

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Identificación de genes asociados a cáncer modulados para la
señalización de IFN-gamma en células de glioblastoma**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN CIENCIAS GENÓMICAS**

PRESENTA:

ERIKA PÉREZ BARCO

DIRECTORA:

Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz

**POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS**

Ciudad de México, agosto de 2023.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS ©

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

**Universidad Autónoma de la Ciudad de México
Plantel Del Valle**

Integración de Jurado

Presidente: Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Secretario: Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Vocal: Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

DIRECTORA:

Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Agradecimientos académicos:

A la H. Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), por permitirme forma parte de su conocimiento y formación académica, por su continua búsqueda y lucha por formar profesionales competentes y con ética que puedan contribuir al desarrollo de este país. En especial agradezco a todos los profesores que contribuyeron a finalizar mi carrera. En específico a la **Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz**, por su paciencia y por compartir su conocimiento como directora de esta tesis, la cual se llevó a cabo en el cubículo A-38 del área de Ciencias Genómicas del Plantel del Valle y en el laboratorio 224N del Instituto de Fisiología Celular (IFC) en la H. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Esta tesis fue apoyada por los Proyectos de Investigación del Colegio de Ciencia y Tecnología (CCyT) de la UACM con el número de folio **CCYT-2022-08**. Se agradece la colaboración de la **Dra. Marina Macías Silva**, apoyando con el espacio físico e infraestructura en el IFC-UNAM para el desarrollo experimental de este proyecto.

Se reconoce y agradece el apoyo y asesoría durante los seminarios para corregir y mejorar la realización de esta investigación, y recomendaciones técnicas otorgada por:

Dr. Josué O. Ramírez Jarquín (Instituto de Fisiología Celular-UNAM)

Dra. Bibiana Ortega Domínguez (Instituto de Fisiología Celular-UNAM)

Biol. Marcela Sosa Garrocho (Instituto de Fisiología Celular-UNAM)

Se reconocen y agradecen las observaciones y sugerencias para esta tesis, realizadas por los sinodales:

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez (UACM)

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga (UACM)

Agradecimientos personales

Gracias a la vida y a Dios por permitirme formar parte de este universo y poder cumplir con mis metas e ilusiones y a mi tía Lionides porque gracias a ellas soy lo que tengo, por su apoyo incondicional que me has ofrecido en los momentos más difíciles de mi existencia. ¡Te quiero mucho !

A mi madre por haberme otorgado la vida, y pese a que tenemos diferencias siempre estaremos unidas en las buenas y malas. A mi hermano Carlos, por apoyarme en las decisiones que tomo y saber que tengo el cariño y amor de un hermano.

A la Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz por compartirme su comprensión y conocimiento, ya que sin ello no hubiera logrado titularme. Gracias por el aprendizaje y confianza que me proporcionó.

A mis sinodales por su supervisión y buenos consejos durante este proceso de titulación, puesto que cada una de sus observaciones fueron fundamentales para que esta tesis fuera una realidad, gracias.

A Lucero y Sayra, por orientarme en mi tesis. Gracias Lidia y Lorena por su cariño y comprensión y por seguir fomentando nuestra amistad. Gracias a todas las personas que han estado en los senderos de mi vida, porque han aportado un grano de arena para formar a la persona que soy.

A Rodrigo, por su amor, paciencia y comprensión, durante este largo camino que hemos pasado juntos.

Índice

Agradecimientos académicos:	1
Agradecimientos personales.....	2
Índice.....	3
Resumen	7
1. Introducción.....	8
1.1 El sistema nervioso y las células que lo conforman	8
1.2 Tumores malignos desarrollados en el cerebro.....	10
1.3 Glioblastoma.....	13
1.4 Generalidades de los interferones	16
1.5 La vía de señalización canónica del IFN- γ	19
2. Antecedentes	21
2.1 La vía de señalización del IFN- γ en cáncer.	21
2.1.2 La vía de señalización del IFN- γ y su actividad antitumoral.....	22
2.1.3 La vía de señalización del IFN- γ y su actividad protumoral.....	23
2.2 La vías de señalización del IFN- γ y sus efectos anti-tumorigénicos en el glioblastoma.	27
2.3 La vías de señalización del IFN- γ y sus efectos pro-tumorigénicos en glioblastoma.	28
2.4 Planteamiento del problema	30
3. Hipótesis.....	30
4. Justificación	30
5. Objetivos	31
5.1 Objetivo general	31
5.2 Objetivos particulares	31
6. Estrategia experimental	32
7. Metodología.....	33
7.1 Línea celular	33
7.2 Inmunofluorescencia.....	33
7.3 Extracción de RNA y microarreglo de cDNA.....	34
7.4 Análisis in silico	34
8. Resultados	36

