experimento...35	

Figura 11. Cuantificación de la secreción de interleuquina-38 en relación con las diferentes condiciones experimentales a las 2 y 24 horas respectivas..... 36

Figura 12. Cuantificación de la secreción de una variedad de citoquinas IL-6 (A), IL-8 (B), G-CSF (C), MCP-1 (D), IP10 (E) en relación con las diferentes condiciones experimentales a las 2 y 24 horas respectivas..... 37

Figura 13. Conjunto de Funciones desarrolladas por las citoquinas y sus receptores..... 43

Tabla de contenidos

Agradecimientos.....	2
Resumen.....	3
Índice de abreviaturas.....	4
Índice de Figuras.....	5
Tabla de contenidos.....	7
Capítulo I. Marco general.....	8
1.1 Objetivos.....	8
1.1.1 Objetivo general.....	8
1.1.2 Objetivos específicos.....	8
1.2 Justificación.....	9
1.3 Antecedentes.....	11
1.3.1 Glioblastoma.....	11
1.3.2 Muerte celular inmunogénica.....	16
1.3.3 Células espectadoras o efecto Bystander.....	18
1.3.4 Puntos de control inmune.....	23
Capítulo II. Marco metodológico.....	28
2.1 Cultivo celular.....	28
2.2 Determinación de curva de letalidad para la epirubicina y temozolomida.....	28
2.3 Cuantificación de muerte celular.....	28
2.4 Preparación de medio condicionado.....	29
2.5 Estimulación de células espectadoras.....	29
2.6 Extracción de ARN.....	30
2.7 Cuantificación de los niveles de expresión de los puntos de control inmunológicos.....	30
2.8 Cuantificación de la secreción de la interleuquina-38.....	31
2.9 Cuantificación de citoquinas.....	31
2.10 Análisis de datos.....	32
Capítulo III. Análisis de resultados.....	33
Capítulo IV. Discusión.....	39
Capítulo V. Conclusiones.....	53
Referencias bibliográficas.....	54

Capítulo I. Marco general

Objetivo general

Determinar el perfil de citoquinas y los niveles de expresión de puntos de control inmunológico inducidos por la quimioterapia sobre células tumorales espectadoras en un modelo *in vitro* de Glioblastoma Multiforme.

Objetivos específicos

- a. Realizar curvas de muerte celular de cada tratamiento quimioterapéutico para identificar la concentración capaz de inducir un porcentaje similar de muerte en la línea celular SF-295.
- b. Cuantificar la concentración de citoquinas liberadas por las células tumorales espectadoras en respuesta al medio condicionado de células estimuladas con tratamiento quimioterapéutico.
- c. Determinar los niveles de expresión de los puntos de control inmunológico en las células tumorales espectadoras en respuesta al medio condicionado de células estimuladas con tratamiento quimioterapéutico.

Justificación

Durante los últimos años se ha visto un incremento en la tasa de personas con padecimiento de cáncer a nivel mundial y en mayor proporción de neoplasias cerebrales, esto debido al aumento de la exposición a diversos factores predisponentes y a la disposición multifactorial de los mismos (Alvarán et al.,2008; Esquivel et al.,2012). Por el momento, el principal y único factor de riesgo conocido de manera directa con este tipo de neoplasia es la exposición a la radiación ionizante, sin embargo, su efecto del todo no se encuentra claro (Pouratian & Schiff, 2010). Las diferencias que embargan la epidemiología observada a nivel mundial se establecen en relación a la edad, sexo y raza, además de factores genéticos, hormonales y ambientales, sin embargo, el pronóstico y la calidad de vida del paciente se establece principalmente tomando en consideración su edad (Alvarán et al.,2008; Esquivel et al.,2012).

A nivel nacional, con el pasar de los años, se han establecido diferentes conductas y estilos de vida en las personas costarricenses, que favorece que se presente un incremento en la exposición de diversos factores de riesgo, dentro de los que destaca, la migración a vida citadina, lo que ocasiona un incremento en el sedentarismo, la mala alimentación, consumo de bebidas alcohólicas y alimentos grasos, lo que produce condiciones desfavorables (Vargas,2016).

Los tumores cerebrales constituyen uno de los principales retos a nivel de salud pública, debido a que los mismos se caracterizan por representar la segunda causa de muerte a causa de cáncer a nivel mundial en personas menores de 35 años, presentando su mayor incidencia en personas masculinas. A nivel nacional se establece que un 2,67% corresponde a tumores del SNC y de este el mayor porcentaje está destinado para tumores del glioma, donde el más representativo es el glioblastoma multiforme (Esquivel et al.,2012). No obstante, se cree que existe un alto porcentaje de subregistro de casos, debido a la posibilidad de confundir la sintomatología y las condiciones conductuales con enfermedades psiquiátricas y con esto ser diagnosticados de forma incorrecta (Lezak, 2004; Salazar et al.,2016).

En los últimos años se ha logrado diagnosticar a un mayor porcentaje de personas a tiempo y con esto el registro de neoplasias ha ido en aumento, no obstante, este suceso solo confirma la efectividad que ha mantenido el sistema de salud para lograr diagnosticar, tamizar y tratar a las personas de forma rápida y oportuna, ratificando los avances en relación con abordajes oncogénicos que aumenta la sobrevida del paciente (Vargas,2016).

Los tratamientos para una neoplasia cerebral han ido evolucionando y cambiando a lo largo del tiempo, debido a que se ha visto un incremento en la resistencia establecida a terapias convencionales,

con esta situación, el abordaje terapéutico del paciente se realiza en diversos campos, para lograr un aumento en la efectividad del tratamiento.

La resección quirúrgica, radioterapia y quimioterapia con temozolomida ha sido el tratamiento estándar para el glioblastoma multiforme (Hanif et al.,2017), sin embargo, hoy en día, la inmunoterapia se proyecta como una alternativa prometedora que busca generar una respuesta del sistema inmune del paciente y con esto lograr atacar las células cancerosas. No obstante, para lograr la eficacia de esta técnica, se necesita mantener una respuesta inmunológica robusta y efectiva, la cual se ve limitada en muchas ocasiones por la inmunosupresión que desarrollan las células cancerosas de glioblastoma multiforme en el microambiente tumoral (Valenzuela,2017).

La inmunosupresión que se presenta en este tipo de neoplasia de manera local y sistémica por parte de las células tumorales se desarrolla por medio de una serie de factores y mecanismos inmunotolerantes, basado en la secreción de citoquinas como la IL-6 que genera un efecto antiinflamatorio, la disminución de la efectividad de las células presentadoras de antígenos (CPA) o la angiogénesis anormal por parte de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Himes et al., 2021). El conjunto de todos estos mecanismos inhibitorios del sistema inmune genera que se presente una alteración en la respuesta establecida por las células y los órganos linfoides hacia las células tumorales, produciendo que muchos de los abordajes terapéuticos establecidos como efectivos reduzcan su eficacia, en mayor proporción a la inmunoterapia en comparación a otros abordajes clínicos.

Por este motivo, surge la necesidad de una investigación de modelos *in vitro* de glioblastoma multiforme, con el fin de explorar nuevos conceptos relacionados a la capacidad de las células tumorales de desarrollar mecanismos inmunosupresores en respuesta al tratamiento con quimioterapias como la temozolomida, la cual se utiliza como estándar de oro para el abordaje terapéutico de glioblastoma. De esta forma por medio de la determinación del perfil de citoquinas y quimiocinas secretadas y del nivel de expresión de los puntos de control inmunológicos en células espectadoras, se podrá entender de mejor manera la dinámica tumoral y buscar posibles blancos terapéuticos efectivos.

Antecedentes

1.3.1 Glioblastoma multiforme

El glioblastoma multiforme (GBM) es un tipo de neoplasia ubicado en el Sistema Nervioso Central, el cual presenta la particularidad de ser conocido como el tumor cerebral más frecuente, agresivo y mortal. Estas características ocasionan que su diagnóstico sea de mal pronóstico en el paciente y con poca supervivencia. En casos donde el paciente no recibe una adecuada intervención, se observa aproximadamente una tasa de mortalidad del 77% (Castañeda et al.,2015).

La presencia de tumores cerebrales aún no tiene una causa conocida, se ha logrado establecer que la mayoría de los mismos no se producen a partir de raíces hereditarias y por el contrario son establecidos a partir de una serie de factores ambientales, ocupacionales, personales, entre otros, los cuales siguen en estudio, para lograr enlazar y correlacionar los posibles factores entre pacientes. Sin embargo, aún no se tiene clara ninguna causa que se encuentre relacionada de manera directa entre los mismos (American brain tumor association,2012).

Este tipo de neoplasia se caracteriza por presentarse en mayor proporción en personas adultas, especialmente en edades de 50-60 años, sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que se desarrolle en personas de edades inferiores o en niños, con una mayor probabilidad en el sexo masculino (Rodríguez et al., 2012). Los síntomas por los cuales el paciente consulta al médico son a raíz de ciertos malestares a nivel de SNC, con un déficit neurológico focal acompañado de cefalea, náuseas, convulsiones y pérdida de memoria (Ortiz et al.,2021).

Por su alta agresividad, la Organización mundial de la Salud (OMS) lo destaca dentro de los tumores grado IV, esto por su rápida capacidad de proliferación (Castañeda et al.,2015). Además, como su nombre lo menciona, “multiforme” hace referencia a la gran heterogeneidad que se presenta al observar un corte histológico del mismo (Hernández,2007). Esto se basa en la presencia de gran cantidad de células inmunológicas como las que provienen de la microglía, células hematopoyéticas, neuronas, las cuales todas en conjunto conforman aproximadamente el 50% del tamaño total del tumor (Torres et al.,2022).

Por otro lado, la principal variación histológica que se presenta en este tipo de neoplasia se basa en su capacidad de generar un alto grado de necrosis en el tejido y presentar una elevada vascularidad que limita todo el tumor (American brain tumor association,2012). La necrosis que limita el tejido tumoral es desarrollada por la oclusión trombótica de los vasos sanguíneos y el nivel de hipoxia que se genera en el microambiente tumoral (Wakabayashi et al.,2004).

Las células tumorales pueden llevar a cabo los eventos histopatológicos mencionados anteriormente debido a que son producto de un excesivo progreso tumoral a causa de la posible alteración en puntos de control del ciclo celular como lo son el G1/S y la variación desmedida de una serie de alteraciones genéticas en *FGFR2*, *IRS2* y *AKT3* (Urbńska et al.,2014).

Dentro de los últimos años, se han logrado definir dos tipos de glioblastoma, destacando los primarios y secundarios, los mismos logran diferenciarse por medio de características particulares a nivel molecular, debido a que a nivel histopatológico su diferenciación no se logra realizar (González et al.,2014).

Se ha visto la particularidad de que un 90% de los glioblastomas son de tipo primario los cuales surgen *de novo* por medio de alguna alteración en el ciclo celular que lleva a la producción de una neoplasia, sin embargo, el 10% restante es por medio de la progresión de algún tumor preexistente, surgiendo de forma secundaria a una neoplasia de bajo grado, especialmente a partir de astrocitomas (Urbńska et al.,2014).

El tipo primario se presenta en pacientes con edades aproximadas dentro de los 60-70 años y son presentados en etapas más agresivas, contrario a los secundarios, donde se presenta en edades relativamente tempranas a los 40-50, sin embargo, como su desarrollo es a partir de uno preexistente, su avance se presenta en un periodo de tiempo más gradual (Hernández,2007).

Como se mencionó anteriormente, la diferenciación entre estos dos tipos de glioblastoma se logra por medio de técnicas moleculares, debido a que existen variaciones a este nivel que logran determinar cuál tipo está presente en el paciente. Una de las diferencias a nivel molecular es en relación con el estado de metilación del ADN y de la enzima MGMT, lo cual es importante, debido a que a partir de este suceso se determina la efectividad de la temozolomida como tratamiento quimioterapéutico. En el caso de los tipos primarios se observan cambios a nivel de EGFR, duplicación en MDM2 y ciertas deleciones en CDKN2A las cuales se presentan de manera homocigota, contrario a un secundario, donde sus alteraciones se encuentran establecidas en las mutaciones en IDH1, una expresión excesiva de PDGFRA y una amplificación en MET (González et al.,2014).

Se ha observado que la alteración que se encuentre a nivel genético se puede relacionar con el avance del tumor. En etapas iniciales, por ejemplo, es abundante la mutación en TP53, contrario a las de etapas avanzadas donde predomina la pérdida de PTEN con mutaciones en el mismo, además de la amplificación en EGFR (Torres et al.,2022).

Los tumores cerebrales se caracterizan por presentar una serie de cambios celulares, que son los responsables de su elevado mal pronóstico y difícil mediación al paciente, como lo es su elevada tasa de renovación celular, donde constantemente se lleva a cabo la sustitución de forma acelerada de las células que van entrando en fase apoptótica sin dejar de lado su capacidad de infiltrarse en el tejido cerebral y de esta manera poder destruir gran parte de la matriz extracelular de la zona afectada. Por otro lado, este tumor presenta una alta capacidad de evasión de los distintos tratamientos y abordajes utilizados, por esta razón se ha dificultado un buen resultado clínico (Ortiz et al.,2021).

El tratamiento para tratar el glioblastoma es algo muy difícil de definir y varía mucho entre pacientes, en relación con las características y alteraciones moleculares, ubicación y su biología compleja; a pesar de su alta investigación el éxito de los tratamientos sigue siendo muy reducido. La intervención de estos pacientes ha mostrado una mayor efectividad al combinar varios abordajes, como lo es la resección quirúrgica junto con procesos de radiación asociada a terapia quimioterapéutica con temozolomida. Existen otras diversas quimioterapias como la lomustina o carmustina, sin embargo, su alta toxicidad y resistencia ha limitado su uso, generando así que el estándar de atención sea la aplicación oral de temozolomida con radiación (Hanif et al.,2017).

La temozolomida es un agente alquilante que se administra vía oral y es utilizado como primera línea de defensa, el cual busca ocasionar un daño en la cadena de ADN que le impide llevar a cabo la división celular, debido a que busca añadir grupos metilo sobre las bases de guanina que se encuentran en el ADN, como se observa en la Figura 1. Luego de su ingesta, el fármaco logra absorberse en el intestino delgado y por su tamaño atraviesa la barrera hematoencefálica. Posteriormente es hidrolizado en metabolitos activos que metilan el ADN en varias bases nucleicas, ocasionando que se produzca una alteración en la hebra del ADN, lo que genera la apoptosis celular (Wesolowski et al.,2010).

La eficacia con la que actúa la temozolomida se basa en la apoptosis que logra inducir en las células tumorales por el daño en el ADN. Se ha establecido que para lograr activarse necesita la ayuda del receptor Fas/CD95/Apo.1 en las células del glioma las cuales presentan un p53 de tipo silvestre, proteína encargada en funciones de control y destrucción celular. Por otro lado, se da una ruptura en el ADN que activa la vía apoptótica mitocondrial con mutación en p53 (Fan et al.,2013).

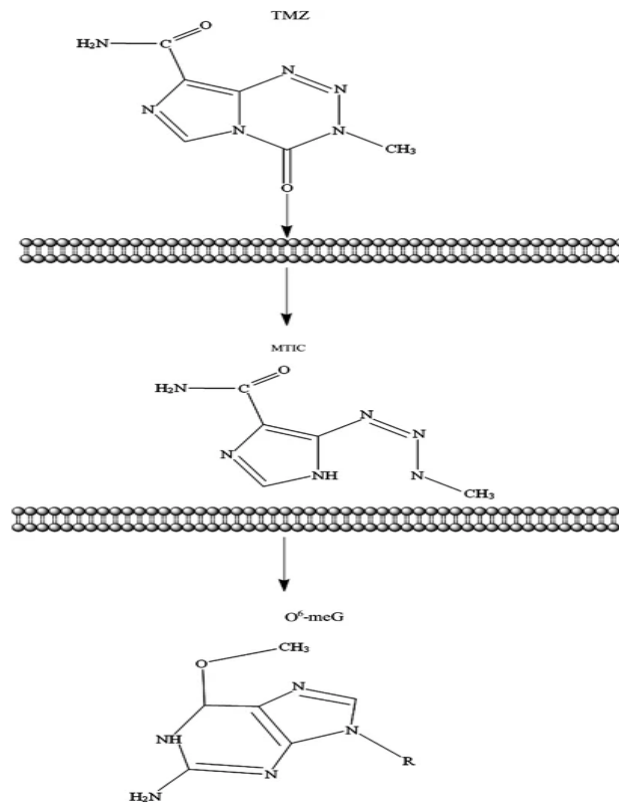


Figura 1. Metilaciones producidas en la cadena ADN producto del profármaco de la temozolomida (Fan et al.,2013).

En estudios realizados a pacientes con predominio de resistencia a la temozolomida, se ha establecido la presencia de la enzima MGMT de forma activada, la cual logra reparar la cadena y así genera ineffectividad de la droga quimioterapéutica. Esto se debe a que la temozolomida es un profármaco que metila el ADN en diferentes posiciones, dentro de las que destaca la O⁶-meG de la posición 06-guanina, posición donde actúa la MGMT, con ello repara el principal sitio de alquilación y lo cual logra revertir el efecto que produce la droga quimioterapéutica (Fan et al.,2013). Lo contrario sucede cuando se metila el promotor de la enzima, esto reprime la transcripción de la MGMT, por tanto, no se da la reparación de la cadena de ADN (González et al.,2014).

En experimentos realizados *in vitro* en líneas celulares de glioblastoma con resistencia a la temozolomida por la presencia de la enzima MGMT, se ha logrado determinar que al usar dianhidrogalactitol, también conocido como Val-083, se logra una efectividad terapéutica. Esto debido a que el Val-083 no se ve afectado por la enzima, debido a que la función de este fármaco es el entrecruzamiento de manera irreversible entre cadenas N⁷-guanina. Este entrecruzamiento conduce a rupturas de la cadena de ADN de forma permanente y con ello a la detención del ciclo celular, sin capacidad de que la enzima logre generar la corrección en la hebra (Jiménez et al.,2021).

Por otra parte, las células tumorales han logrado desarrollar una serie de alteraciones en los mecanismos celulares generando una alta resistencia quimioterapéutica basada en cambios en absorción, eflujo e inactivación del fármaco antes de realizar su efecto, limitando así su eficacia (Fan et al.,2013).

A partir del poco efecto que tienen ciertas terapias quimioterapéuticas en los pacientes se han buscado otras herramientas que complementen estos tratamientos. Las células tumorales al contrario de una célula normal tienen una elevada producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) lo cual favorece el crecimiento tumoral y la angiogénesis. Por esta razón se han buscado incluso estrategias asociadas a la dieta para reducir la cantidad de ROS en el cerebro con el objetivo de controlar y aumentar la apoptosis de este tipo de células tumorales y aumentar la presencia de genes neuroprotectores (Ortiz,2021).