8.1	Análisis de la activación de p-STAT1 en respuesta al IFN- γ en células derivadas de glioblastoma.....	36
8.2	Identificación de genes regulados por la señalización del IFN- γ en células derivadas de glioblastoma.....	37
8.3	Análisis <i>in silico</i> de la relevancia funcional de los genes modulados por IFN- γ en glioblastoma.....	41
8.3.1	Análisis de los genes modulados por IFN- γ en glioblastoma por GeneCards.....	41
8.3.2	Análisis de los genes modulados por IFN- γ en glioblastoma por Panther.	45
8.3.3	Análisis de los genes modulados por IFN- γ en glioblastoma por ShinyGO	49
9.	Discusión.....	61
10.	Conclusiones.....	66
11.	Perspectivas.....	66
12.	Referencias	67
13.	Anexos.....	73

Índice de tablas

Tabla I.	Genes reprimidos por IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172	38
Tabla II.	Genes sobreexpresados por IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172...	39

Índice de Figuras

Figura 1. Astrocito del área del hipocampo en una rata macho de 4 semana de edad.	9
Figura 2. Imagen multifotónica de microglía (verde) y vasos sanguíneos cerebrales (rojo) en ratones transgénicos.....	9
Figura 3. Micrografía confocal de Astrocitos (verde) y oligodendrocitos (rojo) derivados de células madre neurales en cultivo de rata.....	10
Figura 4. Las células de Schwann, cuyos núcleos se muestran en azul, se adhieren a las fibras nerviosas.. ..	10
Figura 5. Hallmarks del cáncer.....	11
Figura 6. Tomografía computarizada de glioblastoma con contraste post-gadolinio.	15
Figura 7. Vías de señalización del IFN tipo I, II y III.....	18
Figura 8. Vía de señalización canónica del IFN- γ	20
Figura 9. Efectos duales de IFN γ en la inmunidad del cáncer.	21
Figura 10. El IFN- γ influye en todas las etapas de la inmunoedición tumoral.....	23
Figura 11. Escape inmunológico a través de IDO y PD-L1	25
Figura 12. Elementos de la vía de señalización del IFN- γ están desregulados en glioblastoma.....	29
Figura 13. La proteína p-STAT1 se acumula en el núcleo celular en respuesta al estímulo del IFN- γ	36
Figura 14. Análisis ontológico de los genes reprimidos por IFN- γ en células de glioblastoma A-172.. ..	43
Figura 15. Análisis ontológico de los genes sobreexpresados por IFN- γ en células de glioblastoma A-172.....	44
Figura 16. Análisis de ontología génica usando la base de datos <i>Go Panther</i>	46
Figura 17. Análisis de ontología génica usando la base de datos <i>Go Panther</i>	48
Figura 18. Análisis de enriquecimiento de los los DEG por IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172, obtenidos por el programa de ShinyGO.	50
Figura 19. Interactomas de los DEG por IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172, usando el programa de ShinyGO.....	52
Figura 20. Análisis de la distribución de genes en el genoma, utilizando el programa de ShinyGO.....	54
Figura 21. Vías de señalización KEGG, asociados al receptor de interacción citocina-citocina y a cáncer, utilizando el programa de ShinyGO	56
Figura 22. Vías de señalización KEGG, asociados al ciclo celular y a la desregulación transcripcional en cáncer, usando el programa de ShinyGO	53
Figura 23. Vías de señalización KEGG asociados a la senescencia celular y a la proteoglicanos en cáncer, usando el programa de ShinyGO.	60

Abreviaturas

APC	Células Presentadoras de Antígeno
CIITA	Proteína Transactivadora de Clase II
CTL	Linfocitos T Citotóxicos
DC	Célula Dendrítica
GAF	Factores Activados por Gamma
GAS	Sitio Activado por Interferón Gamma
IDH	Isocitrato Deshidrogenasa
IDO	Indoleamina 2,3-Dioxigenasa
IFN	Interferón
IFN- γ	Interferón Gamma
IFNGR1	Receptor-1 de Interferón gamma
IFNGR2	Receptor-2 de Interferón gamma
IL	Interleucina
INOS	Sintetasa Inducible de Óxido Nítrico
IRF	Factor Regulador del Interferón
ISG	Genes Estimulados por Interferón;
ISG15	Gen 15 Estimulado por Interferón
ISGF3	Factor 3 del Gen Estimulado por IFN
ISRE	Elemento de Respuesta Estimulado por Interferón
JAK	Cinasa Janus
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
NF	Factor Nuclear
NK	Células Asesinas Naturales.
OMS	Organización Mundial de la Salud
PD-L1	Ligando de Muerte Celular Programada 1
PKC	Proteína Cinasa C
SOCS	Supresor de la Señalización de Citocinas
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
TA	Antígeno tumoral
TCR	Receptor de Células T
TFBS	Sitios de Unión del Factor de Transcripción
TNF	Factor de Necrosis Tumoral.