Otras de las estrategias que se han desarrollado en los últimos años es el uso de inmunoterapia, la cual busca promover una activación anti-tumoral del sistema inmune y que sea este el encargado de remover las células malignas. Sin embargo, la efectividad de estas técnicas se ha visto limitada, debido al microambiente tumoral inmunosupresor que se presenta en estas neoplasias. Esta inmunosupresión se desarrolla de forma local por medio de las limitaciones que presenta la respuesta del sistema innato y adaptativo, asociadas en gran parte a la liberación de la IL-6 y el aumento en la expresión de PD-L1. Estos cambios inducen un incremento en la producción de células T reguladoras, las cuales ejercen un retrocontrol negativo sobre la acción de las células citotóxicas con actividad antitumoral. Por otro lado, se genera un incremento en la secreción de IL-10, que inhibe la producción y respuesta de células T (CT), generando un ambiente protumoral inmunosupresor (Himes et al.,2021).

Dentro de las respuestas locales que generan un aumento en la inmunosupresión del paciente destacan: (Himes et al.,2021).

- Baja expresión de MHC I y MHC II, lo cual limita la presentación de antígenos.
- Aumento de factores inmunomoduladores:IL-10, PGE2 y TGF- β .
- Ligandos de superficie inmunomoduladores (Puntos de control inmune): PD-L1, el cual se encarga del agotamiento y anergia de CT.
- Expresión de IL-6 la cual recluta células mieloides, respuesta antiinflamatoria y con esto la limitación de destrucción de células tumorales.
- VEGF: Encargado de la remodelación vascular y angiogénesis.
- Aumento de la expresión de HIF1- α , factor de transcripción, encargado de la expresión de proteínas inmunomoduladoras.

En relación con los eventos sistémicos producidos, se han observado ciertas características en estos pacientes que afectan tanto los órganos linfoides primarios como secundarios; dentro de los que destaca la reducción en el tamaño del bazo, niveles reducidos de células CD4+ e inhibición de la proliferación de CT. Los mecanismos que generan este cuadro sistémico se desconocen, sin embargo, se sugiere que esto es generado debido a las citoquinas liberadas a circulación por el microambiente tumoral (Himes et al.,2021).

1.3.2 Muerte celular inmunogénica

La carcinogénesis es un proceso que genera una serie de cambios a nivel de ADN, por las alteraciones en los genes y en su epigenética, ocasionando problemas en la integridad del genoma que ocasiona variaciones en los mecanismos de control inmunológico y efectores del sistema inmune. La célula transformada logra llevar a cabo la evasión de los mecanismos intrínsecos y extrínsecos del proceso inmune que logran dominar la oncogénesis (León & Pareja,2019).

Los cambios oncogénicos a nivel celular y el estrés que sufre el organismo, conduce a que se generen cambios mitóticos en el ciclo celular, envejecimiento celular y mecanismos de muerte conocidos como autofagia y apoptosis en condiciones tempranas. Los tratamientos quimioterapéuticos o inductores de muerte celular ocasionan que se expresen en la superficie celular o que se liberen al espacio extracelular una serie de sustancias y factores con gran capacidad de regulación inmunológica (Kepp et al.,2009).

La muerte celular inmunogénica se basa en una estimulación de la respuesta inmune tanto de mecanismos innatos como los adaptativos para responder ante alteraciones que se encuentren a nivel de células malignas y dañadas por algún tratamiento citotóxico. A partir de la apoptosis de la célula alterada se expresan y liberan una serie de señales conocidas como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) las cuales van a ser detectadas por medio de los receptores de reconocimiento de patrones expresados en las células dendríticas, macrófagos y monocitos. Estas CPA se activan en respuesta a los DAMPs, fagocitan restos celulares y migran a ganglios linfáticos para presentar antígenos a CT, induciendo una serie de eventos inmunes que conllevan la activación de una respuesta adaptativa y la activación de linfocitos T CD8+. Estos linfocitos, infiltran el tumor y generan una respuesta citotóxica antitumoral sobre las células tumorales que no fueron afectadas por la terapia citotóxica. Otro aspecto importante de la muerte celular inmunogénica es que esta activación periférica de linfocitos T, está asociada a la generación de una robusta memoria inmunológica (Chiaravalli et al.,2022).

Para que se logre llevar a cabo la muerte celular inmunogénica se requieren una serie de señales que expresan o liberan las células malignas, tales como la exposición de una proteína en la membrana celular llamada calreticulina chaperona del retículo endoplasmático la cual se encarga de interactuar con la proteína 1 del receptor de la LDL. Por otro lado, también se induce la expresión de proteínas de choque térmico y la expulsión de anexina A1 citosólica y otras sustancias que atraen a las CPA induciendo la activación de los linfocitos T CD8+ (Chiaravalli et al.,2022).

Así mismo, durante la muerte celular inmunogénica, se expresan una serie de quimiocinas conocidas como PARC, las cuales son similares a las liberadas ante respuestas contra patógenos, los cuales consisten en la expulsión de forma conjunta de CXCL1, CCL2 y CXCL10. Estas atraen a células de la inmunidad innata, en mayor proporción y como primeros respondedores a los neutrófilos. Dichas células van a generar una citotoxicidad contra el microambiente tumoral por medio de la liberación de una serie de sustancias conformadas por especies reactivas de oxígeno y el óxido nítrico (Álvarez et al.,2021). Este proceso se muestra a continuación en la figura 2:

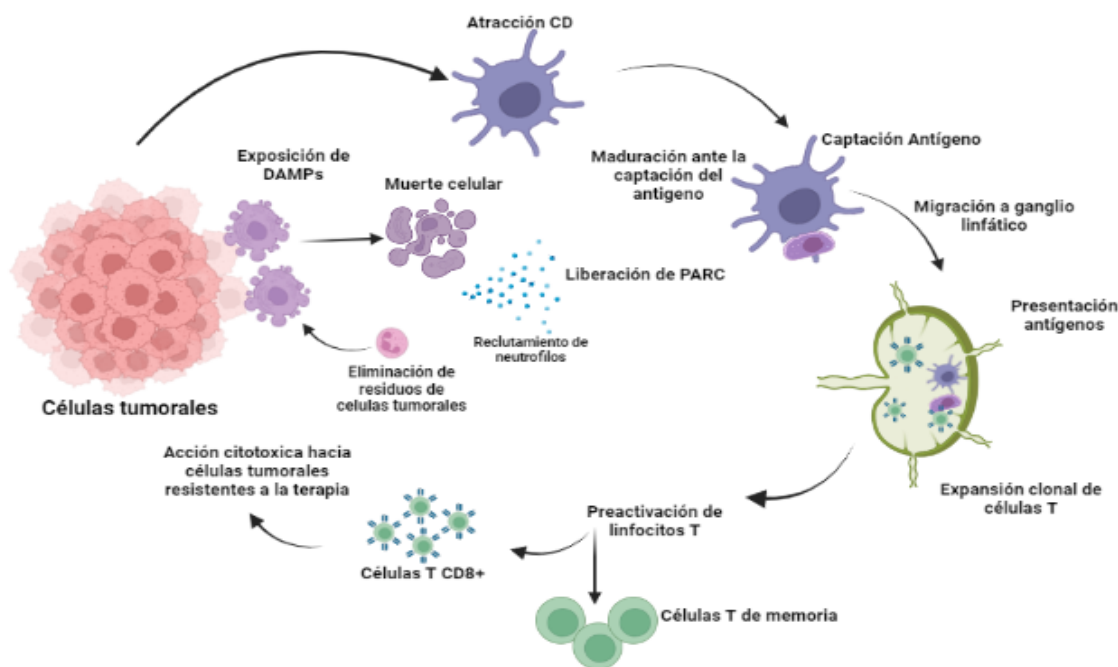


Figura 2. Mecanismo de muerte celular inmunogénica llevado a cabo por células tumorales y la respuesta del sistema inmune innato y adaptativo. CD: células dendríticas. Elaboración propia en aplicación de Biorender, modificado a partir de Álvarez et al.,2021.

Según estudios realizados recientemente, se ha establecido la posible aplicación de la muerte celular inmunogénica en conjunto con la inmunoterapia como un tipo de acción y mecanismo antitumoral. Existen una serie de tratamientos quimioterapéuticos entre los que destacan la lurbinectedina y la belantamab mafodotina que estimulan este tipo de muerte celular e inducen una respuesta inmunitaria eficaz contra el tumor. Por tanto, la combinación de estrategias, como el ataque directo al sitio tumoral por las señales generadas y mencionadas anteriormente y la inmunidad antitumoral generada por la droga ha mostrado una excelente efectividad terapéutica (Cai et al.,2022).

Inducir una muerte celular es fundamental como alternativa terapéutica en la disminución del tamaño de la masa tumoral en un sitio inmunoprivilegiado como lo es el sistema nervioso. No obstante, no es el único objetivo, debido a que, al inducir la muerte celular inmunogénica, se genera la expulsión de moléculas inflamatorias que se encuentran a nivel intracelular en las células tumorales. Lo anterior genera una inmunidad antitumoral por la respuesta inmune desarrollada (Caldolfi,2014).

La epirubicina es otra de las opciones terapéuticas utilizadas en diferentes tipos de tumores como el cáncer de mama y aun cuando no es una alternativa terapéutica para tumores cerebrales como glioblastoma, en el presente trabajo fue utilizada como control positivo debido a que la misma se encarga de inducir muerte celular inmunogénica. Esta se caracteriza por intercalarse en las hebras de ADN, ocasionando así que se evite la síntesis y correcto funcionamiento de esta molécula, por otro lado, también produce radicales libres, estos se generan cuando logra unirse con la molécula del ADN y actuar sobre la topoisomerasa II. Por medio de estos dos mecanismos logra tanto la activación de inducción de apoptosis como de necrosis celular (Wang et al., 2015).

1.3.3 Células espectadoras o efecto Bystander

Las células tumorales dentro del microambiente tumoral desarrollan diversas estrategias para mantener su supervivencia y lograr llevar a cabo un crecimiento acelerado, además de mantener controlada la evasión de la respuesta inmunológica. Durante el proceso de muerte celular, ya sea por falta de nutrientes, hipoxia, o en respuesta a tratamientos quimioterapéuticos, las células cancerígenas liberan una serie de factores que pueden modular la activación inmunológica como se explicó anteriormente en los mecanismos de muerte celular inmunogénica. Adicionalmente, estos factores liberados por las células en proceso de muerte pueden generar una serie de estímulos en otras células tumorales que permanecen viables en el microambiente tumoral, a este fenómeno se le conoce como efecto Bystander (Austin & Villaseca,1998).

El efecto bystander, mejor conocido como efecto espectador, hace alusión a un fenómeno que se produce en una célula cancerosa que se encuentra activa y es destruida por medio de una serie de mecanismos antitumorales, los cuales producen un efecto indirecto en las células tumorales que se encuentran cercanas a la célula tumoral estimulada.

En este contexto, el efecto espectador se refiere a la capacidad de las células tumorales de liberar una serie de factores solubles, como citocinas, que pueden lograr perjudicar o estimular a las células en su entorno, aun cuando las mismas no son el blanco o el objetivo de la respuesta (Kohsaka et al.,2012).

A partir de un conjunto de investigaciones *in vitro*, se ha logrado aclarar como al poner en contacto una quimioterapia o mecanismos radiactivos con una célula tumoral, la misma produce un efecto negativo sobre las células en su entorno (Hall,2003). Este efecto de cercanía se logra llevar a cabo por medio de la posible interacción célula-célula a partir de uniones gap o por la liberación en el microambiente tumoral de factores solubles circulantes que generan una respuesta en todo el tumor (Demidem et al., 2006). Este mecanismo se observa a continuación en la figura 3:

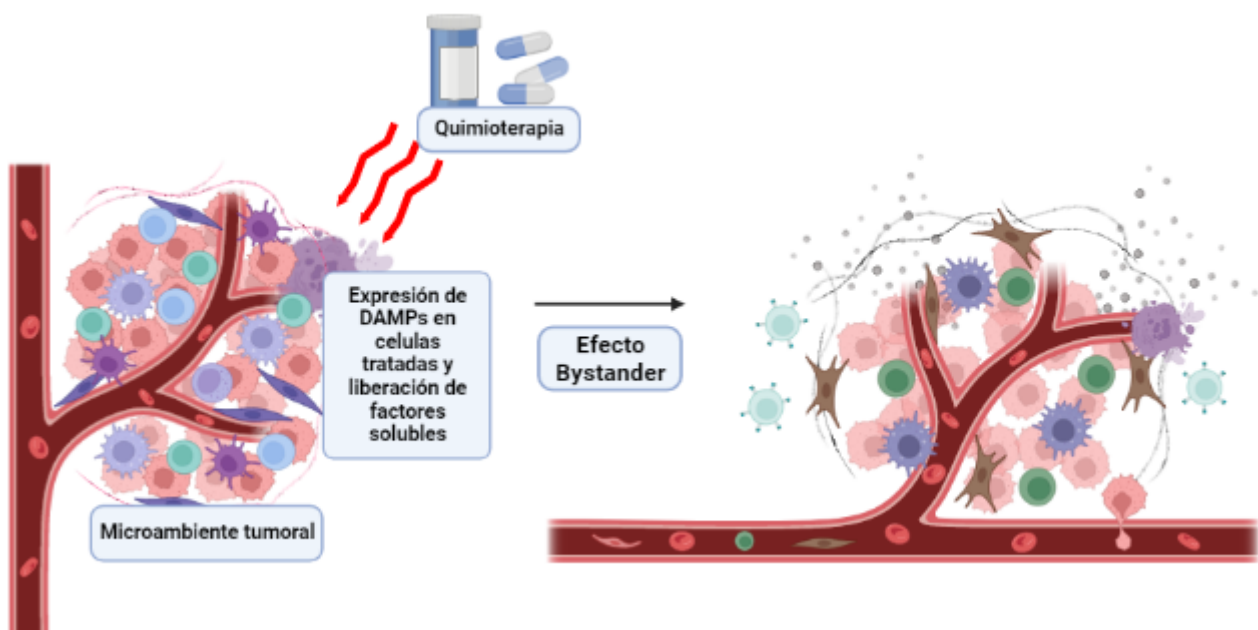


Figura 3. Efecto Bystander producido por la célula tumoral en contacto con la quimioterapia sobre el microambiente tumoral y sus células vecinas. La quimioterapia al inducir la expresión y liberación de DAMPs ocasiona cambios sobre las células vecinas. Elaboración propia

La apoptosis celular es un mecanismo de muerte celular que se activa a partir de una serie de cambios morfológicos que sufren las células, los mismos se basan en fragmentación nuclear, defectos en la membrana y contracción celular, lo cual induce a la formación de cuerpos apoptóticos que engloban los fragmentos celulares, los cuales son eliminados por medio de células con capacidad fagocítica (Galluzzi et al.,2018). No obstante, se ha visto en los últimos años una fuerte asociación entre la apoptosis con el desarrollo del microambiente tumoral, debido a que la misma puede propulsar tanto la formación como el crecimiento de células cancerosas, además de lograr impulsar mecanismos inhibitorios hacia terapia antitumoral (Carneiro & El-Deiry,2020).

La apoptosis en condiciones normales es un proceso que involucra la actividad proapoptótica de BCL-2, la cual favorece la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial (MOMP), además de la liberación y activación de moléculas como el citocromo C, con el fin último de poder formar el apoptosoma y generar el accionar de las caspasas efectoras (Carneiro & El-Deiry,2020). No obstante, no siempre se lleva a cabo el proceso completo, debido a que existen moléculas antiapoptóticas BCL-2. Estas moléculas se encargan de impulsar la expresión y mantenimiento de las células tumorales, como se ha observado en líneas tumorales de glioblastoma, las cuales inducen una protección sostenida ante los mecanismos apoptóticos por medio de un retrocontrol negativo (Vaux & Adams,1988). Sin embargo, existen otras alternativas inhibitorias, como lo son las moléculas FLIP que se unen a las caspasas (como la caspasa 8) y evita su activación (Carneiro & El-Deiry,2020). Este mecanismo se observa a continuación en la figura 4:

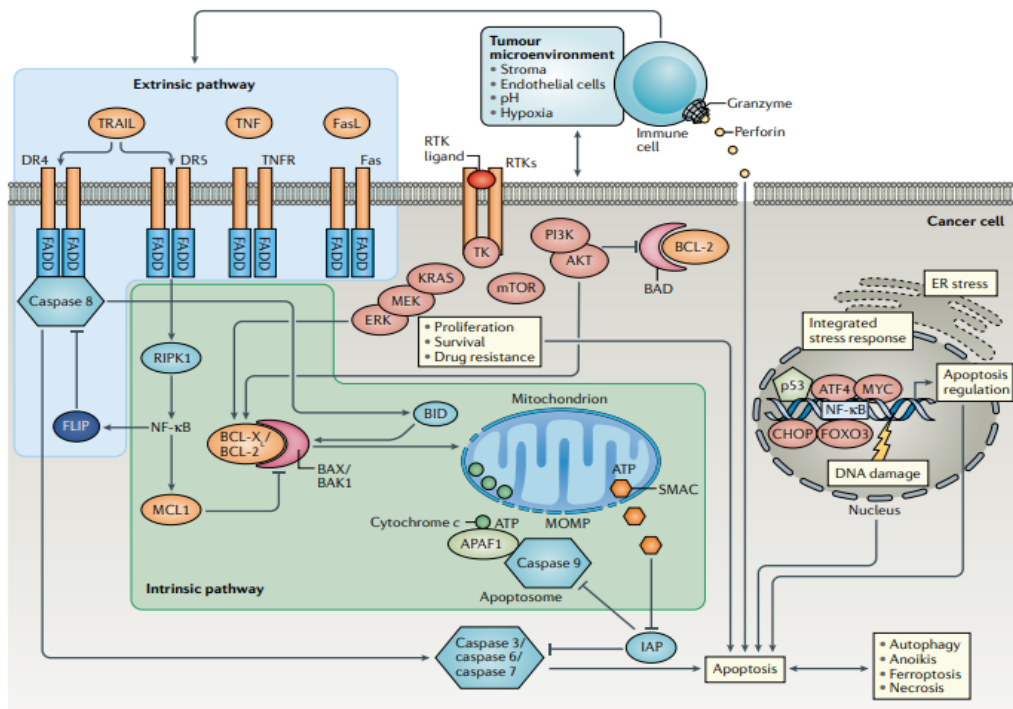


Figura 4. Mecanismo general de la función efectora de la apoptosis, vías de inhibición pro supervivencia tumoral. Recuperado de Carneiro & El-Deiry,2020.

La apoptosis se ha considerado un evento con señalización silenciosa, por su capacidad acelerada de eliminar las células con alteraciones morfológicas por medio de células fagocíticas. Sin embargo, en la actualidad existe una cierta evidencia de que las células en fases apoptóticas emiten una serie de señales que producen un efecto a nivel del entorno celular. Con esto, se reflejan una serie de indicios que promueven mecanismos de reparación tisular y de promoción en la multiplicación de las células vecinas. Esto lo logran llevar a cabo por medio de eventos conocidos como “**proliferación inducida por la apoptosis**”, la cual busca impulsar mecanismos pro tumorales y oncogénicos y la proliferación celular. Tales señales inducen una estimulación de crecimiento en células supervivientes en el entorno tumoral (Fuchs & Steller,2015; Huang et al.,2011).

Con base al efecto producido por la quimioterapia o diversos mecanismos radiactivos, se pueden producir eventos de proliferación inducida por la apoptosis, donde se lleva a cabo la expresión de caspasas, como la caspasa 3 (figura 5.A). La caspasa 3 ha mostrado efecto en las células cancerígenas en fases de apoptosis, debido a que las mismas liberan una molécula de prostaglandina E2 en el microambiente tumoral por medio de la escisión de la fosfolipasa A2. El aumento en la producción de ácido araquidónico genera señales para la proliferación celular, además induce etapas de recaída en los pacientes por medio de la evasión de la respuesta efectora inmune (Castellone et al.,2005; Huang et al., 2011).

Existen otros mecanismos que logran estimular la oncogénesis, por medio de la liberación de vesículas extracelulares apoptóticas como apoEV (figura 5.B). Estas vesículas contienen una serie de moléculas de espliceosoma, como la HNRNPU, que generan una alteración en el empalme del ARN, con lo cual aumenta la oncogénesis y una elevada resistencia a las terapias en líneas celulares de glioblastoma (Pavlyukov et al.,2018; Koren & Fuchs,2021).

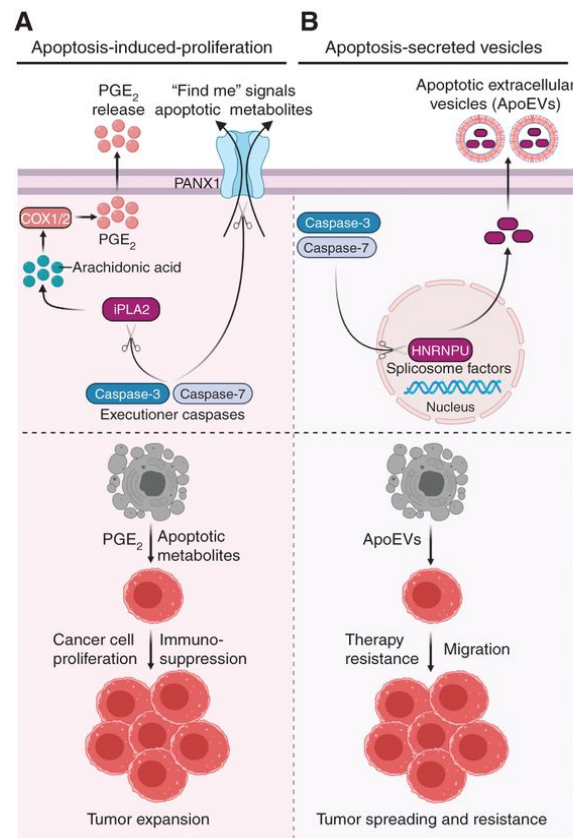


Figura 5. Mecanismos extrínsecos de la apoptosis promotores de la inhibición de efectos antitumorales que promueven la oncogénesis. La proliferación inducida por apoptosis(A) genera la liberación de prostaglandina A2 por parte de la caspasa 3, que induce proliferación de células cancerígenas y la inmunosupresión de la respuesta inmune efectora. Además, existen mecanismos impulsados por la liberación de vesículas extracelulares apoptóticas (B), que en su contenido expresa factores del espliceosoma, los cuales inducen resistencia a la terapia antitumoral y crecimiento tumoral en células receptoras. Recuperada de Koren & Fuchs,2021.

La radiación genera un ambiente oxidativo por medio de la liberación de ROS las cuales producen un daño a nivel celular. La activación del sistema inmune desencadenado por el proceso de radiación viene acompañada de la liberación de una serie de citoquinas por parte de linfocitos,

macrófagos y mastocitos. Moléculas tales como la IL-1, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), los cuales se encargan de generar un ambiente proinflamatorio en células vecinas dentro del microambiente tumoral (Güerci & Córdoba,2015).

Sin embargo, el efecto bystander no ha sido estudiado desde el punto de vista inmunológico con respecto a la liberación de factores solubles en respuesta a tratamientos quimioterapéuticos, y su implicación en la expresión de citoquinas y puntos de control inmune en células vecinas.

1.3.4 Puntos de control inmune

Durante el desarrollo del microambiente tumoral, las células tumorales estimulan la respuesta por parte de CT de forma similar a la desencadenada ante la presencia de microorganismos desconocidos. Esta reacción es mediada por la interacción del receptor de células T (TCR) con la CPA. Esto produce la activación de CT en presencia de células cancerosas, sin embargo, esta expresión celular es regulada por una serie de señales co-estimuladoras e inhibitoras llevadas a cabo por los puntos de control inmune (Campillo et al.,2021).

Los puntos de control inmune mejor conocidos como "immune checkpoints" son los encargados de determinar el tipo de respuesta establecida por las células y los órganos mediadores de la respuesta inmune adaptativa. La respuesta inmunológica desarrollada por nuestro sistema inmune determina cómo se logra realizar la diferenciación entre los antígenos propios de los no propios, por medio de una serie de señales e interacción entre una variedad de células, órganos y tejidos. Tales señales e interacciones logran mantener una tolerancia inmunológica activada para no enfrentarse ante los antígenos propios y por el contrario activar y desarrollar una respuesta de forma eficaz contra los desconocidos (Reyes et al.,2020). Aún con la respuesta ejercida, existe una serie de receptores que desencadenan la producción de las CT, dentro de los mismos se encuentra el CD28, el cuál es considerado un receptor importante en la estimulación. La activación de CD28 al unirse a sus ligandos CD80 y CD86 presentes en las CPA, desarrollan un aumento en la producción de la interleucina-2 y en la supervivencia de las CT (Campillo et al., 2021). Este proceso se muestra a continuación en la figura 6:

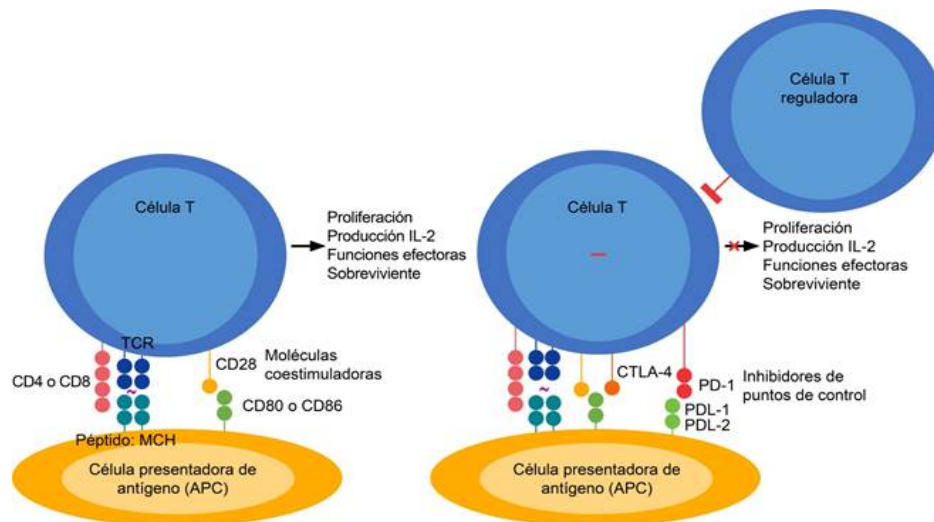


Figura 6. Estímulo desencadenante de activación de las células T por medio de la interacción de la célula presentadora de antígenos con el receptor de células T (TCR). Proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxico (CTLA-4) y PD-1 son puntos de control inmune activados posterior a la activación de CT, con el fin de reducir la respuesta inmune producida. Recuperada de Campillo et al.,2021.

Esos receptores no siempre logran llevar a cabo su estímulo de forma directa sobre las CT, debido a que se genera sobre la superficie celular, una serie de estímulos pertenecientes a la familia B7/CD28 encargadas de mediar la sinapsis inmunitaria y con esto la regulación de la activación de la célula dependiente de la señal inicial emitida. Su principal objetivo es controlar la cascada de activación de CT y ocasionar el menor daño colateral dado por una exacerbación de la respuesta (Paulos & June,2010).

La unión de las señales inhibitoras emitidas por la familia B7/CD28 con sus ligandos inmunológicos busca evitar la apoptosis y muerte celular de células viables y tejidos normales, mediante la regulación de las CT a través de receptores como el receptor 1 de muerte programada (PD-1) y CTL-4. Estos receptores se encuentran expresados en la CT luego de su proceso normal de activación y su función es inhibir su respuesta (Campillo et al.,2021).

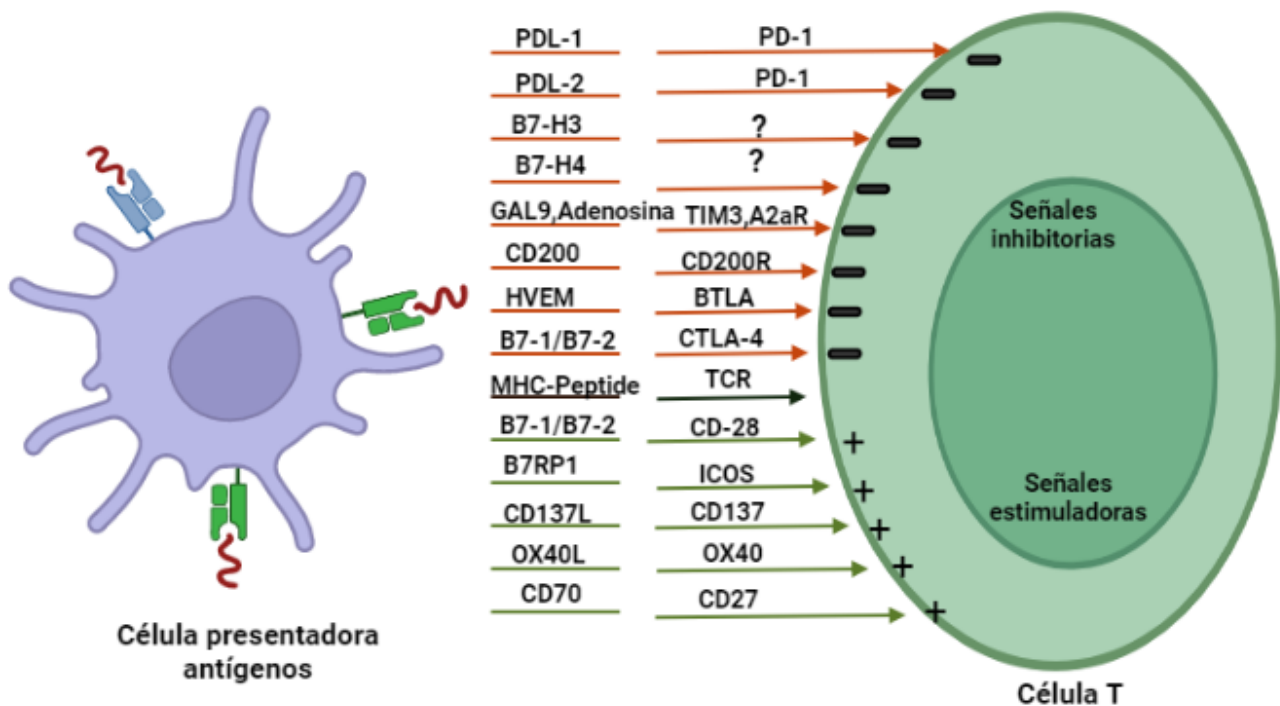


Figura 7. Señales coestimuladoras e inhibitorias que desencadena la familia B7/CD28 en la interacción entre la CPA (color morada) y la CT (color verde). La flecha naranja hace referencia a la inhibición de la activación de las CT, por el contrario, la flecha verde son los ligandos y receptores que potencian la señal de activación de las células T. Elaboración propia, modificada a partir de Ramsay,2013.

Dentro de los puntos de control, se encuentra el CTLA-4, este se caracteriza por ser el primer receptor inhibitorio identificado sobre la activación de CT. Esta molécula se encuentra expresada sobre la superficie de la célula y la misma es activada por medio de la interacción con sus ligandos B7-1(CD80) y el B7-2(CD86) (Ramsay,2013; Huang et al.,2019).

Su función principal es establecer una respuesta de inmunotolerancia, debido a que tanto CTL-4 como CD28 comparten los mismos ligandos en los linfocitos. Por esta razón, durante la atracción de linfocitos en la sinapsis inmunológica, se busca que la unión del CTL-4 a los linfocitos sea más efectiva que con CD28, limitando así el posible efecto co-estimulador producido por la respuesta ejercida del CD28 sobre la CT. Mientras que la unión con CTL-4 logra generar señales inhibitorias que limitan la funcionalidad de los linfocitos, principalmente en órganos linfoides secundarios (Cárdenas et al.,2022).

El nivel de expresión de CTL-4 en la superficie de la CT depende del efecto que esté generando el CD28. Debido a que la función principal del CTL-4, es inhibir la señal y la unión del CD28 con el ligando, mediante una inhibición competitiva al bloquear su unión con el ligando (Ramsay,2013).

Además, existen otras maneras de lograr controlar la actividad de forma T independiente, por medio del secuestro y transendocitosis de los ligandos del CD28, CD80 y CD86 (Qureshi et al.,2011).

Por otro lado, se encuentra PD-1, el mismo se encuentra disponible como glicoproteína en la membrana celular a la espera de su unión con sus ligandos PD-L1 y PD-L2. Este receptor inhibitor se encarga de producir una inmunosupresión e inactivación de la respuesta generada por las CT (Cárdenas et al.,2022). Además, se encarga de interferir en el contacto entre la CPA con la CT, al modificar la señal del TCR (Pardoll,2012).

Un punto importante para recalcar es que no solamente existen receptores inhibitorios dentro de la familia B7/CD28, sino también coestimuladores de la respuesta generada. Uno de ellos es ICOS, el cual se encarga de potenciar la señal y la respuesta inmune, y el mismo se encuentra presente en las CT activadas y no en aquellas que se encuentran en reposo (Montes, 2017). ICOS-L, es una proteína transmembrana expresada en células como macrófagos, células dendríticas y células B y su interacción con su receptor ICOS activa el factor de transcripción Bcl-6 y con ello la producción de células T foliculares en los centros germinales (Montes,2017). Por último, además de la expresión celular, busca aumentar la secreción de citoquinas TH2 como la IL-4, IL-5, IL-10 e IL-17 que producen una aceleración en la respuesta tipo humoral, con la consecuente producción y maduración de anticuerpos y una memoria inmunológica efectiva (Montes,2017). No obstante, cabe recalcar que el microambiente tumoral se caracteriza por ser un buen estimulador de linfocitos T reguladores, lo que ayuda a que se genere un ambiente inmunosupresor.

Otro factor inmunomodulador perteneciente a la superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral es el HVEM (TNFRSF14). Este receptor se encuentra expresado en células hematopoyéticas y mieloides y dentro de sus ligandos se encuentran TNF, linfotóxina- α (LT- α), BTLA, LIGHT, entre otros. La capacidad de poder unirse a una gran variedad de ligandos es debido a su estructura tridimensional y a la diferencia en sus dos principales dominios extracelulares CRD1/CRD2 y CRD2/CRD3. La variación en sus ligandos permite que BTL4 y CD160 puedan unirse de forma efectiva al primer dominio mencionado y LIGHT al segundo consecutivamente (Yago,2018).

El HVEM es conocido como un interruptor celular por su capacidad de activar tanto vías coestimuladoras como inhibitoras, esto dependiendo de la molécula al cual se una, debido a que el mismo logra actuar como receptor y producir una serie de transducción de señales o como ligando, generando mecanismos de señalización (Yago,2018). Por este motivo, al interactuar HVEM con LIGHT, se desarrolla una señal estimuladora para llevar a cabo la producción y liberación de una serie de citoquinas proinflamatorias y la promoción de supervivencia celular. Por otro lado, al interactuar

con CD160 y BTL4 se produce un retrocontrol negativo sobre las CT, generando así una inhibición de las mismas (Han et al.,2019).

Las señales emitidas por los puntos de control inmune permiten la posibilidad de inhibir la respuesta efectiva por parte de las células T durante una transformación maligna, generando que se produzca una proliferación aumentada del tumor. Las células tumorales de glioblastoma generan un rol inmunosupresor para lograr evadir los mecanismos de la respuesta inmune. Este proceso lo llevan a cabo por medio de factores como TGF- β y moléculas inmunoreguladoras, las cuales son las encargadas de generar un mecanismo inhibitorio sobre las células T. A partir de este mecanismo, se induce una tolerancia antigénica que desarrolla un descontrol en la respuesta inmune, además de la inhibición de la proliferación de células T por parte de las señales emitidas por los puntos de control inmune (Valenzuela,2017; Ramsay,2013). Por esta razón, los tratamientos contra cáncer utilizan la inhibición de receptores como CTLA-4 y PD-1 como alternativas terapéuticas, con el fin de lograr una respuesta antitumoral y un correcto funcionamiento de la actividad inmune, con el objetivo de un ataque efectivo hacia las células tumorales (Valenzuela,2017).

Capítulo II. Marco metodológico

Materiales y métodos

2.1 Cultivo celular

Se realizó el cultivo de la línea celular humana de glioblastoma multiforme SF-295 en monocapa, la cual se encuentra hidratada con medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y anti-anti (antimicrobiano-antimicótico) al 1%. Posteriormente, se efectuó la incubación de las células a 37°C con CO₂ al 5%. A partir de la botella cultivada, se ejecutaron 2 pasajes semanales, cada 3 días por medio de la separación de la monocapa celular con el reactivo TrypLE y su incubación por 3 minutos a 37°C con CO₂ al 5%. Se recogió la monocapa separada y se centrifugó por 5 minutos a TA. Por último, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón en el medio mencionado anteriormente para cultivar un 10% del volumen total en la botella.