Resumen

El interferón gamma (IFN- γ) es una citocina que tiene propiedades antivirales, antitumorales e inmunomoduladoras. El IFN- γ se une con su receptor transmembranal, el cual tiene dos subunidades IFNGR1 y dos subunidades IFNGR2, y en sus dominios intracelulares se unen las tirosinas cinasas JAK1 y JAK2. Una vez que el IFN- γ se une a su receptor induce la transfosforilación de las proteínas JAK1 y JAK2, las cuales al ser activadas fosforilan al receptor de IFN- γ , y promueven la unión de las proteínas STAT1 para ser fosforiladas por las proteínas JAK. Las STAT1 fosforiladas forman homodímeros que se translocan al núcleo para modular la expresión de genes diana del IFN- γ , tales como el ligando de muerte celular programada 1 (CD274/PD-L1) y la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO). Sin embargo, poco se ha investigado sobre la expresión de genes modulados por IFN- γ en tumores del sistema nervioso central, como el glioblastoma, que es un tumor maligno, invasivo y con un tiempo de supervivencia de 15 meses después de su diagnóstico. En este trabajo, para identificar los genes modulados por IFN- γ en células derivadas de glioblastoma, se utilizó la línea celular A-172 y se analizó la activación de p-STAT1 en respuesta al IFN- γ en células derivadas de glioblastoma, por ensayos de inmunofluorescencia. Además, por medio de un microarreglo de cDNA se identificaron genes regulados por la señalización del IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172. Por último, se analizó *in silico* en los programas de GeneCards, Panther y ShinyGO, la relevancia funcional de los genes modulados por IFN- γ en glioblastoma. Los resultados obtenidos mostraron que 29 genes fueron modulados negativamente y 63 genes fueron sobreexpresados por el IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172. Dada la ontología de los genes modulados por la señalización del IFN- γ , los datos sugieren que el IFN- γ podría tener una actividad dual, es decir promoviendo o inhibiendo el desarrollo tumoral. En glioblastoma, la señalización del IFN- γ es principalmente pro-tumorigénica, pero la predilección por sus acciones pro- o anti-tumorigénicas podría estar relacionada con la comunicación con otras vías moleculares activadas por diversos factores en el contexto del glioblastoma.

1. Introducción

1.1 El sistema nervioso y las células que lo conforman

El sistema nervioso es una red de neuronas y células gliales que en conjunto cumplen una función sensorial, integradora y motora. El sistema nervioso se divide en dos partes principales: el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP). El SNC es el centro de regulación de todo el tejido nervioso, está formado por el encéfalo y la médula espinal, de los cuales salen prolongaciones nerviosas que se conectan con receptores, músculos y glándulas constituyendo el SNP, el cual se divide en somático y autónomo. El sistema nervioso autónomo se divide en simpático y parasimpático. Tanto en el SNC como en el SNP durante el desarrollo embrionario se forman las neuronas y las células no neuronales conocidas como células gliales. Las células gliales mejor caracterizadas del SNC son los astrocitos, los oligodendrocitos, la microglía y las células endoteliales. Las células gliales del SNP incluyen a las células de Schwann y a las células satélite (Gaudet y Fonken, 2018).

Los astrocitos de origen ectodérmico representan del 20 al 40% de las células gliales del SNC. El nombre de astrocitos se refiere a su forma de estrella cuando son observados en preparaciones histológicas. Los astrocitos producen, administran y eliminan al glutamato en las neuronas, amortiguan el potasio extracelular y responden a la actividad neuromoduladora. Los astrocitos son necesarios para la formación y el mantenimiento de las sinapsis durante el desarrollo y la edad adulta, y participan en conjunto con la microglía para mantener la respuesta inmune local en el SNC. Además, los astrocitos controlan la barrera hematoencefálica y son fundamentales para el mantenimiento del metabolismo neuronal, aportando lactato a las neuronas y adaptando el flujo sanguíneo cerebral y la concentración extracelular de agua e iones a los cambios en la actividad neuronal (Figura 1).