2.2 Determinación de curva de letalidad para la epirubicina y temozolomida

Sé determinó la concentración a la cual la temozolomida y la epirubicina generan un porcentaje similar de muerte celular en la línea SF-295 con respecto al control. Se sembraron placas de 12 pocillos de manera que en 24 horas tuvieran un 80-90% de confluencia con un volumen por pocillo de 1500 μ L de medio RPMI suplementado con SFB al 10% y anti-anti (antimicrobiano-antimicótico) al 1%. Posteriormente, se aplicaron 4 concentraciones diferentes de cada quimioterapia. En el caso de la temozolomida se aplicaron 100, 200, 400 y 600 μ M y para la epirubicina 0.0125, 0.0250, 0.05 y 0.1 μ g/mL, basado en estudios previos. Se realizó una incubación de 48 horas a 37°C de la monocapa con las quimioterapias a las diferentes concentradas respectivamente.

Se procedió a realizar 2 lavados con PBS estéril y se adicionó medio de cultivo fresco de RPMI suplementado con SFB al 10% con anti-anti (antimicrobiano-antimicótico) al 1% el cual se incubó por 24 horas adicionales. Concluido este tiempo, se procedió a determinar el porcentaje de muerte celular por citometría de flujo.

2.3 Cuantificación de muerte celular

A partir del protocolo establecido en el laboratorio de Quimiosensibilidad Tumoral del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET) se determinó la muerte celular por medio de la tinción de yoduro de propidio y anexina V-FITC por citometría de flujo, donde se realizó la lectura en

el citómetro de flujo Cytoflex LX (Beckman Coulter) del Centro e Investigación en Cirugía y Cáncer (CICICA).

Para la cuantificación se procedió a eliminar el sobrenadante presente en los pocillos de la placa de 12 que se trabajó en el apartado de curva de letalidad (Apartado 2.2). Para desprender las células de la placa, se añadieron 100 ul del reactivo TrypLE, el cual se dejó actuar sobre la monocapa por un tiempo de 2 minutos a 37°C. Concluido el tiempo, se añadieron 600 ul de PBS para neutralizar el efecto del reactivo anterior y se observó por medio del microscopio invertido la separación de la monocapa celular del pocillo. Las células fueron recolectadas en un tubo eppendorf, el cual fue centrifugado a 160 g por 5 min a 4°C. Luego de la centrifugación, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 100 ul del master mix de tinción. Se incubó por 15 min en oscuridad a 4°C. Pasado el tiempo, se agregó 1 mL de Annexin buffer 1X a cada tubo y se centrifugó en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Por último, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 300 ul de Annexin buffer 1X para medir en el citómetro de flujo Cytoflex LX (Beckman Coulter).

2.4 Preparación de medio condicionado

En placas de 20 cm con la monocapa de la línea celular SF-295 a 80-90% de confluencia, se añadieron los tratamientos quimioterapéuticos en la concentración establecida en el apartado 2.2 (Determinación de la curva de letalidad para epirubicina y temozolomida) en las condiciones de quimioterapia, además se mantuvo una condición control y células necróticas (congeladas), las cuales contenían medio RPMI suplementado con SFB y anti-anti. Luego, se realizó la incubación de las placas por 48 horas aproximadamente para cada una de las condiciones experimentales. Posteriormente, se realizaron los lavados con PBS estéril de forma rigurosa por la pared del pocillo para evitar la alteración de la monocapa. Al terminar, se agregó medio fresco a cada placa por 24 horas adicionales. Al finalizar, se procedió a trabajar la condición de células congeladas, las cuales se usaron de modelo para simular muerte celular necrótica. En este caso, donde se realizó una incubación corta en hidrogeno líquido hasta el congelamiento total del medio. Luego de descongelar el medio se realizaron alícuotas de todas las condiciones experimentales para almacenarse a -80°C hasta su uso.

2.5 Estimulación de células espectadoras

Se sembraron 2 placas de 6 pozos con la línea celular SF-295, una para la condición de 2 horas y otra para 24 horas, hasta tener una confluencia del 80-90%. A partir de la monocapa a la confluencia establecida, las células se estimularon con el medio condicionado preparado con los diferentes tratamientos quimioterapéuticos según el apartado 2.4 y se incubaron por aproximadamente 2 horas.

Luego, se procedió a remover el medio y se realizó dos lavados con PBS estéril de forma rigurosa por la pared del pocillo. Posteriormente, se añadió el medio de recolección a las dos placas. A partir de este punto del experimento, se trabajaron las placas según el tiempo y la condición establecida. Pasado el tiempo de la incubación (2 horas o 24 horas aproximadamente), se recogió el sobrenadante y se depositó en tubos estériles rotulados según cada tratamiento quimioterapéutico y se dejaron las células cultivadas en monocapa para realizar el apartado 2.6 de extracción de ARN.

2.6 Extracción de ARN

A partir de células cultivadas en monocapa en placas de 6 pozos, una incubada por 2 horas y otra a 24 horas del apartado e, se realizó la recolección y lisis celular con el reactivo TRIzol™ (Invitrogen) en tubos estériles, a los cuales se les añadió cloroformo y se mezclaron suavemente por inversión. Todo procedimiento en que se utilice el TRIzol y el cloroformo se realizó en la capilla de extracción de gases. Las muestras se centrifugaron para obtener la separación de las fases y poder recolectar la fase acuosa (superior) que contiene principalmente el ARN. La fase con ARN se traspasó a un tubo nuevo al cual anteriormente se le añadió el isopropanol. Se incubó, centrifugó y se descartó el sobrenadante. Posteriormente se realizaron 2 lavados al pellet obtenido con etanol frío al 75%. Nuevamente se procedió a centrifugar las muestras y se resuspendió el pellet por pipeteo en agua libre de ARNasas. Concluida la solubilización, se determinó el rendimiento y la pureza del ARN obtenidos utilizando un NanoDrop (Thermo Fisher) mediante la relación de las absorbancias a 260/280 nm y a 260/230 nm la pureza de la muestra. Del ARN obtenido, se procedió a realizar la retrancripción a partir del kit comercial de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad de la casa comercial Thermo Fisher Scientific.

2.7 Cuantificación de los niveles de expresión de los puntos de control inmunológico

Se llevó a cabo una PCR cuantitativa en tiempo real a partir del kit comercial Power Up SYBR™ Green Master mix de la casa comercial Thermo fisher Scientific (catálogo: A25742), siguiendo las especificaciones del fabricante, con una cantidad de ADNc en cada reacción de qPCR de 20 ng para las 10 condiciones experimentales. Los cebadores (primers) específicos para la PCR fueron diseñados por medio de la plataforma en línea Primer-Blast (Cuadro I) los cuales se utilizaron a una concentración de 0.03 mM.

La expresión relativa con respecto a la condición control se calculó usando el método comparativo $\Delta\Delta Ct$. Para la normalización de los datos se utilizó el gen de referencia (*housekeeping*

gene) *TBP* (Cuadro 1) a 0.3 mM. Este gen de referencia se eligió según el valor de estabilidad que se obtuvo mediante el Software NormFinder (0.003).

Los análisis estadísticos se ejecutaron en GraphPadPrism 7.02 (EUA). Para comparar la expresión génica de los PCI entre grupos se realizó una prueba de Kruskal-Wallis y se estableció una relación significativa cuando $p < 0.05$.

Cuadro I. Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR cuantitativa en tiempo real de las diferentes condiciones experimentales

Gen	Proteína	Cebador hacia adelante	Cebador reverso
<i>TBP</i>	TBP	TGTATCCACAGTGAATCTTGGTTG	GGTTCGTGGCTCTCTTATCCTC
<i>ICOSLG</i>	ICOS-L / CD275	GTTTCACTGCCTGGTGTGAGC	ACGACGGGCACGCTGAAGTTTG
<i>PDCD1L1</i>	PD-L1 / CD274	TGCCGACTACAAGCGAATTACTG	CTGCTTGTCCAGATGACTTCGG
<i>TNFRSF14</i>	HVEM / CD270	TTCTCTCAGGGAGCCTCGTCAT	CTCACCTTCTGCCTCCTGTCTT

2.8 Cuantificación de la secreción de interleuquina-38

Por medio del protocolo de la técnica de inmunoensayo (ELISA) para la determinación de IL-38 del Laboratorio de Quimiosensibilidad Tumoral del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET) se llevó a cabo la cuantificación de secreción de la IL-38. Se realizó un recubrimiento de las placas para ELISA con los estándares y las muestras, las cuales corresponden a los sobrenadantes obtenidos de las placas de 6 pozos en el apartado 2.5 y se realizó una incubación por aproximadamente una noche a 4°C. Transcurrido el tiempo, se realizó el recubrimiento de la placa con el anticuerpo primario de IL-38, seguido del anticuerpo anti-rata biotinilado, la adición de peroxidasas (HRP) y del sustrato, con los tiempos de incubación establecidos, Por último, se realizó la medición de la absorbancia a 450 nm con un filtro de referencia a 630 nm.

2.9 Cuantificación de citoquinas

Se realizó la cuantificación de una serie de citoquinas en los sobrenadantes de los experimentos realizados mediante citometría de flujo incluyendo a la IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, TNF, IFN-alfa, IFN-gamma, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), proteína 10 inducible por interferón (IP10), MCP-1, MIP-1 alfa, RANTES, MIG. Posterior a la determinación de la expresión de las citoquinas mencionadas anteriormente en la línea celular SF-295, se seleccionaron las citoquinas

que presentaban una alta expresión entre las que destacan IL-6, IL-8, TNF, proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), IP-10. Se utilizaron los kits comerciales Flex Set Cytometric Bead Array de BD Biosciences de acuerdo con las especificaciones del fabricante y las muestras fueron analizadas por medio del citómetro de flujo Cytotflex LX (Beckman Coulter)

2.10 Análisis de datos

Los datos se analizaron para lograr determinar los porcentajes de muerte celular utilizando el programa de análisis del Cytotflex LX (Beckman Coulter). Los valores de las citoquinas y los porcentajes de muerte celular obtenidos fueron graficados y analizados utilizando el programa Graphpad, con ellos se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey con un intervalo de confianza del 95% para determinar diferencias significativas entre los grupos experimentales.

Capítulo III. Análisis de Resultados

3.1 Curva de letalidad

Con el objetivo de lograr caracterizar el tipo de muerte celular inducidos por las dos quimioterapias utilizadas, la temozolamida y la epirubicina, las células de la línea celular SF-295 fueron estimuladas por ambas quimioterapias a cuatro concentraciones diferentes.

En la figura 5, se muestran la proporción de células vivas y las muertas por dos tipos diferente de mecanismos de muerte celular, en las cuales se destacaron las células apoptóticas y las necróticas, esto con base en la concentración utilizada de epirubicina y temozolomida. Las 4 concentraciones utilizadas para llevar a cabo la curva de letalidad fueron 0,0125, 0,025, 0,05 y 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para epirubicina y 100, 200, 400 y 600 μM para temozolomida. Se observa que la cantidad de células muertas por ambos tipos de muerte fueron aumentando de manera dosis dependiente. Por otro lado, se logra evidenciar que el tipo de muerte celular predominante inducido por las quimioterapias al aumentar la dosis, es la necrosis o apoptosis tardía, seguido en menor proporción por la apoptosis, la cual se mantiene en un porcentaje más constante.

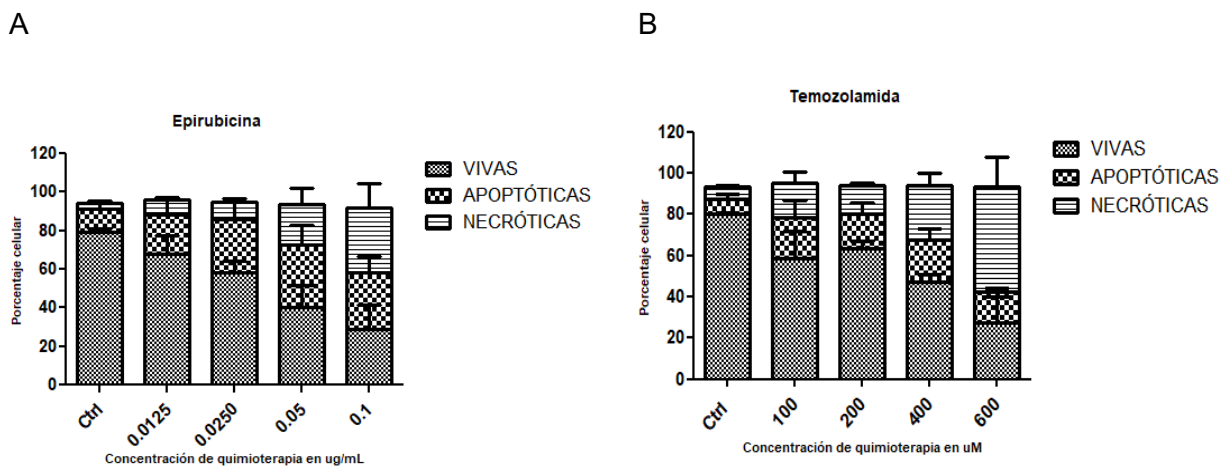


Figura 8. Determinación del porcentaje celular correspondiente a la condición viable y a los diferentes mecanismos de muerte celular (apoptosis y necrosis) expuestas a diferentes concentraciones de (A) epirubicina en $\mu\text{g}/\text{mL}$ y (B) temozolomida en μM . Los resultados se muestran como promedio y error estándar a partir de 3 experimentos individuales.

Con el fin de lograr determinar la concentración de epirubicina y temozolomida donde se presenta un porcentaje similar de muerte celular de la línea SF-295, se procede a realizar un análisis

de los datos obtenidos como se observa en la figura 9, para encontrar la concentración donde se presenta esta relación. Se determina que en la concentración donde se observa esa similitud es en la concentración 3 de ambas quimioterapias, siendo 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la epirubicina y 400 μM para la temozolomida.

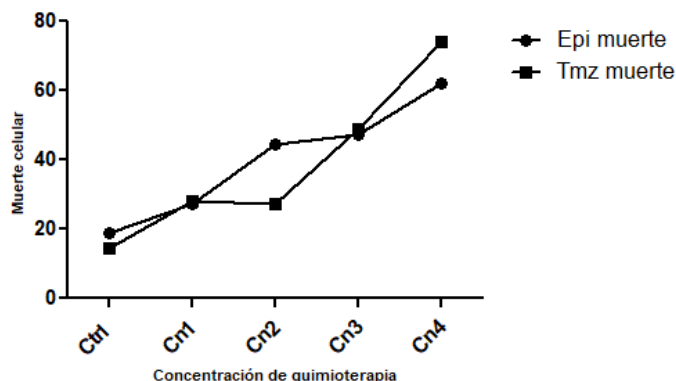


Figura 9. Comparación de muerte celular de la línea SF-295 con respecto a diferentes concentraciones de los dos tipos de quimioterapias utilizadas. En el caso de la epirubicina se utilizó 0,0125, 0,025, 0,05 y 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y para la temozolomida 100, 200, 400 y 600 μM respectivamente, en orden de la concentración uno a la cuatro. Los resultados se muestran como promedio y error estándar de 3 experimentos individuales.

3.2 Cuantificación de los niveles de expresión de los puntos de control inmunológico

Para determinar la expresión génica relativa de los puntos de control inmunológicos inducidos por las diversas condiciones experimentales, control y quimioterapias añadidas, se establece el housekeeping estadísticamente más estable por medio del valor de estabilidad del software NormFinder (0.003), obteniendo así las mejores relaciones estadísticas con el TBP. Posteriormente se procedió a cuantificar una serie de genes experimentales de los ligandos de puntos de control inmunológicos como lo son *PD-L1*, *TNFRSF14* e *ICOSLG*.

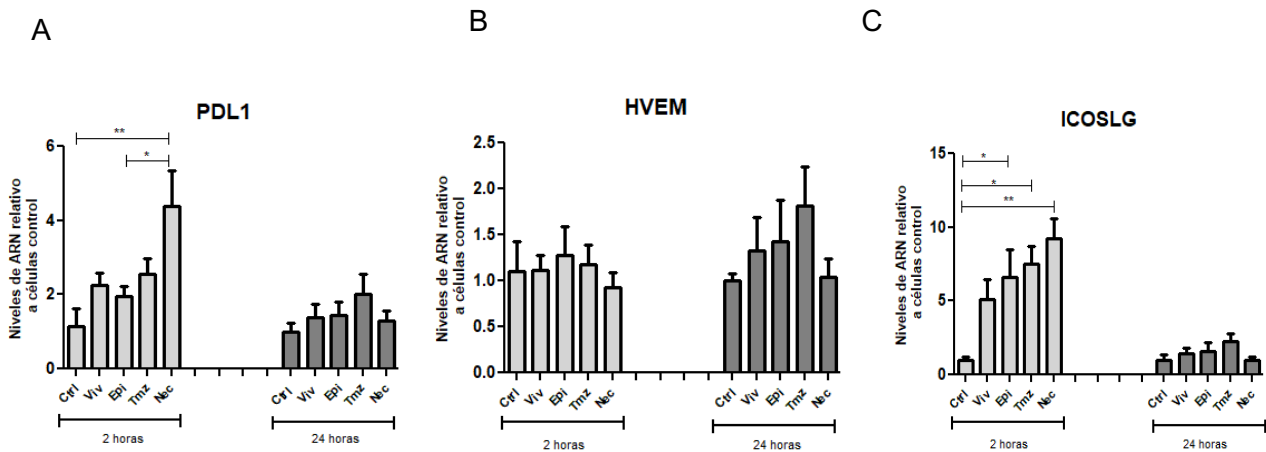


Figura 10. Nivel de expresión de los puntos de control inmunológico (A) PD-L1, (B) HVEM y (C) ICOSLG en relación con diferentes condiciones experimentales; Ctrl: Células Control, Viv: Células vivas, Epi: Quimioterapia epirubicina, Tmz: Quimioterapia temozolomida y Nec: Células necróticas a las 2 y 24 horas respectivas. Los resultados se muestran como promedio y error estándar de 5 experimentos individuales a partir del programa Graphpad Prism 7.02. La comparación génica de los PCI entre grupos se realizó una prueba de Kruskal-Wallis y se estableció una relación significativa cuando $p < 0.05$

Los puntos de control inmune, como se observa en la Figura 10, mantienen una expresión relativamente alta durante las primeras 2 horas experimentales en la mayoría de las condiciones. En este punto, se observa un aumento significativo en la expresión de PD-L1 e ICOSL en respuesta al tratamiento con medio condicionado proveniente de células necróticas. Sin embargo, se presenta una drástica disminución en la expresión al realizar su medición a las 24 horas, en el caso de PD-L1 e ICOSL. En el caso de HVEM, no se observan diferencias significativas entre ambos intervalos de tiempo.

3.3 Cuantificación de la secreción de Interleuquina-38

Con el fin de determinar el nivel proteico cuantificable de la secreción de la interleuquina-38, se analizaron los datos a partir de un ANOVA de una vía y la variabilidad entre grupos se consideró por medio de un método de Tukey, dentro de una misma categoría de tiempo.