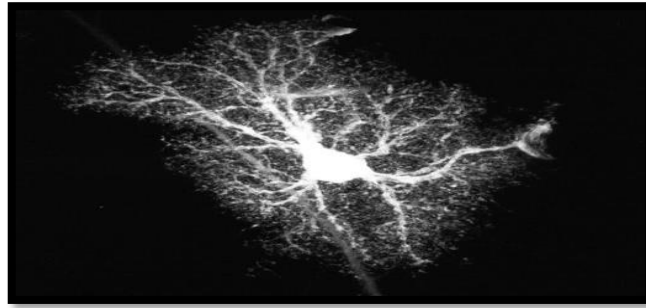


Figura 1. Astrocito del área del hipocampo en una rata macho de 4 semana de edad. Los astrocitos proporcionan soporte estructural a la neuronas. (<http://www.cellimagelibrary.org/images/48001>).

La microglía de origen mesodérmico constituye del 5 al 15 %, y representa a las células inmunitarias del SNC, eliminando microbios, células muertas, sinapsis, agregados de proteínas y otros antígenos solubles que pueden poner en peligro al SNC. La microglía produce factores tróficos que favorecen la supervivencia de las neuronas y el crecimiento de los axones durante el desarrollo. La microglía también ayuda a la supervivencia y a la mielinización de precursores de oligodendrocitos. Finalmente, la microglía dirige las células endoteliales para aumentar la complejidad vascular cerebral (Figura 2).

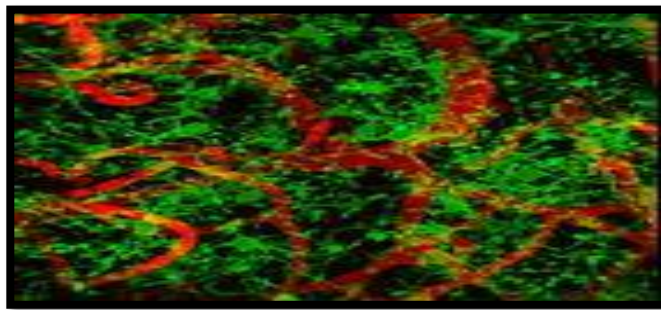


Figura 2. Imagen multifotónica de microglía (verde) y vasos sanguíneos cerebrales (rojo) en ratones transgénicos. La microglía son células gliales y son los macrófagos residentes (<http://www.cellimagelibrary.org/images/42603>).

Los oligodendrocitos constituyen el 25% de las células gliales, que aíslan y producen mielina a los axones. Los oligodendrocitos producen y suministran lactato a los axones. Además, proporcionan soporte trófico, regulando su desarrollo, mantenimiento, reparación y plasticidad a los axones. Las células ependimales del SNC, tapizan los ventrículos encefálicos y el canal central de la médula espinal,

contribuyendo a la producción, circulación y control del líquido cefalorraquídeo (Figura 3) (Chowen y Garcia-Segura, 2021; Dietz *et al.*, 2020; Gaudet y Fonken, 2018; Xu *et al.*, 2020).

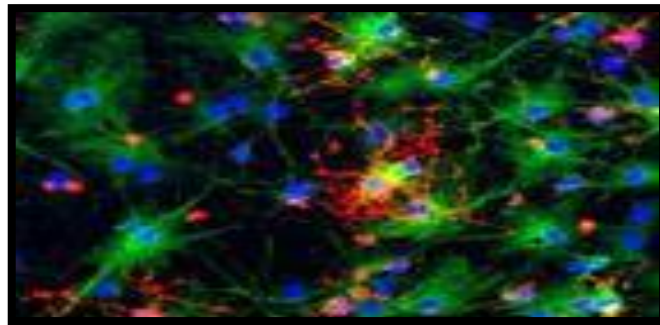


Figura 3. Micrografía confocal de Astrocitos (verde) y oligodendrocitos (rojo) derivados de células madre neurales en cultivo de rata. Ambas células son importantes para el correcto funcionamiento cerebral (<http://www.cellimagelibrary.org/images/38907>).

Las células de Schwann en el SNP ejercen la función de los oligodendrocitos en el SNC, mielinizando axones periféricos y participando en el mantenimiento y regeneración de los nervios periféricos. Las células satélites del SNP tiene como función la de regular los niveles de oxígeno y dióxido de carbono, nutrientes y neurotransmisores alrededor de las neuronas ganglionares (Figura 4) (Xu *et al.*, 2020).

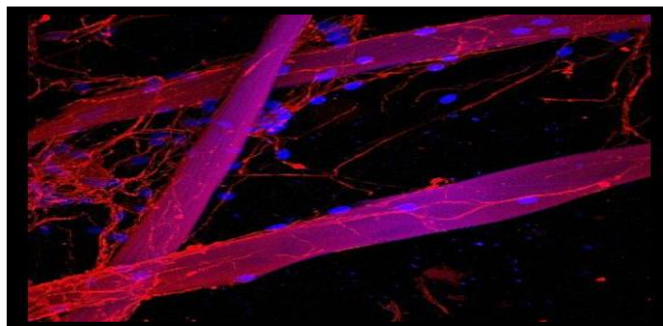


Figura 4. Las células de Schwann, cuyos núcleos se muestran en azul, se adhieren a las fibras nerviosas. Las células de Schwann producen mielina para los axones periféricos. (<http://cellimagelibrary.org/images/38921>).

1.2 Tumores malignos desarrollados en el cerebro

En el año 2000, Bob Weinberg y Douglas Hanahan proponen seis marcas distintivas del cáncer mejor conocidas como *hallmarks* o sellos del cáncer que son un conjunto de características que adquiere una célula cancerosa, las cuales son: la señalización proliferativa sostenida, evadir a los supresores del crecimiento, resistencia a la muerte

celular o apoptosis, permitir la inmortalidad replicativa, inducción a la vasculatura o angiogenesis, activar la invasión y la metástasis. Para el año 2011 se introducen más sellos distintivos emergentes los cuales son: la reprogramación del metabolismo celular, la evasión y destrucción del sistema inmune, la inflamación crónica y la inestabilidad genética y la mutación. En una nueva revisión por estos autores en 2022, incorporan nuevos sellos que involucran: "desbloquear la plasticidad fenotípica", "reprogramación epigenética no mutacional", "microbiomas polimórficos" y "células senescentes" (Figura 5) (Senga y Grose, 2021; Hanahan, 2022; Hanahan y Weinberg, 2011).

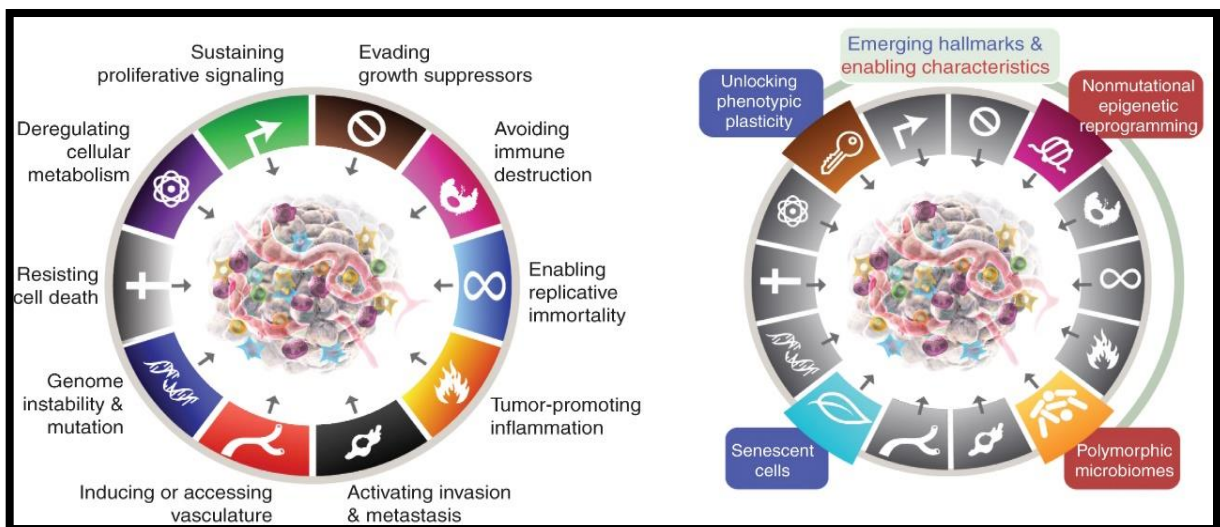


Figura 5. Hallmarks del cáncer. Son características distintivas que va adquiriendo una célula maligna (Hanahan, 2022).

En el SNC, se desarrollan neuropatologías como los tumores cerebrales. Las neoplasias cerebrales se dividen en malignas y benignas, ambas se desarrollan en tejido sano, pero las segundas pueden disecarse o retirarse mediante cirugía. En tanto, las malignas son altamente invasivas y crecen muy rápido. Los tumores cerebrales ocupan el lugar 19 entre todas las neoplasias, y el décimo entre las más letales. A nivel mundial, cada año se diagnostican cerca de 300 mil nuevos casos de tumores cerebrales. Los más comunes a nivel mundial son los meningiomas y la mayoría no son malignos. En segundo lugar, están los de la glándula pituitaria y en tercer lugar son los glioblastomas, que son malignos y letales (Gonzalez, 2020).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en la quinta edición del 2021, reclasificó a los tumores del SNC, adoptando un nuevo enfoque para clasificarlos como: gliomas, tumores glioneuronales y tumores neuronales, y además dividirlos en 6 familias diferentes (Louis *et al.*, 2021):