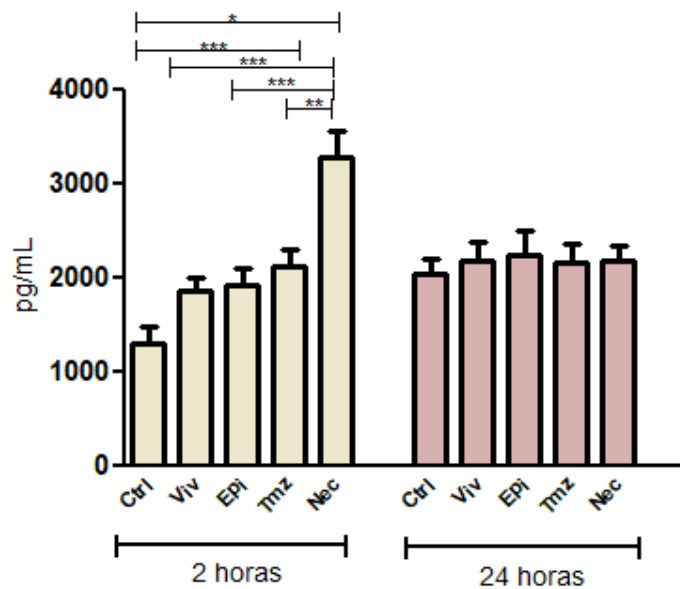


Figura 11. Cuantificación de la secreción de interleuquina-38 en relación con las diferentes condiciones experimentales; Ctrl: Células Control, Viv: Células vivas, Epi: Quimioterapia epirubicina, Tmz: Quimioterapia temozolomida y Nec: Células necróticas a las 2 y 24 horas respectivas. Los resultados se muestran como promedio y error estándar de 6 experimentos individuales. Los valores promedio de las réplicas de cada uno de los ensayos se analizaron a partir de un ANOVA de una vía, además se utilizó el método de Tukey para determinar la variabilidad entre grupos experimentales dentro de una misma categoría de tiempo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

En la figura 11, se observa una variación estadísticamente significativa en la concentración de IL-38 a las 2 horas experimentales entre sus condiciones de prueba, contrario a las 24 horas, donde se presenta un comportamiento de expresión de la interleuquina relativamente constante. En el caso de la variabilidad observada a las 2 horas, se logra determinar que existe un aumento significativo en respuesta al medio condicionado de células necróticas con respecto a las demás condiciones. Además de observar una diferencia significativa entre la condición control y el tratamiento quimioterapéutico temozolomida.

3.4 Cuantificación de citoquinas

Para cuantificar la secreción de citoquinas liberadas al ser inducidas y estimuladas por las diversas condiciones experimentales, se realizó la determinación por citometría de flujo en 2 intervalos de tiempos.

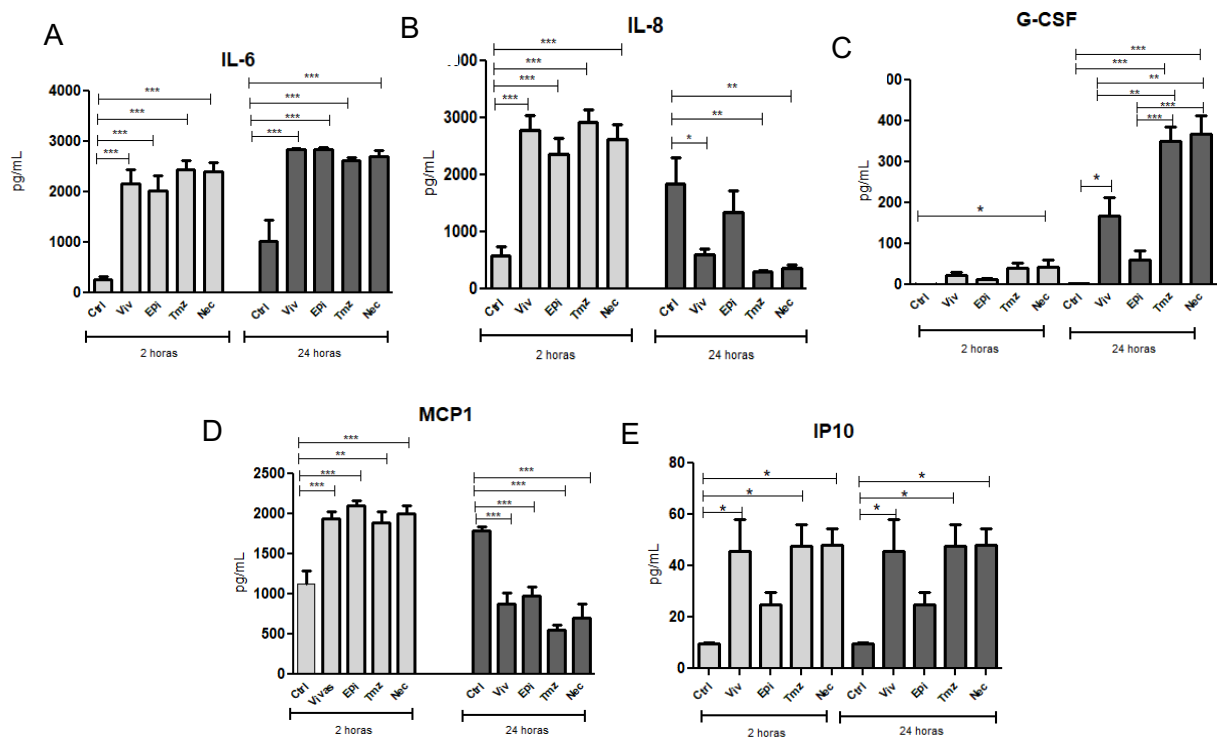


Figura 12. Cuantificación de la secreción de una variedad de citoquinas IL-6 (A), IL-8 (B), G-CSF (C), MCP-1 (D) e IP10 (E) en relación con las diferentes condiciones experimentales: Ctrl: Células Control, Vivas: Células Vivas, Epi: Quimioterapia epirubicina, Tmz: Quimioterapia temozolomida y Nec: Células necróticas a las 2 y 24 horas respectivas. Los resultados se muestran como promedio y error estándar de 6 experimentos individuales. Los valores promedio de las réplicas de cada uno de los ensayos se analizaron a partir de un ANOVA de una vía, además se utilizó el método de tukey para determinar la variabilidad entre grupos experimentales dentro de una misma categoría de tiempo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Como se logra apreciar en la Figura 12, el nivel de expresión de las citoquinas varía entre las diferentes condiciones experimentales (Control, tratamientos quimioterapéuticos y células necróticas) y el periodo de tiempo analizado (2 y 24 horas). De manera general, se observa en la mayoría de las interleuquinas, diferencias significativas entre la condición control en relación con las condiciones experimentales de medio condicionado de células con tratamiento quimioterapéutico (epirubicina y temozolomida) y células necróticas en ambos periodos de tiempo. Además, cabe resaltar que el nivel de expresión de la citoquina G-CSF aumenta directamente proporcional al intervalo de tiempo experimental, con un incremento significativo a las 24 horas. Por el contrario, en el caso de citoquinas como la IL-8, MCP-1 ocurre lo inverso a lo mencionado anteriormente, se presenta una disminución en el nivel de expresión conforme aumenta el tiempo de incubación.

En el caso de la IL-6 se observa un aumento significativo en todas las condiciones experimentales con respecto al grupo control, pero sin variaciones entre ellas. Esto sucede de forma similar a las 2 horas para MCP-1, sin embargo, a las 24 horas se observa un resultado opuesto, donde la concentración de MCP-1 es menor en las condiciones experimentales que en el control. En el caso de la IL-8, se observa el mismo patrón que para la IL-6 y MCP-1 a las 2 horas, sin embargo, a las 24 horas se presenta una disminución en la concentración de IL-8 con respecto al control en todas las condiciones experimentales excepto en las células tratadas con medio condicionado de epirubicina. Finalmente, en el caso de G-CSF e IP-10 la principal observación es que detecta una concentración menor de estas citoquinas en respuesta al medio condicionado de epirubicina en comparación con los demás grupos experimentales.

Discusión

El glioblastoma multiforme se ha caracterizado por presentar una serie de alteraciones en los mecanismos inmunológicos que le permiten presentar una elevada resistencia a los diversos tratamientos quimioterapéuticos aplicados, de ahí su variación en la efectividad de las dosis de los medicamentos y su capacidad antitumoral. Para contrarrestar esto, una estrategia es incrementar la concentración de las dosis, con lo cual aumenta la posibilidad de presentarse toxicidad por el tratamiento (Wang et al., 2015).

De estudios realizados a pacientes con diferentes tumores de glioma, se obtiene que las dosis calculadas de quimioterapia se determinan a partir del tamaño del tumor, debido a que el análisis de dosis efectiva varia estudios *in vitro* e *in vivo* no logran ser comparables, ya que a nivel *in vivo* existen variables propias de cada paciente, por el contrario, a nivel *in vitro* existen factores de estudio tanto de metodología como de condiciones experimentales, las cuales no se pueden traslapar.

En un estudio realizado a pacientes que presentan recaídas de tumores de células germinales se utilizan dosis relativamente bajas de temozolomida (150-200 mg/m²) (Vera et al.,2021). Por otro lado, en un análisis realizado por Yung y colaboradores, utilizaron las mismas dosis (150-200 mg/m²) en pacientes con recurrencia o progresión de glioblastoma multiforme y se vio una efectividad superior en comparación con el estudio anterior, de aproximadamente 21% a los 6 meses (Yung et al., 2000).

Ambas quimioterapias utilizadas en este experimento inducen citotoxicidad de manera dosis dependiente, con un aumento importante de células apoptóticas y necróticas. Esta situación correlaciona con los estudios publicados por Moghadam y colaboradores, los cuales destacan que la quimioterapia produce principalmente la muerte por medio de apoptosis (Moghadam et al., 2018) y Madrigal de León (2020) con base en sus estudios experimentales logra determinar que se presenta tanto la apoptosis tardía como la necrosis celular (Madrigal de león, 2020).

En la curva de letalidad observada en la Figura 5, se logra apreciar un aumento de la tasa de muerte celular de forma directamente proporcional a la concentración del tratamiento quimioterapéutico aplicado, viéndose el mismo efecto en ambas quimioterapias (temozolomida y epirubicina). Por el contrario, el incremento en la concentración de las drogas presenta una relación inversa con la cantidad de células viables.

Este patrón de aumento de mortalidad y disminución de la viabilidad celular al aumentar la concentración es característico, debido a que la curva de dosis-respuesta de los tratamientos

quimioterapéuticos presentan una forma sigmoidea, donde la efectividad de la droga es mayor en la fase lineal reduciendo las células malignas, a causa de su impacto sobre el ciclo celular. Este efecto se observa en estudios realizados sobre el efecto de la temozolomida a las 72 horas de la aplicación, observándose una depleción del porcentaje celular en G0, G1 y S. Sin embargo, aumentaron las células en G2/M, con una detención del mismo entre G2 y la fase de mitosis (Shen et al.,2014). Por otro lado, se ha documentado que la cantidad de la droga presenta una relación positiva con la eficacia ante el tumor sólido (Chu,2019). No obstante, se debe tomar en cuenta la posibilidad de toxicidad dependiendo del paciente.

En un estudio experimental del efecto citotóxico de la temozolomida sobre una línea celular de glioblastoma de ratón se observó el mismo efecto de la quimioterapia al observado en este estudio, al inducir un aumento en la cantidad de células necróticas en relación con la concentración de la dosis utilizada (Madrigal de León, 2020).

En ensayos *in vitro* donde se ha buscado determinar la efectividad de la epirubicina en tumores sólidos, especialmente en cáncer de mama, se observa un efecto similar al obtenido en este estudio, presentándose una disminución en la viabilidad celular al aumentar la dosis utilizada (Wang et al.,2015). A pesar de que esta quimioterapia no se utiliza para el tratamiento de glioblastoma, en el presente estudio fue incorporada como control positivo ya que se ha demostrado su capacidad de inducir muerte celular inmunogénica.

Soni y colaboradores, en un ensayo *in vitro* de viabilidad celular aplicado a diferentes concentraciones de temozolomida concordaron con los resultados obtenidos en la Figura 6, donde el porcentaje de muerte celular al 50% de las células tumorales se obtuvo en una concentración de 400 μ M en la mayoría de las líneas celulares utilizada (Soni et al.,2021).

Un punto importante para considerar es que la comparación entre diversos estudios podría presentar ciertas limitaciones, debido a las posibles diferencias entre las líneas celulares, métodos de cultivo y la forma de determinar la efectividad de los tratamientos. No obstante, la efectividad del uso de la temozolomida no se encuentra en discusión, ya que aún con la variación en las dosis quimioterapéuticas, la eficacia de este tipo de tratamiento quimioterapéutico no se ha visto limitada, debido a que el aspecto experimental más importante, es lograr determinar la dosis efectiva, considerando todas las variables experimentales.

En los mecanismos de muerte celular observados en la Figura 5, se observa un mayor incremento en el porcentaje de células apoptóticas desde concentraciones relativamente bajas. En el

caso de la epirrubicina es evidente un aumento más gradual en las células en fase de necrosis. Por su parte la temozolomida desarrolla una cantidad muy constante de muerte apoptótica sin importar la concentración a la cual fue expuesta la monocapa celular y un incremento muy marcado en la muerte por necrosis al incrementar la dosis

En un estudio realizado en un modelo *in vitro* de glioblastoma, se observó que el daño celular producido por la quimioterapia en un rango de 10-100 uM fue mediado en mayor proporción por el mecanismo de muerte celular inducido por la apoptosis y de manera insignificante por la necrosis. Los autores encontraron una alteración en el estado redox con la generación de ROS y con esto la reducción del glutatión, las cuales son señales para la activación de la caspasa 3 que induce apoptosis (Khazaei & Pazhouhi,2017). He & Kaina (2019) concuerdan con lo mencionado anteriormente, debido a que establecen que la muerte celular está direccionada de forma lineal con la concentración de quimioterapia utilizada y que el principal mecanismo de muerte celular es la apoptosis, debido a que la metilación producida por temozolomida sobre O6 -metilguanina es la más tóxica y la responsable de la ruptura doble de la cadena de ADN que induce este proceso y no el de necrosis, la cual solo se genera de forma marginal en ambos ensayos (He & Kaina,2019).

No obstante, el mecanismo de muerte celular inducido por la necrosis se puede llevar a cabo, debido a la posible respuesta inmunogénica de las células tumorales, ya que la necrosis generada en las células ocasiona que se generen alteraciones y ruptura en la membrana celular que libera una serie de DAMPs. Estas señales activan la respuesta inmunitaria, con activación de CPA que estimula toda la cascada inmunitaria antitumoral (Rückert et al., 2021).

Varios de los estudios mencionados anteriormente no coinciden con lo presentado en la Figura 1, sin embargo, Knizhnik y colaboradores, establecen que la apoptosis inducida por la temozolomida está precedida por la autofagia, el cual es un mecanismo generado por las mismas células tumorales para mantener la supervivencia e inhibir a la apoptosis durante las primeras 96 horas de aplicación (Knizhnik et al., 2013). Esto sugiere que este mecanismo de muerte celular se presenta de forma proporcional hasta después de este periodo. Cabe recordar, que la medición de la curva de letalidad se realizó aproximadamente a las 72 horas de la aplicación del tratamiento quimioterapéutico, lo cual pudo haber limitado el porcentaje de la apoptosis en nuestros resultados. Las discrepancias entre estudios evidencian la importancia de estudiar con mayor profundidad los mecanismos que inducen estos tipos de muerte celular programada.

Aun cuando se evidenció durante el experimento la disminución de la viabilidad de las células tumorales durante la exposición a la epirubicina, estudios señalan que su actividad antitumoral no es tan efectiva durante su aplicación como droga única, sino que la misma necesita ser aplicada en conjunto con otros agentes quimioterapéuticos debido a que su actividad es limitada (Cersosimo & Hong,1987). Además, es importante recordar que la epirubicina fue utilizada como control positivo por su fuerte asociación con los mecanismos de muerte celular inmunogénica en los microambientes tumorales. Esto debido a que los grupos quinolona de las antraciclinas logran producir la liberación de ROS que generan daños en el ADN. Por otro lado, incrementan la actividad del glutatión peroxidasa, lo que genera atracción de células inmunes (Guzmán,2018).

Otro de los factores importantes, es la secreción de citoquinas liberadas por las células tumorales ante el contacto con quimioterapias, las cuales son una red de proteínas pequeñas inducidas por factores de crecimiento, estímulos producidos por patógenos, por señales de daño celular o por otras citoquinas inflamatorias. Al ser liberadas, las citoquinas en general emiten una serie de señales que activan a los receptores acoplados a proteínas G. La activación de estos genera un aumento en la migración y el tráfico de células inmunitarias y hematopoyéticas, además, del equilibrio en la homeostasis de la respuesta inmune, con la adecuada estimulación de respuestas inflamatorias tanto para la devastación como de defensa ante diversas situaciones fisiopatológicas (Hughes & Nibbs,2018; Balkwill,2004).Estas funciones se muestran a continuación en la figura 13:

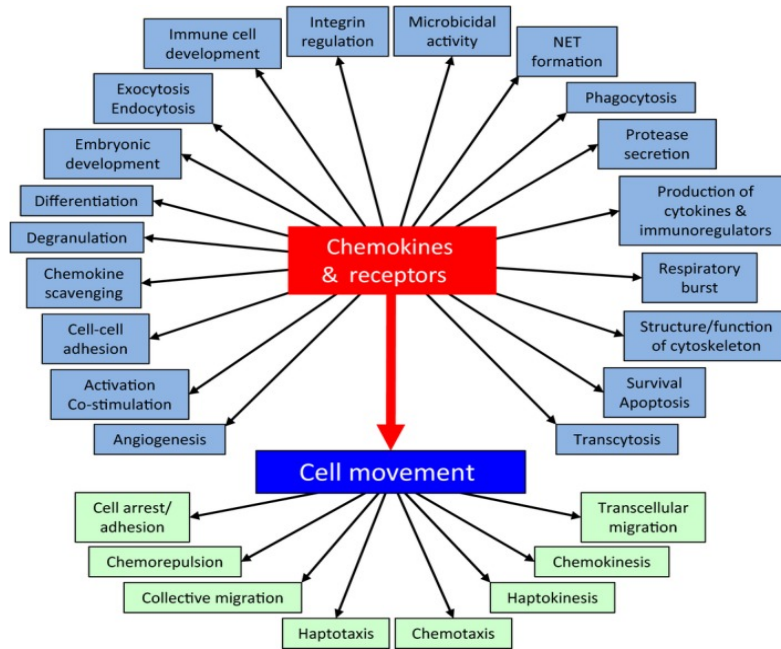


Figura 13. Conjunto de Funciones desarrolladas por las quimiocinas y sus receptores. Recuperada de Hughes & Nibbs, 2018.