1. Los gliomas difusos de tipo adulto que incluye: Astrocitoma, IDH-mutante; Oligodendroglioma, IDH-mutante y 1p/19q-codeleciónado; y Glioblastoma, IDH de tipo silvestre.
2. Los gliomas difusos de bajo grado de tipo pediátrico que comprende: astrocitoma difuso; MYB- o MYBL1-alterado; glioma angiocéntrico; Tumor neuroepitelial polimorfo de grado bajo de los jóvenes (a menudo abreviado como PLNTY).
3. Los gliomas difusos de alto grado de tipo pediátrico que comprenden a: glioma difuso de línea media, H3 K27-alterado; Glioma hemisférico difuso, H3 G34-mutante; Glioma difuso de alto grado de tipo pediátrico, H3-wildtype e IDH-wildtype; y glioma hemisférico de tipo infantil.
4. Los gliomas astrocíticos circunscritos que comprenden a: Astrocitoma pilocítico; Astrocitoma de alto grado con características piloides; Xantastrocitoma pleomórfico; Astrocitoma subependimario de células gigantes; Glioma coroideo; Astroblastoma, MN1 -alterado.
5. Los tumores glioneuronales y neuronales que comprenden a: Ganglioglioma; Ganglioglioma infantil desmoplásico / astrocitoma infantil desmoplásico; Tumor neuroepitelial disembrionárico; Tumor glioneuronal difuso con características similares a oligodendroglioma y grupos nucleares (DGONC tipo provisional); Tumor glioneuronal mixoide; Tumor neuronal multinodular y vacuolizante; Tumor glioneuronal papilar; Tumor glioneuronal formador de rosetas; Tumor glioneuronal leptomeníngeo difuso; Gangliocitoma; Gangliocitoma cerebeloso displásico (enfermedad de Lhermitte-Duclos); neurocitoma central; neurocitoma extraventricular; Liponeurocitoma cerebeloso.
6. Los tumores ependimarios que comprenden a: Ependimoma supratentorial; Ependimoma supratentorial fusión ZFTA positiva; Ependimoma supratentorial fusión YAP1 positiva; Ependimoma de fosa posterior; Ependimoma de fosa posterior

grupo PFA; Ependimoma de fosa posterior, grupo PFB; Ependimoma espinal; Ependimoma espinal MYCN -amplificado; Ependimoma mixopapilar; subependimoma.

1.3 Glioblastoma

El glioblastoma es el tumor cerebral maligno más común y agresivo en adultos, tiene su origen en células gliales, de las cuales las más comunes son los astrocitos y los oligodendrocitos. El glioblastoma, se caracteriza por la expresión de la isocitrato deshidrogenasa (IDH) de tipo silvestre y pertenece a la familia de los gliomas difusos de tipo adulto del SNC, según la clasificación de la OMS del 2021 (Louis *et al.*, 2021). El glioblastoma tiene una incidencia anual de 5.26 por 100,000 habitantes. Según las estadísticas, cada año se diagnostican ~77,000 casos nuevos de pacientes con glioblastoma en los Estados Unidos y Europa. Los glioblastomas ocurren casi exclusivamente en el cerebro, pero también pueden aparecer en el tronco encefálico, el cerebelo y la médula espinal. El 61% de todos los gliomas primarios ocurren en los cuatro lóbulos del cerebro: frontal (25%), temporal (20%), parietal (13%) y occipital (3%). Los glioblastomas se presentan frecuentemente en una edad promedio de 64 años, pero pueden ocurrir a cualquier edad, incluida la niñez. La incidencia es ligeramente mayor en hombres que en mujeres (1.6:1) y preferentemente en caucásicos en relación con otras etnias (Davis, 2016; Soomro *et al.*, 2017).

Los glioblastomas pueden clasificarse como primarios o de novo, que surgen sin un precursor conocido, siendo más comunes en los ancianos; o secundarios donde un astrocitoma difuso o un astrocitoma anaplásico se transforman con el tiempo en glioblastoma, los cuales son más comunes en jóvenes (Davis, 2016). En el Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA), Verhaak *et al.* dividieron a los glioblastomas en cuatro subtipos según las alteraciones genómicas y las firmas de expresión génica. Estos son los subtipos proneural, neural, clásico y mesenquimatoso, en los cuales la expresión de ciertos genes se ve alterada (Soomro, *et al* 2017).

La mayoría de los glioblastomas primarios y secundarios tienen alteraciones en tres vías: la vía de la proteína tumoral p53, la vía de señalización del receptor tirosina cinasa/Ras/fosfoinositido 3-cinasa (PI3K) y la vía del retinoblastoma RB (supresor tumoral), lo que da lugar a una proliferación celular descontrolada y a una mayor supervivencia celular, al tiempo que permite que la célula tumoral escape de los puntos de control del ciclo celular, la senescencia y las vías de apoptosis. Además, se han encontrado alteraciones genéticas en los glioblastomas primarios como son: mutaciones en el cromosoma 10q, amplificación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), delección del inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 2 A/B (CDKN2A/B) y mutaciones en el homólogo de fosfato y tensina (PTEN). En el glioblastoma secundario, se pueden observar mutaciones de TP53 y mutaciones de isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1) (Davis, 2016; Soomro, *et al.*, 2017).

Los síntomas que puede presentar un paciente con glioblastoma pueden variar mucho según el tamaño y la localización del tumor en el cerebro afectado. Sin embargo, la mayoría de los pacientes suelen presentar síntomas como un aumento de la presión intracraneal, cefalea, cambios de personalidad y convulsiones. Para el diagnóstico del glioblastoma se realiza una tomografía computarizada (TC) o una exploración por imágenes de resonancia magnética (IRM); estas técnicas muestran una masa de forma irregular con un anillo denso de realce y necrosis (Figura 6). La necrosis es una característica distintiva del glioblastoma, y se requiere la presencia de necrosis para que un tumor cerebral sea de grado 4. De acuerdo con el sistema de clasificación de tumores del SNC de la OMS del 2021, el glioblastoma IDH de tipo silvestre debe diagnosticarse con la presencia de 1 o más de 3 características genéticas: mutación del promotor de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT), amplificación del gen EGFR, ganancia combinada del cromosoma 7 completo y la pérdida de todo el cromosoma 10 (Louis *et al.*, 2021).

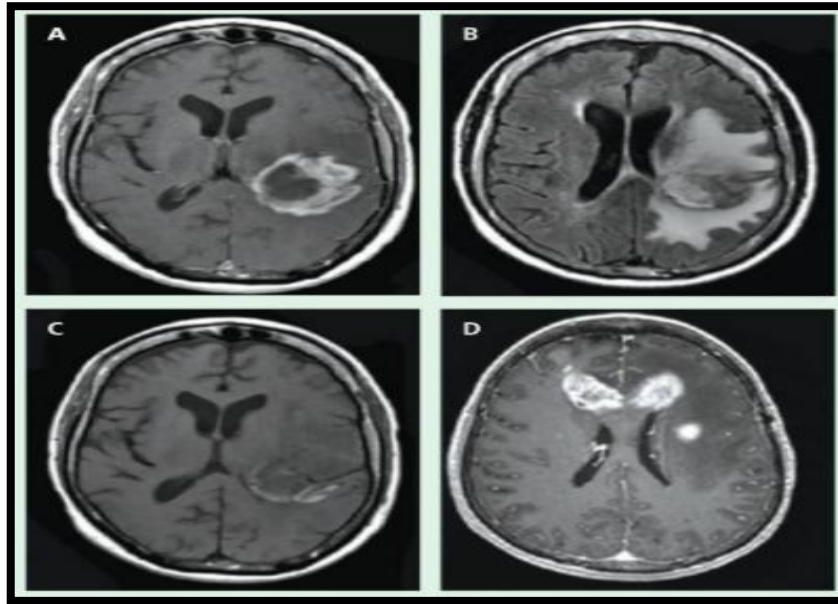


Figura 6. Tomografía computarizada de glioblastoma con contraste post-gadolinio. A) tumor de glioblastoma con un anillo denso; B) tumor de glioblastoma con edema vasogénico causando efectos en el ventrículo lateral; C) tumor de glioblastoma con hemorragia al margen lateral del tumor; D) enfermedad multifocal de ambos hemisferios (Davis, 2016).

El tratamiento para el glioblastoma suele iniciarse con una resección quirúrgica, el paciente suele esperar hasta cuatro semanas para que cicatrice la herida de la craneotomía y poder iniciar la radioterapia junto con la quimioterapia con temozolomida (Jacob *et al.*, 2020). La temozolomida inhibe la síntesis del DNA, para no generar células nuevas. Este fármaco genera un metabolito activo capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, formada por neuronas y astrocitos, que controlan el paso de sustancias tóxicas entre la circulación sanguínea y el fluido cerebral. A pesar del tratamiento, el pronóstico para los pacientes con glioblastoma sigue siendo malo, con una mediana de supervivencia de 12 a 15 meses (Davis, 2016).

La supervivencia tan baja de los pacientes con glioblastoma ha llevado a la necesidad de explorar otras vías moleculares para encontrar biomarcadores o moléculas blanco para terapia. Por lo tanto, en este trabajo, abordamos la investigación de la expresión de genes estimulados por la vía del interferón gamma (IFN- γ).