Las citoquinas en el microambiente tumoral están expresadas en una variedad de células como células tumorales, inmunes y del estroma. Las citoquinas secretadas por células inmunes generarán una atracción hacia el sitio tumoral de células inmunitarias que regularán las respuestas inmunes tumorales. Por otro lado, las mismas pueden dirigirse directamente a las células tumorales y regular la proliferación, invasión, metástasis y la angiogénesis de las células cancerosas en el microambiente tumoral (Balkwill,2004 & Sciumé et al.,2010)

Existen diferentes tipos de citoquinas dependiendo de su actividad antitumoral o pro tumoral de acuerdo con sus funciones para evadir o suprimir los mecanismos precursores de las células tumorales o su forma de inhibir las respuestas inmunológicas para favorecer el crecimiento tumoral. En nuestro estudio se observó la inducción significativa en la expresión de citoquinas (Figura 12), en relación con el tiempo, dependiendo de la citoquina observada. Por ejemplo, la IL-6, que se ve inducida en nuestros resultados.

La IL-6 es una citoquina pro tumoral inflamatoria, caracterizada por contribuir con el crecimiento tumoral y generar mal pronóstico en el paciente (Kumari et al., 2016). Las fuentes principales donde se genera una expresión aumentada de esta citoquina son las células tumorales y las células estromales locales (macrófagos, fibroblastos y células supresoras derivadas de la línea mieloide). Esto favorece la transformación a células malignas por medio de la modulación de

actividades intrínsecas sobre células tumorales y extrínsecas por medio de la activación de células dentro del microambiente tumoral. Ambos procesos favorecen un entorno protumoral que produce un aumento en la angiogénesis y evasión inmune (Fisher,2014). Su asociación con las neoplasias se basa en que la misma se caracteriza por inhibir la apoptosis, generar la supervivencia y proliferación de las células malignas, contribuir en la angiogénesis, la invasión, la metástasis y el metabolismo de las células cancerosas (Kumari, et al.,2016). A partir de varios análisis murinos se ha logrado demostrar que los animales transgénicos que expresan deficiencia de la IL-6 dentro de un ambiente tumoral con presencia del gen *Src* no pueden desarrollar células cancerosas precursoras de glioblastoma multiforme (Weissenberger et al.,2004; Weissenberger, 1997).

Además, se ha visto que a partir de cambios epigenéticos a nivel de los microARNs Lin28 y Let-7, se genera el estímulo necesario para que las propias células tumorales elaboren de forma acelerada IL-6, ocasionando que la misma se logre producir a partir de vías autocrinas, sin necesidad de ser secretadas por otras vías paracrinas (Iliopoulos et al.,2009).

Nuestros resultados mostraron diferencias significativas en la expresión de IL-6 entre el control y todas las distintas condiciones experimentales, tanto a las 2 como a las 24 horas, con una mayor expresión a las 24 horas experimentales y mantiene una expresión relativamente constante durante el experimento. Esto es indicativo de que esta citoquina es inducida por parte de las células tumorales mediante su interacción con otras células tumorales, ya sean vivas o bajo los efectos de algún tratamiento. A pesar de que la mayor parte de la evidencia científica apunta a que la IL-6 es una citoquina protumoral, se ha visto en estudios recientes una relación de esta citoquina con mecanismos antitumorales ya que estimula la secreción de CT hacia el microambiente tumoral donde se activan y llevan a cabo funciones citotóxicas (Fisher et al.,2014).

La IP10 es una citoquina antitumoral caracterizada por la quimioatracción de linfocitos T activados y células asesinas naturales, además lleva a cabo funciones angioestáticas para la inhibición de la angiogénesis (Enderlin et al., 2009). Por otro lado, se ha visto que esta citoquina podría presentar un efecto divergente en la respuesta inmunitaria dependiendo de la relación de Cél Treg o de los linfocitos CD4+ y CD8+ que expresen CXCR3. Según el tipo de célula en la cual se exprese este receptor en mayor cantidad, así será su inclinación hacia la activación o supresión del sistema inmune (Lunardi et al., 2015). Por ejemplo, en un estudio murino de glioma, se observa el efecto antitumoral de la IP10 en presencia de linfocitos T citotóxicos, los cuales actúan de forma sinérgica en el crecimiento del glioma, inhibiendo la proliferación y angiogénesis de este, aumentando la supervivencia de los ratones (Wang et al., 2014).

Dufour en un estudio, logra demostrar, que la actividad antitumoral de esta citoquina es directamente proporcional a la expresión de IP10 dentro del microambiente tumoral y el sitio inflamatorio. En el momento que se suprime la expresión de esta interleucina en un modelo murino, se logra evidenciar que se desarrolla una proliferación deficiente de CT y de la secreción de INF- γ , logrando observarse un predominio protumoral al disminuir la respuesta de IP10 (Dufour,2002).

No obstante, desde el punto de vista de muerte celular inmunogénica, esta quimiocina se considera con importante actividad antitumoral y se ha establecido que su liberación por parte de células en proceso de muerte es un marcador importante de la inducción de este tipo de muerte. Un hallazgo importante en nuestros resultados es que en células bystander se da una reducción en su liberación al utilizar el medio condicionado de células estimuladas con el inductor de muerte celular inmunogénica epirubicina, lo que podría afectar la inducción de este proceso en esta línea celular.

La IL-8 fue primeramente caracterizada por ser quimioatrayente de células como neutrófilos, los cuales se desgranulan y liberan mediadores inflamatorios tales como leucotrienos B4 y activadores de plaquetas (Baggiolin et al., 1989). Actualmente se ha visto que la expresión de IL-8 se encuentra asociada a tumores, la cual mantiene el control del infiltrado de leucocitos en el tejido y la modificación de la respuesta tumoral (supervivencia, crecimiento celular y la angiogénesis). Sin embargo, se ha observado que su función varía en relación con el tipo de neoplasia en la cual se encuentre expresada (Yuan et al., 2005). Por ejemplo, Brat y colaboradores, mencionan la importante relación que tiene la quimiocina con su rol en la angiogénesis y la gliomagenesis en tumores sólidos de glioblastoma multiforme, por lo que destaca en su rol protumoral (Brat et al.,2005).

Esta citoquina se caracteriza por localizarse en mayor proporción en células que se encuentran en estado de hipoxia en zonas necróticas que rodean el tumor, lo que sugiere que la falta de oxígeno es un factor importante en la producción y secreción de esta quimiocina. Esto fue reforzado, en un estudio realizado por Bruyère y colaboradores, donde se determina que en modelos *in vitro* se presenta una elevada expresión de ARNm para IL-8, no obstante, a nivel de síntesis de proteína la misma se encuentra en concentraciones relativamente bajas (Bruyère et al.,2011). Tal evidencia, sugiere que la carencia de oxígeno en el microambiente tumoral es un factor importante en la formación de la IL-8. De esta forma, esta citoquina está relacionada a la inducción de la angiogénesis mediante la vía HIF-1 α y la expresión del VEGF (Palacios & Silva,2020). Además, se ha demostrado que su nivel de expresión presenta una relación directamente proporcional con el grado de malignidad en los tumores del glioma (Brat et al.,2005).

Un estudio realizado para analizar el efecto de la temozolomida en la expresión de diversas citoquinas demuestra que periodos cortos (5 días) con esta quimioterapia induce una disminución abrupta de la IL-8, lo que podría estar relacionado con nuestros resultados donde se observa una alta expresión de esta citoquina a las 2 horas del experimento seguida de una disminución a las 24 horas. Sin embargo, en otros estudios se ha visto que el tratamiento prolongado con este quimioterápico genera un aumento en la expresión de la misma, debido a la posible resistencia generada por el tumor cerebral y la disminución a la citotoxicidad inducida por este tratamiento (Bruyère et al.,2011).

Por su parte, la MCP-1 es una citoquina importante en la inflamación debido a su función de lograr la atracción y modulación de células inmunes tales como monocitos y basófilos, algo similar a lo que ocurre con los neutrófilos y la IL-8. En el caso de los basófilos, la función principal que logran llevar a cabo posterior a la atracción es la liberación moderada de sustancias como histamina y péptido leucotrieno, que son moléculas involucradas en respuestas locales (Baggiolini & Dahinden,1994; Dshmane et al.,2009).

El nivel de expresión de esta quimiocina presenta una gran heterogeneidad intratumoral, debido a que se encuentra fuertemente relacionada a la presencia de ciertos receptores en el microambiente tumoral. En los últimos años, se ha logrado determinar por medio de modelos de glioma humano, que la presencia dentro de las células cancerosas del factor de transcripción NF- κ B activo, logra aumentar el nivel de expresión de esta quimiocina y su efecto quimio atrayente (Yoshimura,2018). Adicionalmente, estudios realizados en modelos de glioma humano, determinaron que la expresión de otras citoquinas inflamatorias como IL-6, TNF- α , IL-1 β y IFN- γ logra aumentar la expresión de MCP-1 (Zhu et al.,1994). La presencia de MCP-1 en los tumores ha sido fuertemente asociada con su actividad antitumoral, sin embargo, existen evidencias, que enlazan a los macrófagos atraídos por esta citoquina con actividad pro tumoral. Esta actividad ha sido asociada con la polarización inducida de macrófagos asociados a tumores, los cuales promueven la invasión, metástasis, angiogénesis y la inhibición de la infiltración de células inmunitarias (Wang et al.,2022; Lewis & Pollard,2006).

En un estudio realizado mediante un modelo celular de glioblastoma se logró determinar que los macrófagos asociados a tumores (TAM) se activan y logran infiltrar el tumor debido a la secreción de oncometabolitos, los cuales determinan el fenotipo y la función de estas células en el microambiente tumoral. Además, se ha demostrado que este proceso es dependiente de una alta expresión de MCP-1 que atrae a macrófagos que expresan el receptor CCR2 (Takenaka et al.,2019).

Tanto para MCP-1 como IL-8, consideradas quimiocinas protumorales, se observó en nuestros resultados un aumento en su liberación a las 2 horas del estímulo con los respectivos medios condicionados, seguido de una disminución importante de sus niveles a las 24 horas. Esto puede deberse a que el medio condicionado se aplica solamente por dos horas y posteriormente es removido de las células. Es posible que, en presencia continua de los estímulos liberados sobre las células espectadoras, el aumento de la liberación de estas quimiocinas se dé de manera constante.

El G-CSF es caracterizado por ser inicialmente un inductor de granulocitos, el cual se encarga de regular la producción y maduración de granulocitos, macrófagos y células hematopoyéticas (Solaroglu et al.,2006). En segundo aspecto, se ha visto que el mismo se encuentra expresado en mayor proporción en tumores, ocasionando que se aumente el crecimiento tumoral y la invasión (Baba et al.,1995). No obstante, existen estudios donde se establece que las células tumorales de glioblastoma solo logran producir el G-CSF *in vitro*, debido a que *in vivo* no se encuentra expresado el receptor de G-CSF y con esto no logra ejercer ninguna función en el microambiente tumoral (Murata et al.,1993). No obstante, estudios recientes en tejidos *in vivo* de tumores de glioblastoma han logrado demostrar la expresión de G-CSF, tanto a nivel de ARN como de proteína, además determinan que con el progreso tumoral las células tumorales dejan de depender de la producción de factores por mecanismos de crecimiento del tejido y llevan a cabo la producción de sus propios factores (Mueller et al.,1999).

Wang y colaboradores, establecen a partir de análisis *in vitro*, que G-CSF se encuentra expresada en altas cantidades en muestras de líneas celulares de glioma humano, contrario a las muestras de pacientes sanos, donde el nivel de G-CSF es prácticamente nulo (Wang et al.,2012).

Las células mieloides tales como granulocitos y macrófagos son parte de las poblaciones celulares asociadas a un mal pronóstico en distintos tipos de tumores. Esto se debe a que inducen mecanismos inmunosupresores, metastásicos y proangiogénicos. El efecto que genera la liberación de G-CSF sobre estas células promueve su actividad en favor del crecimiento tumoral. En nuestros resultados, observamos un aumento de esta citoquina a las 24 horas por parte de las células bystander, excepto de aquellas que recibieron medio condicionado de células tratadas con epirubicina, que como se mencionó anteriormente es capaz de inducir una muerte celular inmunogénica, sugiriendo que la liberación de esta citoquina por parte de las células bystander puede afectar la generación de una respuesta inmune anti-tumoral.

La IL-38 es una citoquina antiinflamatoria miembro de la familia de la IL-1, caracterizada por cumplir un rol antiinflamatorio en el microambiente tumoral, debido a su semejanza estructural con el

antagonista del receptor de la IL-1(IL-1RN) y la IL-36 (IL-36RN) (Van de Veerdonk et al.,2012), los cuales se encuentran expresados en diferentes zonas como placenta, corazón y cerebro (Van de Veerdonk et al.,2018; Huang et al.,2018). La IL-36 se encuentra en mayor proporción en linfocitos CD4+ vírgenes y macrófagos, generando que al ser bloqueado el receptor por parte de la IL-38 se reduzca la liberación de citoquinas proinflamatorias, entre ellas la IL-17 y con esto se genere la disminución de la respuesta TH17 (Van de Veerdonk et al.,2012; Kinoshita et al.,2021). Uno de los sitios donde se expresa su receptor principal el IL1RAPL1 es el cerebro, lugar donde se encuentra localizado el glioblastoma multiforme, lo que sugiere su fuerte asociación con el efecto protumoral que se podría generar al inducir su expresión (Born et al.,2000).

Estudios recientes relacionan el efecto de la IL-38 en pacientes con cáncer colorrectal, donde se menciona que la disminución significativa de la interleucina en relación a los pacientes sanos genera un alza en la respuesta proinflamatoria que activa la respuesta inmune y el control tumoral (Huang et al.,2021). Similar a lo que sucede en pacientes con adenocarcinomas de pulmón, donde se establece que el aumento de la IL-38 favorece el progreso tumoral a grados superiores (Takada et al.,2017).

La medición de una citoquina antiinflamatoria ayuda a lograr entender la dinámica de la misma dentro del microambiente tumoral y su posible respuesta protumoral. sin embargo la discrepancia dentro de la expresión de la citoquina a las 2 y 24 horas del estudio como se observa en la Figura 11, pudo haber sido influenciada por el tiempo de estímulo de la monocapa con los medios condicionados, como lo explicado para MCP-1 y IL-8, ya que el mismo fue añadido durante las primeras 2 horas aproximadamente y posteriormente fue retirado de la monocapa celular. Sin embargo, este aumento de IL-38 se da principalmente y en mayor medida en respuesta al medio condicionado de células necróticas, sugiriendo que DAMPs específicos son requeridos para su liberación.

Los diferentes mecanismos de muerte celular inducen señales que generan o no un ambiente inflamatorio. La apoptosis es un mecanismo de muerte celular que se encarga de generar la homeostasis del sistema, eliminando lo no propio sin desencadenar un cuadro inflamatorio. Un hecho contrario sucede en la necrosis, debido a que la destrucción de la membrana celular libera una serie de DAMPs que generan una exacerbación del sistema inmune y su cuadro inflamatorio asociado (Gregory & Libra,2011). De esta manera, la expresión de la IL-38 se observaría en ambientes apoptóticos donde no existe un ambiente inflamatorio asociado. En este contexto, Mora y colaboradores, establecen que las células apoptóticas son las encargadas de liberar la IL-38 con el fin de lograr inhibir la respuesta inflamatoria ocasionada por los macrófagos en el tejido tumoral (Mora et al.,2016).

De manera experimental en el estudio realizado por Mora y colaboradores, se logró establecer el efecto del sobrenadante de células apoptóticas, necróticas y vivas, donde se determinó un predominio de la expresión de forma significativa de esta citoquina en las células apoptóticas en relación con las otras condiciones. Los autores sugieren que la célula apoptótica regula la liberación de citoquinas proinflamatorias al aumentar la expresión y producción de la IL-38 (Mora et al.,2016). Sin embargo, en nuestros resultados (Figura 11) las células necróticas inducen una mayor cantidad de expresión de esta citoquina en relación con las otras condiciones, no coincidiendo con lo observado en Mora et al.,2016. Hay que tomar en cuenta que un estudio se realizó en una línea celular de cáncer de pulmón y mama, mientras que nuestros resultados se refieren a una línea de GMF. Además, la IL-38 cuantificada por Mora y colaboradores se trataba de la citoquina liberada directamente por las células en proceso de muerte (Mora et al.,2016), en nuestro caso se trata de la liberación por parte de células viables estimuladas con el medio condicionado de células necróticas. Tomando lo anterior en consideración, esto sugiere que la IL-38 puede ser liberada directamente en algunos casos por células apoptóticas, y en otros por células viables al entrar en contacto con DAMPs específicos liberados por parte de células necróticas.

Las células cancerosas expresan en su superficie una serie de antígenos que son reconocidos por las células presentadoras de antígenos, las cuales se encargan de estimular y presentar a las CT con el fin de generar una activación del sistema inmune. Esta activación es truncada cuando hay señales co-inhedoras mediadas por los puntos de control inmunitario. Muchas de las nuevas modalidades terapéuticas van dirigidas a inhibir las señales co-inhedoras recibidas por los puntos de control inmunológico para aumentar la eficacia de los tratamientos quimioterapéuticos. Por esta razón, es importante entender la dinámica de expresión de estas moléculas.

Como se observa en la Figura 10, la expresión de los ligandos liberados por las células tumorales al ser inducidas o estimuladas con los diferentes medios condicionados descritos en la metodología, se observa un aumento de la expresión de ICOS-L y PD-L1 a las 2 horas, las cuales disminuyen significativamente a las 24. Este cambio en la expresión con relación al tiempo pudo deberse a una variable no contemplada durante el estudio, debido a que el medio condicionado fue añadido durante dos horas y posteriormente fue removido, ocasionando que el estímulo se viera interrumpido y no fuera de forma persistente hasta la medición de 24 horas.

Existen ligandos coestimuladores e inhibidores de CT y dependiendo del estímulo liberado así será la respuesta del sistema inmune. En el caso de PD-L1, este se encuentra ligado a producir una señal inhibitoria por parte de las células tumorales para estimular la apoptosis en CT. En la Figura 3

se observa que este ligando se encuentra aumentado de forma significativa en las células estimuladas con medio condicionado de células necróticas, sugiriendo que la muerte celular necrótica en GMF podría indirectamente promover la inmunosupresión observada en este tipo de tumores al inducir la expresión PD-L1 en células bystander.

Otro de los ligandos estudiados en este experimento fue HVEM, el cual es conocido como “interruptor molecular”, ya que su respuesta varía dependiendo del ligando o receptor al cual se une (Han et al., 2019). Como se observa en la Figura 10, no se observó diferencias significativas entre las distintas condiciones, ni en el periodo de 2 ni en el de 24 horas. Esto puede estar relacionado con que el glioblastoma es un tumor cerebral que desarrolla necrosis en el tejido cerebral de forma extensa en todo su espesor (Castañeda et al., 2015) y como se observa en el estudio de Han et al., 2019 la expresión de HVEM es mayor en zonas perinecroticas (Han et al., 2019). Por esta razón, no existe discrepancia significativa entre los medios utilizados ya que la necrosis producida por las células se genera de forma relevante en toda la línea celular.

La estimulación de los puntos de control inmune, como se mencionó anteriormente, es una forma de regular y mantener la homeostasis de la respuesta inmune, por esta razón además de medir la respuesta de los inhibidores, también se buscó determinar la funcionalidad de un coestimulador muy importante, ICOSL. El mismo, es el encargado de regular la respuesta por parte de células efectoras CD4+ con el fin de producir un aumento de las células CD8+ (Terabe & Gilbert, 2020). No obstante, no es la única de sus funciones, debido a que también se ha mostrado un efecto sobre las Cel Treg, generando cierta respuesta inmunosupresora (Wang et al., 2022).

Schreiner y colaboradores realizaron un análisis en diferentes líneas celulares de glioma, determinando que existe una gran probabilidad de su presencia en diversas células tumorales y su importante estímulo hacia una respuesta TH1 y TH2 (Schreiner et al., 2003). Por otro lado, se ha visto que la actividad de ICOS mantiene una predisposición positiva y su expresión varía en relación con diferentes características propias de cada paciente. Dentro de estas destacan las patológicas, clínicas y su grado de malignidad, y proponen una relación directa con su porcentaje de expresión en linfocitos T reguladores (Wang et al., 2022). Además, se ha determinado que en los gliomas la expresión de ICOS-ICOSL genera una actividad prooncogénica aumentada e inmunosupresión que ocasiona una elevada ayuda en el desarrollo tumoral (Wang et al., 2022). A pesar de que ICOSL es un ligando activador, promueve la activación principalmente de Cel Treg para que estas puedan ejercer su efecto inmunoregulatorio.

Por medio de análisis proteómicos se ha logrado determinar el papel inmunosupresor de ICOS en el microambiente tumoral, debido a que el mismo favorece la amplificación de múltiples promotores oncogénicos como GFR, CDK4 y MDM4 y en la inhibición de genes supresores tumorales por medio de la delección de PTEN y CDKN2A (Chen et al., 2021). Además, se ha visto que existe un porcentaje de Cel. Treg positivas para ICOS, las cuales al estimularse generan una tolerancia inmunológica y con esto la inmunosupresión respectiva. Wang et al., 2022 logró demostrar que la expresión de ICOS genera un aumento significativo de Cel. Treg en vez de CD4+ y CD8+. Su fuerte asociación con otros puntos de control inmunológico como PD-L1 favorece su expresión e interacción, con lo que se potencia su efecto y ocasionan una mayor respuesta protumoral. Así mismo, se ha visto que las Cel. Treg que se encuentran en el microambiente tumoral logran co-expresar en mayor proporción ambos receptores en conjunto (Wang et al., 2022).

La relación sinérgica entre estos 2 puntos de control inmunológico se confirma en un estudio realizado con anticuerpos monoclonales contra PD-L1 e ICOS, donde al potenciar el efecto inhibitorio de estas dos moléculas se genera una alteración en su impacto inmunosupresor de la respuesta inmune (Beyrend et al., 2019).

Algo importante de resaltar en los resultados obtenidos y que se observa en la Figura 7, es el poco impacto generado por la temozolomida en el estímulo de la expresión de los puntos de control inmune, tanto en los estimuladores de las CT como en sus inhibidores. Esto coincide con lo reportado en Schatz y colaboradores, donde se observa que la temozolomida no genera ningún impacto significativo sobre los puntos de control inmunológicos de PD-L1 ni HVEM, produciendo un impacto positivo, ya que al no darse el aumento de expresión, los mismos no contribuirían con la inmunosupresión del microambiente tumoral (Schatz et al., 2022).

La expresión de los puntos de control inmune y las citoquinas liberadas por las células tumorales puede ser generada por el efecto bystander inducido por la quimioterapia en el microambiente tumoral. El efecto de cercanía ocasiona un daño de forma indirecta en las células que se encuentran próxima a las que fueron atacadas por la quimioterapia. Este evento origina el estímulo de linfocitos y macrófagos que liberan tanto IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α y TGF- β (Shao et al., 2003; Kröncke et al., 2004).

En nuestros resultados se observa que al añadir el medio condicionado (quimioterapia y células necróticas) sobre la monocapa celular, se produce un estímulo que induce un aumento en la expresión de citoquinas y puntos de control inmune con respecto al control. De esto se puede deducir que las

células afectadas por la quimioterapia o las células necróticas estimulan la producción de citoquinas, quimiocinas, y la expresión de puntos de control inmune por parte de las células vecinas. En el presente trabajo se puede integrar cómo los diferentes medios condicionados inducen la producción y/o expresión de citoquinas o puntos de control inmune que pueden promover el contexto antiinflamatorio del microambiente tumoral, impidiendo el establecimiento de una respuesta inmune efectiva. La identificación de las vías de evasión inmune que presentan los distintos tipos de tumores es esencial para el desarrollo de nuevos blancos o estrategias terapéuticas. La importancia de los factores liberados por células en proceso de muerte sobre las células tumorales vecinas no había sido considerada como un evento importante a nivel del escape inmunológico por los tumores, por lo que es de suma importancia este tipo de trabajos para caracterizar los mecanismos y los factores involucrados en estos procesos.

Capítulo V. Conclusiones

Considerando los resultados obtenidos en el presente proyecto, se puede concluir que el tratamiento con temozolomida induce un efecto citotóxico sobre la línea celular SF-295 de glioblastoma multiforme, de manera dosis dependiente, requiriendo sin embargo dosis altas para reducir al menos un 50% de la viabilidad celular.

Con respecto al perfil inmunológico generado por las células bystander, en respuesta a la estimulación con los factores liberados por células en proceso de muerte se puede concluir que posterior a la muerte celular necrótica, así como la inducida por temozolomida las células bystander liberan principalmente una alta cantidad de citoquinas protumorales tales como IL-6, IL-8, G-CSF, MCP-1 e IL-38 lo que podría contribuir al crecimiento, metástasis y angiogénesis tumoral.

Se logró determinar que gran cantidad de las citoquinas estudiadas a fondo en esta investigación, no tienen una función clara establecida en modelos de glioblastoma, sin embargo, se ha visto que, dependiendo de las condiciones, el contexto y el microambiente tumoral, pueden contribuir de forma anti o pro tumoral, con un predominio de respuestas que favorezcan al tumor.

Además, se puede concluir que posterior a la muerte celular necrótica, la cual se presenta en gran magnitud en glioblastoma multiforme, se induce un aumento en la expresión de los puntos de control inmune PD-L1 e ICOSL en las células vecinas de manera temprana, lo que podría favorecer el proceso inmunoregulator que se presenta en este tipo de cáncer.

Las investigaciones *in vitro* de líneas celulares de glioblastoma aún se encuentran muy desactualizadas, por esta razón, se debe seguir en búsqueda de nuevas rutas de investigación que ayuden a esclarecer los verdaderos mecanismos protumorales desarrollados por estas líneas celulares y tener establecidas las bases fundamentales de este tipo de fenómenos para trasladar estos hallazgos a modelos de mayor complejidad biológica.

Referencias bibliográficas

- Alvarán, L., Gomez, L., Aguirre, D., y Ortiz., D. (2007). Caracterización neuropsicológica de pacientes con glioma del Instituto de Cancerología de Medellín. *Acta Neurol Colombiana*, 23(2), 1-11. https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/21068/3/AlvaranLiliana_2008_CaracterizacionNeuropsicologica.pdf
- Álvarez, C.,Díaz,O.,Lanio,M.,León,L.,Llorente,F.,Soto,C.(2021). Molecular mechanisms underlying Immunogenic Cell Death: Overview on damage-associated molecular patterns and the stress of the endoplasmic reticulum. *Biotechnología Aplicada*,38(3), 3101-3108. <https://www.medigraphic.com/pdfs/biotecapl/ba-2021/ba213a.pdf> .
- American Brain tumor Association. (2012). *Glioblastoma y astrocitoma maligno*. <https://www.abta.org/wp-content/uploads/2018/03/glioblastoma-y-astrocitoma-maligno.pdf>
- Austin, E.; Villaseca,C. (1998). La terapia génica y sus aplicaciones. *Revista médica de Chile*, 126(7), 838-845. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98871998000700013>
- Baba, M., Hasegawa, H., Nakayabu, M., Shimizu, N., Suzuki, S., Kamada, N., y Tani, K. (1995). Establishment and characteristics of a gastric cancer cell line (HuGC-OOHIRA) producing high levels of G-CSF, GM-CSF, and IL-6: the presence of autocrine growth control by G-CSF. *American journal of hematology*, 49(3), 207–215. <https://doi.org/10.1002/ajh.2830490306>
- Baggiolini, M., Walz, A., y Kunkel, S. L. (1989). Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *The Journal of clinical investigation*, 84(4), 1045–1049. <https://doi.org/10.1172/JCI114265>
- Baggiolini, M., y Dahinden, C. A. (1994). CC chemokines in allergic inflammation. *Immunology today*, 15(3), 127–133. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90156-2](https://doi.org/10.1016/0167-5699(94)90156-2)
- Balkwill F. (2004). Cancer and the chemokine network. *Nature reviews. Cancer*, 4(7), 540–550. <https://doi.org/10.1038/nrc1388>
- Beyrend, G., Van der Gracht, E., Yilmaz, A., Van Duikeren, S., Camps, M., Höllt, T., Vilanova, A., van Unen, V., Koning, F., de Miranda, N., Arens, R., Ossendorp, F. (2019). PD-L1 blockade engages tumor-infiltrating lymphocytes to co-express targetable activating and inhibitory receptors. *Journal for immunotherapy of cancer*, 7(1), 217. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0700-3>
- Born,T., Smith,D., Garka K.,Renshaw,B.,Bertles,J.,Sims,J. (2000). Identification and characterization of two members of a novel class of the interleukin-1 receptor (IL-1R) family. Delineation of a new class of IL-1R-related proteins based on signaling. *J. Biol. Chem.* 275(52), 29946–29954. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11134060/>

- Brat, D., Bellail, A., Van Meir, E. (2005). The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-oncology*, 7(2), 122–133. <https://doi.org/10.1215/S1152851704001061>
- Bruyère, C., Mijatovic, T., Lonez, C., Spiegl-Kreinecker, S., Berger, W., Kast, R., Ruyschaert, J., Kiss, R., Lefranc, F. (2011). Temozolomide-induced modification of the CXC chemokine network in experimental gliomas. *International journal of oncology*, 38(5), 1453–1464. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.964>
- Cai, J., Hu, Y., Ye, Z., Ye, L., Gao, L., Wang, Y., Sun, Q., Tong, S., Yang, J., Chen, Q. (2022). Immunogenic cell death-related risk signature predicts prognosis and characterizes the tumour microenvironment in lower-grade glioma. *Frontiers in immunology*, 13, 1011757. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1011757>
- Caldolfi, M. (2014). Terapia génica citotóxica para el tratamiento del cáncer cerebral. *Sciencedirect*, 6(4), 217-224. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1853002814000585>
- Campillo, A., Corona, A., Mellado, R., Díaz, E., Rodríguez Weber, F. (2021). Inhibidores de puntos de control inmunitario en estadios avanzados de melanoma. *Acta médica Grupo Ángeles*, 19(1), 108-115. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-72032021000100108&lng=es&tlng=es.
- Cárdenas, A., Bocchieri, P., Méndez, C., Zolezzi, J., Ríos, J. (2022). La inhibición de los puntos de control inmunológico, una terapia en evolución: remembranza del Premio Nobel de Medicina 2018. *Revista médica de Chile*, 150(1), 93-99. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872022000100093>.
- Carneiro, B., El-Deiry, W. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 17:395–417. <https://www.nature.com/articles/s41571-020-0341-y>
- Castañeda, C., Casavilca, S., Orrego, E., García, P., Deza, P., Heinike, H., Castillo, M., Belmar, C., y Ojeda, Luis. (2015). Glioblastoma: Análisis molecular y sus implicancias clínicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32(2), 316-325. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342015000200017&lng=es&tlng=es.
- Castellone, M., Teramoto, H., Williams, B., Druey, K., Gutkind, J. (2005). Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5753), 1504–1510. <https://doi.org/10.1126/science.1116221>

- Cersosimo, R., Yand Hong, W. (1987). Epirubicin: a review of the pharmacology, clinical activity and adverse effects of an adriamycin analogue. *J Clin Oncol.* 4:425–439. 1986. <https://doi.org/10.1200/JCO.1986.4.3.425>
- Chen, R., Wang, X., Dai, Z., Wang, Z., Wu, W., Hu, Z., Zhang, X., Liu, Z., Zhang, H., y Cheng, Q. (2021). TNFSF13 Is a Novel Onco-Inflammatory Marker and Correlates With Immune Infiltration in Gliomas. *Frontiers in immunology*, 12, 713757. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34712225/>
- Chiaravalli, M., Spring, A., Agostini, A., Piro, G., Carbone, C., y Tortora, G. (2022). Immunogenic Cell Death: An Emerging Target in Gastrointestinal Cancers. *Cells*, 11(19), 3033. <https://doi.org/10.3390/cells11193033>
- Chu,E. (2019). Cáncer de quimioterapia. Katzung B.G.(Ed.), *Farmacología básica y clínica*, 14e. McGraw
- Demidem, A., Morvan, D.,Madelmont, J. C. (2006). Bystander effects are induced by CENU treatment and associated with altered protein secretory activity of treated tumor cells: a relay for chemotherapy?. *International journal of cancer*, 119(5), 992–1004. <https://doi.org/10.1002/ijc.21761>
- Deshmane, S., Kremlev, S., Amini, S., Sawaya,B. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 29(6), 313–326. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>
- Dufour,J., Dziejman,M.,Liu,M.,Leung,J.,Lane,T.,Lustre,A. (2002). Los ratones deficientes en proteína 10 inducible por IFN- γ (IP-10; CXCL10) revelan un papel para IP-10 en la generación y el tráfico de células T efectoras. *J Immunol*, 168 (7): 3195–3204. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.7.3195>
- Enderlin, M., Kleinmann, E., Struyf, S., Buracchi, C., Vecchi, A., Kinscherf, R., Kiessling, F., Paschek, S., Sozzani, S., Rommelaere, J., Cornelis,J., Van Damme, J.,Dinsart, C. (2009). TNF-alpha and the IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10/CXCL-10) delivered by parvoviral vectors act in synergy to induce antitumor effects in mouse glioblastoma. *Cancer gene therapy*, 16(2), 149–160. <https://doi.org/10.1038/cgt.2008.62>
- Esquivel, M., Vargas, E., Alonso, J., Fernández, J., Jiménez, R., y Cabezas, C. (2012). Características epidemiológicas de la población adulta con diagnóstico de gliomas atendida en los Hospitales Metropolitanos de San José, Costa Rica durante los años 2010-2012. *Neuroeje* 25(1), 39-46. <https://www.binasss.sa.cr/revistas/neuroeje/v25n1/art7.pdf>

- Fan, C., Liu, W., Wen, C., Cao, H., Wen, C., Chen, L., Jiang, G. (2013). O⁶-methylguanine DNA methyltransferase as a promising target for the treatment of temozolomide-resistant gliomas. *Cell Death and Disease*, 4, 1-8. <https://www.nature.com/articles/cddis2013388>
- Fisher, D., Appenheimer, M., Evans, S. (2014). The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. *Seminars in immunology*, 26(1), 38-47. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.01.008>
- Fuchs, Y., Steller, H. (2015). Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 16(6), 329-344. <https://doi.org/10.1038/nrm3999>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S., Abrams, J., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A., Arama, E., Baehrecke, E., Barlev, N., Bazan, N., Bernassola, F., Bertrand, M., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell death and differentiation*, 25(3), 486-541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- González, F., Castro, C., Castro, O., Olaya, N., Penagos, P., Zubieta, C., Melo, G. (2014). Glioblastoma multiforme: actualidad en marcadores biomoleculares como factores de pronóstico a propósito de una serie de casos con sobrevida mayor a 2 años en el Instituto Nacional de Cancerología. INC- Colombia. *Acta Neurológica Colombiana*, 30(4), 282-289. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-87482014000400008&lng=en&tlng=es.
- Gregory, C., Pound, J. (2011). Cell death in the neighbourhood: direct microenvironmental effects of apoptosis in normal and neoplastic tissues. *The journal of pathology*. 223, 177-94. <https://pathsocjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/path.2792>
- Güerci, A., Córdoba, E. (2015). Nuevo enfoque de los efectos biológicos de las radiaciones ionizantes. *Revista argentina de radiología*, 79(4), 224-225. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-99922015000400010&lng=es&tlng=es
- Guzmán, O. (2018). ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR EL IMMUNEPOTENT CRP® EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA Y SU EFECTO EN COMBINACIÓN CON CICLOFOSFAMIDA O EPIRUBICINA. [Tesis de maestría, Universidad autónoma de Nueva León]. <http://eprints.uanl.mx/16418/1/1080291138.pdf>
- Hall, E. (2003). The bystander effect. *Health Phys*, 85, 31-35. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12852468/>

- Han, M., Wang, S., Zhao, W., Ni, S., Yang, N., Kong, Y., Huang, B., Chen, A., Li, X., Wang, J., y Wang, D. (2019). Immune checkpoint molecule herpes virus entry mediator is overexpressed and associated with poor prognosis in human glioblastoma. *EBioMedicine*, 43, 159–170. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.002>
- Hanif, F., Muzaffar, K., Perveen, K., Malhi, S. M., Simjee,U. (2017). Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pacific journal of cancer prevention: Asiático Pac J Cáncer Prev*, 18(1), 3–9. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.1.3>
- He, Y., Kaina, B. (2019). Are There Thresholds in Glioblastoma Cell Death Responses Triggered by Temozolomide?. *International journal of molecular sciences*, 20(7), 1562. <https://doi.org/10.3390/ijms20071562>
- Hernández, F., Martínez, V., Rey, J. (2007). Biología molecular de los glioblastomas. *Neurocirugía*, 18(5), 373-382. [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-14732007000500001&lng=es&tlng=es.](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-14732007000500001&lng=es&tlng=es)
- Himes, B., Geiger, P., Ayasoufi, K., Bhargav, A., Brown, D., Parney, I. (2021). Immunosuppression in Glioblastoma: Current Understanding and Therapeutic Implications. *Frontiers in oncology*, 11, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.770561>
- Huang, A., Xu,W. (2018). Role of Interleukin-38 in Chronic Inflammatory Diseases: A Comprehensive Review. *Frontiers in immunology*, 9, 1-6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01462>
- Huang, Q., Li, F., Liu, X., Li, W., Shi, W., Liu, F., O'Sullivan, B., He, Z., Peng, Y., Tan, A., Zhou, L., Shen, J., Han, G., Wang, X., Thorburn, J., Thorburn, A., Jimeno, A., Raben, D., Bedford, J., Li, C. (2011). Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nature medicine*, 17(7), 860–866. <https://doi.org/10.1038/nm.2385>
- Huang, C., Zhu, H., Yao, Y., Bian, Z., Zheng, Y., Li, L., Moutsopoulos, H., Gershwin,M., Lian,Z. (2019). Immune checkpoint molecules. Possible future therapeutic implications in autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity*,104, 102333. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.102333>
- Huang, H., Zhang, D., Zhao, H., Hu, y Z., Lu. (2021). Interleukin-38 Suppresses Cell Migration and Proliferation and Promotes Apoptosis of Colorectal Cancer Cell Through Negatively Regulating Extracellular Signal-Regulated Kinases Signaling. *J. Interferon*

Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res., 41, 375-384.
<https://doi.org/10.1089/jir.2021.0047>

- Hughes, C., Nibbs, R. (2018). A guide to chemokines and their receptors. *The FEBS journal*, 285(16), 2944–2971. <https://doi.org/10.1111/febs.14466>
- Iliopoulos, D., Hirsch, H., Struhl, K. (2009). An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell*, 139(4), 693–706. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.014>
- Jiménez, M., Curiel, Á., Nogales, P., Perales, J., Schuhmacher, A., Galán, M., Zhu, L., Lowe, S., Al-Shahrour, F., Squatrito, M. (2021). Dianhydrogalactitol Overcomes Multiple Temozolomide Resistance Mechanisms in Glioblastoma. *Molecular cancer therapeutics*, 20(6), 1029–1038. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-20-0319>
- Khazaei, M., Pazhouhi, M. (2017). Temozolomide-Mediated Apoptotic Death Is Improved by Thymoquinone in U87MG Cell Line. *Cancer investigation*, 35(4), 225–236. <https://doi.org/10.1080/07357907.2017.1289383>
- Kepp, O., Tesniere, A., Schlemmer, F., Michaud, M., Senovilla, L., Zitvogel, L., Kroemer, G. (2009). Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 14(4), 364–375. <https://doi.org/10.1007/s10495-008-0303-9>
- Kinoshita, F., Tagawa, T., Akamine, T., Takada, K., Yamada, Y., Oku, Y., Kosai, K., Ono, Y., Tanaka, K., Wakasu, S., Oba, T., Osoegawa, A., Shimokawa, M., Oda, Y., Hoshino, T., Mori, M. (2021). Interleukin-38 promotes tumor growth through regulation of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in lung cancer tumor microenvironment. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 70(1), 123–135. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02659-9>
- Knizhnik, A., Roos, P., Nikolova, T., Quiros, S., Tomaszowski, H., Christmann, M., Kaina, B. (2013). Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. *PloS one*, 8(1), 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055665>
- Kohsaka, S., Takahashi, K., Wang, L., Tanino, M., Kimura, T., Nishihara, H., Tanaka, S. (2012). Inhibition of GSH synthesis potentiates temozolomide-induced bystander effect in glioblastoma. *Cancer Letters*, 331(1), 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.12.005>
- Kröncke, K., Suschek, C., Kolb, V. (2000). Implicaciones de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible y la actividad enzimática. *Antioxidantes y Señalización Redox*, 2(3), 585-605. <http://doi.org/10.1089/15230860050192341>

- Koren, E., Fuchs, Y. (2021). Modos de muerte celular regulada en el cáncer. *Descubrimiento del cáncer*, 11, 245–65. <https://aacrjournals.org/cancerdiscovery/article/11/2/245/2820/Modes-of-Regulated-Cell-Death-in-CancerModes-of>
- Kumari, N., Dwarakanath, B., Das, A., Bhatt, A. (2016). Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(9), 11553–11572. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5098-7>
- León, J., Pareja, A. (2019). Inmunología del cáncer II: bases moleculares y celulares de la carcinogénesis. *Horizonte Médico (Lima)*, 19(2), 84-92. <https://dx.doi.org/10.24265/horizmed.2019.v19n2.11>
- Lewis, C., Pollard, J. W. (2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer research*, 66(2), 605–612. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4005>.
- Lezak, M. (2004). *Neuropsychological Assessment*. (4 ed.). New York: Oxford University Press
- Lunardi, S., Lim, S., Muschel, R., Brunner, T. (2015). IP-10/CXCL10 attracts regulatory T cells: Implication for pancreatic cancer. *Oncoimmunology*, 4(9), 1-3. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1027473>
- Madrigal de León, M. (2020). Evaluación de la terapia con temozolomida, panobinostat y extracto de *Lophophora williamsii* en la inducción de muerte inmunogénica en un modelo murino de glioma. [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Nueva León], <http://eprints.uanl.mx/20189/1/1080313985.pdf>
- Moghadam, A., da Silva Rosa, S., Samiei, E., Alizadeh, J., Field, J., Kawalec, P., Thliveris, J., Akbari, M., Ghavami, S., Gordon, J. (2018). Autophagy modulates temozolomide-induced cell death in alveolar Rhabdomyosarcoma cells. *Cell Death Discov*, 4(52), 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0115-9>
- Montes, M. (2017). ICOS y su ligando ICOS-L en la homeostasis y fisiología de las células NK. [Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Madrid]. <https://repositorio.uam.es/handle/10486/682647>
- Mora, J., Schlemmer, A., Wittig, I., Richter, F., Putyrski, M., Frank, A., Han, Y., Jung, M., Ernst, A., Weigert, A., Brune, B. (2016). Interleukin-38 is released from apoptotic cells to limit inflammatory macrophage responses. *J Mol Cell Biol*, 8(5), 426–38. [10.1093/jmcb/mjw006](https://doi.org/10.1093/jmcb/mjw006)

- Mueller, M., Herold, C., Riede, D., Lange, M., Steiner, H., Fusenig, N. (1999). Autocrine growth regulation by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human gliomas with tumor progression. *The American journal of pathology*, 155(5), 1557–1567. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65472-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65472-7)
- Murata, J., Sawamura, Y., Tada, M., Sakuma, S., Sudo, M., Aida, T., Abe, H. (1993). Human glioblastoma cells produce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in vitro, but not in vivo, without expressing its receptor. *Neurologia médico-chirurgica*, 33(9), 603–609. <https://doi.org/10.2176/nmc.33.603>
- Ortiz, B., Jimenez, M., Correa, L. (2021). Caracterización molecular del glioblastoma multiforme de un paciente con larga supervivencia. *Acta Neurológica Colombiana*, 37(1), 27-32. <https://doi.org/10.22379/24224022359>
- Palacios, L., Silva, C. (2020) Gliomas de Alto Grado del Adulto: Biología Molecular (Parte I). *Rev. Oncol*, 30(3):249-279. <https://doi.org/10.33821/494>
- Pardoll, D. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 12(4), 252–264. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>
- Paulos, C., June, C. (2010). Poner freno a BTLA en la inmunoterapia contra el cáncer mediada por células T. *Diario de investigación clínica*, 120(1), 76-80. <https://www.jci.org/articles/view/41811>
- Pavlyukov, M., Yu, H., Bastola, S., Minata, M., Shender, V., Lee, Y., Zhang, S., Wang, J., Komarova, S., Wang, J., Yamaguchi, S., Alsheikh, H., Shi, J., Chen, D., Mohyeldin, A., Kim, S., Shin, Y., Anufrieva, K., Evtushenko, E., Antipova, N., ... y Nakano, I. (2018). Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Malignancy of Glioblastoma Via Intercellular Transfer of Splicing Factors. *Cancer cell*, 34(1), 119–135. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.05.012>
- Pouratian, N., Schiff, D. (2010). Management of Low-Grade Glioma. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 10(3) 224-231. <https://doi.org/10.1007/s11910-010-0105-7>
- Qureshi, S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E., Baker, J., Jeffery, L., Kaur, S., Briggs, Z., Hou, T., Futter, C., Anderson, G., Walker, L., Sansom, D. (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6029), 600–603. <https://doi.org/10.1126/science.1202947>
- Ramsay, A. (2013). Immune checkpoint blockade immunotherapy to activate anti-tumour T-cell immunity. *British journal of hematology*, 162 (3), 313-325. <https://doi.org/10.1111/bjh.12380>

- Reyes, J., González, B., Rodríguez, C., Navarrete, C., Salazar, A., Villagra, A., Caglevic, C., Hepp, M. (2020). Actualización general de inmunoterapia en cáncer. *Revista médica de Chile*, 148(7), 970-982. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872020000700970>
- Rodríguez, R., Lombardo, K., Roldán, G., Silvera, J., Lagomarsino, R. (2012). Glioblastoma multiforme cerebral hemisférico: análisis de sobrevida de 65 casos tratados en el Departamento de Oncología del Hospital de Clínicas, desde 1980 a 2000. *Revista Médica del Uruguay*, 28(4), 250-261. http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-03902012000400003&lng=es&tlng=es.
- Rückert, M., Flohr, S., Hecht M., Gaipl, U. (2021). Radiotherapy and the immune system: More than just immune suppression, *Stem Cells*, Volume 39, 1155–1165, <https://doi.org/10.1002/stem.3391>
- Salazar, M., Ortega, L., Ortiz, J., Esquivel, M., Vindas, R., Montero, Patricia. (2016). Calidad de vida en pacientes costarricenses con tumores cerebrales: aportes de la neuropsicología. *Actualidades en Psicología*, 30 (121), 49-66. <https://dx.doi.org/10.15517/ap.v30i121.24417>
- Schatz, J., Ladinig, A., Fietkau, R., Putz, F., Gaipl, U., Frey, B., Derer, A. (2022). Normofractionated irradiation and not temozolomide modulates the immunogenic and oncogenic phenotype of human glioblastoma cell lines. *Strahlentherapie und Onkologie*. <https://doi.org/10.1007/s00066-022-02028-8>
- Schreiner, B., Wischhusen, J., Mitsdoerffer, M., Schneider, D., Bornemann, A., Melms, A., Tolosa, E., Weller, M., y Wiendl, H. (2003). Expression of the B7-related molecule ICOSL by human glioma cells in vitro and in vivo. *Glia*, 44(3), 296–301. <https://doi.org/10.1002/glia.10291>
- Sciumè, G., Santoni, A., Bernardini, G. (2010). Chemokines and glioma: invasion and more. *Journal of neuroimmunology*, 224(1-2), 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.05.019>
- Shao, C., Estuardo, V., Folkard, M., Michael, B., Premio, K. (2023). Señalización mediada por óxido nítrico en la respuesta del espectador de células de glioma dirigidas individualmente. *Cancer Research*, 63(23), 8437–8442. <https://aacrjournals.org/cancerres/article/63/23/8437/510867/Nitric-Oxide-Mediated-Signaling-in-the-Bystander>
- Shen, W., Hu, J., Zheng, J. (2014). Mechanism of temozolomide-induced antitumour effects on glioma cells. *Journal of International Medical Research*, 42(1), 164-172. [Doi 10.1177/0300060513501753](https://doi.org/10.1177/0300060513501753)

- Solaroglu, I., Cahill, J., Jadhav, V., Zhang, J. (2006). A novel neuroprotectant granulocyte-colony stimulating factor. *Stroke*, 37(4), 1123–1128. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000208205.26253.96>
- Soni, V., Adhikari, M., Simonyan, H., Lin, L., Sherman, J., Young, C., Keidar, M. (2021). In Vitro and In Vivo Enhancement of Temozolomide Effect in Human Glioblastoma by Non-Invasive Application of Cold Atmospheric Plasma. *Cancers*, 13(17), 4485. <https://doi.org/10.3390/cancers13174485>
- Takada, K., Okamoto, T., Tominaga, M., Teraishi, K., Akamine, T., Takamori, S., Katsura, M., Toyokawa, G., Shoji, F., Okamoto, M., Oda, Y., Hoshino, T., Maehara, Y. (2017) Clinical implications of the novel cytokine IL-38 expressed in lung adenocarcinoma: Possible association with PD-L1 expression. *PLOS ONE*, 12(7), 1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181598>
- Takenaka, M., Gabriely, G., Rothhammer, V., Mascanfroni, I., Wheeler, M., Chao, C., Gutiérrez, C., Kenison, J., Tjon, E., Barroso, A., Vandeventer, T., de Lima, K., Rothweiler, S., Mayo, L., Ghannam, S., Zandee, S., Healy, L., Sherr, D., Farez, M., ... y Quintana, F. J. (2019). Control of tumor-associated macrophages and T cells in glioblastoma via AHR and CD39. *Nature Neuroscience*, 22(5), 729-740. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0370-y>
- Terabe, M., Gilbert, M. (2020). Another layer of immune complication in glioblastoma: ICOS-ICOSL. *Neuro-Oncology*, 22(3), 305-306. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa001>
- Torres, M., Murcia, K., Cruz, C., Infante, A. (2022). Inmunopatología del Glioblastoma Multiforme y su importancia en el ámbito clínico. *Revistas Ciencias biomédicas*, 11(2), 163-178. <https://revistas.unicartagena.edu.co/index.php/cbiomedicas/article/view/3738/3201>
- Urbańska, K., Sokołowska, J., Szmidt, M., Sysa, P. (2014). Glioblastoma multiforme - an overview. *Contemporary oncology (Poznan, Poland)*, 18(5), 307–312. <https://doi.org/10.5114/wo.2014.40559>
- Valenzuela, R. (2017). NUEVAS TERAPIAS EN EL MANEJO DE LOS GLIOMAS DE ALTO GRADO. *Revista médica clínica las condes*, 28(3), 401-408. [10.1016/j.rmclc.2017.03.001](https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2017.03.001)
- Van de Veerdonk, F., de Graaf, D., Joosten, L., Dinarello, C. (2018). Biology of IL-38 and its role in disease. *Immunological reviews*, 281(1), 191–196. <https://doi.org/10.1111/imr.12612>
- Van de Veerdonk, F., Stoekman, A., Wu, G., Boeckermann, A., Azam, T., Netea, M., Joosten, L., van der Meer, J., Hao, R., Kalabokis, V., Dinarello, C. (2012). IL-38 binds to the IL-36 receptor and has biological effects on immune cells similar to IL-36 receptor

- antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8), 3001–3005. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121534109>
- Vargas,S. (2016). Etiología y epidemiología del cáncer en Costa Rica. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 73(618), 33-36. <https://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/618/art06.pdf>
- Vaux, D. L., Cory, S., & Adams, J. M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335(6189), 440–442. <https://doi.org/10.1038/335440a0>
- Vera,R., Sucre, C., Salazar, H., Martinez, B., Vivas, L. (2021). Manejo de pacientes con tumores de células germinales en primera recaída. *Revista Colombiana de Cancerología*, 25(2), 79-92. <https://doi.org/10.35509/01239015.113>
- Wakabayashi, K., Kambe, F., Cao, X., Murakami, R., Mitsuyama, H., Nagaya, T., Saito, K., Yoshida, J., Seo, H. (2004). Inhibitory effects of cyclosporin A on calcium mobilization-dependent interleukin-8 expression and invasive potential of human glioblastoma U251MG cells. *Oncogene*, 23(41), 6924–6932. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207778>
- Wang,J.,Yao,L.,Zhao,S.,Zhang,X.,Yin,J.,Zhang,Y.,Chen.,X.,Gao,M.,Ling,E.,Hao,A.,Li,G. (2012).Granulocyte-colony stimulating factor promotes proliferation, migration and invasion in glioma cells. *Cancer Biology & Therapy*,13(6),389-400. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22313638/>
- Wang, L., Lan, J., Tang, J., Luo, N. (2022). MCP-1 targeting: Shutting off an engine for tumor development. *Oncology letters*, 23(1), 1-9. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.13144>
- Wang, J., Shi, F.,Shan, A. (2022). Transcriptome profile and clinical characterization of ICOS expression in gliomas. *Frontiers in oncology*, 12,01-19. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.946967>
- Wang, X., Zhang, F. C., Zhao, H. Y., Lu, X. L., Sun, Y., Xiong, Z. Y., Jiang, X. B. (2014). Human IP10-scFv and DC-induced CTL synergistically inhibit the growth of glioma in a xenograft model. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(8), 7781–7791. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1867-3>
- Wang, X., Zhao, Z., Chen, M., Yuan, Q., Li, Y., y Jiang, C. (2015). Epirubicin inhibits growth and alters the malignant phenotype of the U-87 glioma cell line. *Molecular Medicine Reports*, 12, 5917-5923. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4220>
- Weissenberger, J., Loeffler, S., Kappeler, A., Kopf, M., Lukes, A., Afanasieva, T. A., Aguzzi, A., & Weis, J. (2004). IL-6 is required for glioma development in a mouse model. *Oncogene*, 23(19), 3308–3316. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207455>

- Weissenberger, J., Steinbach, J., Malin, G., Spada, S., Rüllicke, T., Aguzzi, A. (1997). Development and malignant progression of astrocytomas in GFAP-v-src transgenic mice. *Oncogene*, 14(17), 2005–2013. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201168>
- Wesolowski, R., Rajdev, P., Mukherji, S. (2010). Temozolomide (Temodar). *American journal of neuroradiology*, 31(8), 1383–1384. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A2170>
- Yago, K. (2018). “Estudio del papel de HVEM y su interacción con BTLA y CD160 en la progresión del linfoma de células B. [Tesis de doctorado, Universidad De León]. <https://www.readcube.com/articles/10.18002%2F10612%2F9575>
- Yoshimura, T. (2018). La quimiocina MCP-1 (CCL2) en la interacción del huésped con el cáncer: ¿un enemigo o un aliado?. *Cell Mol Immunol* 15 , 335–345. <https://doi.org.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/10.1038/cmi.2017.135>
- Yuan, A., Chen, J., Yao, P., Yang, P. (2005). The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 10, 853–865. <https://doi.org/10.2741/1579>
- Yung, W., Albright, R., Olson, J., Fredericks, R., Fink, K., Prados, M., Brada, M., Spence, A., Hohl, R., Shapiro, W., Glantz, M., Greenberg, H., Selker, R., Vick, N., Rampling, R., Friedman, H., Phillips, P., Bruner, J., Yue, N., Osoba, D., ... y Levin, V. A. (2000). A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *British journal of cancer*, 83(5), 588–593. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1316>
- Zhu, J., Valente, A., Lorenzo, J., Carnes, D., Graves, D. (1994). Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human osteoblastic cells stimulated by proinflammatory mediators. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 9(7), 1123–1130. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650090721>