1.4 Generalidades de los interferones

Los interferones (IFN) se describieron por primera vez en 1957 por Isaac y Lindenmann, como moléculas que interfieren con la replicación viral. Los interferones son citocinas (proteínas) con propiedades antivirales, antitumorales e inmunomoduladoras. Los IFN se clasifican en tres tipos: Tipo I, II y III, según la estructura de sus receptores en la superficie de la membrana celular (Lin y Young, 2014; Seliger *et al.*, 2008).

El IFN de tipo I forman una superfamilia de citocinas que comprenden IFN- α (alfa), con 13 subtipos en humanos, IFN- β (beta), IFN- ω (omega), IFN- τ (tau), IFN- κ (kappa), IFN- ϵ (épsilon), e IFN- ζ (zeta). Solo IFN α , IFN- β , IFN- ω , IFN- κ e IFN- ϵ se expresan en humanos. Todas las células nucleadas infectadas por virus o bacterias pueden producir IFN de tipo I. Existen 17 genes de IFN de tipo I humano, todos agrupados en el cromosoma 9. Los IFN tipo I están genética y estructuralmente muy relacionados. Tienen una longitud de 161 a 208 aminoácidos pesos moleculares predichos de 15-24 kDa (Chevaliez y Pawlotsky, 2009). La vía de señalización del interferón de tipo I se inicia con la unión a su receptor heterodimérico compuesto por dos cadenas, IFNAR1 e IFNAR2. Los IFN de tipo I primero se une a la cadena IFNAR2 de alta afinidad, luego recluta una cadena IFNAR1 de baja afinidad, las cuales emiten señales y activan a las cinasas, TYK2 y JAK1, respectivamente. La activación de estas cinasas JAK provocan la fosforilación de los factores transcripcionales STAT1 y STAT2. Los heterodímeros STAT1 y STAT2 fosforilados forman un complejo con IRF9, lo que a su vez conduce a la formación de un complejo ternario, llamado ISGF3 (factor 3 del gen estimulado por IFN), que actúa como un factor de transcripción. El complejo ternario ISGF3 se transloca al núcleo, y se une a elementos de respuesta estimulados por interferón (IRE) en los promotores de los genes inducibles por interferón (ISG) para iniciar la transcripción génica (Figura 7) (Lazear *et al.*, 2019; Negishi *et al.*, 2018).

El IFN tipo II solo incluye el IFN gamma (IFN- γ), descubierto en 1965. El IFN- γ es producido principalmente por los linfocitos T y las células asesinas naturales (NK), y en menor medida por las células B, las células T asesinas naturales (NKT) y las células presentadoras de antígenos profesionales (APC). El IFN- γ es un homodímero, con uniones no covalentes, compuesto por dos cadenas idénticas de polipéptidos con un peso molecular de 17 kDa con aproximadamente 160 aminoácidos, que están codificadas por un gen único de 6 kb, compuestos por cuatro exones y tres intrones, que en el humano se ubica en el cromosoma 12q14 (Chevaliez y Pawlotsky, 2009).

Por último, los IFN de tipo III que incluyen solo al interferón lambda (IFN- λ). El IFN- λ incluye a su vez a los IFN- λ 1, IFN- λ 2 e IFN- λ 3 o llamados IL-29, IL-28A e IL-28B, respectivamente, los cuales fueron identificados recientemente. Los tres genes que codifican a los IFN- λ se agrupan en el cromosoma 19 en humano y comprenden 5 exones para IFN- λ 1 y 6 para IFN- λ 2 e IFN- λ 3, y varios intrones. Ellos codifican proteínas monoméricas secretadas de 20 a 22 kDa de 196 a 200 aminoácidos. El IFN- λ puede ser expresado por prácticamente todos los tipos de células que pueden infectarse con virus, la subunidad IFN- λ R1 se expresa constitutivamente en tipos de células limitados, principalmente células de origen epitelial (Castro *et al.*, 2018; Michalska *et al.*, 2018, Lin *et al.*, 2014). Todos los IFN de tipo III se unen a su receptor heterodimérico IFNLR, compuesto por IFNLR1 (también denominado IL28R α) e IL10R β . Los IFN- λ primero se une a una cadena receptora con alta afinidad IFNLR1 y luego recluta una cadena receptora de baja afinidad IL10R β . La dimerización del receptor activa las cinasas JAK1 y TYK2 para fosforilar a STAT1 y STAT2, una vez fosforilados forman un complejo con IRF9, para formar el factor de transcripción ISGF3, el cual se transloca al núcleo y se une a los ISRE para promover la expresión de cientos de ISG (Figura 7)(Lazear *et al.*, 2019; Negishi *et al.*, 2018).

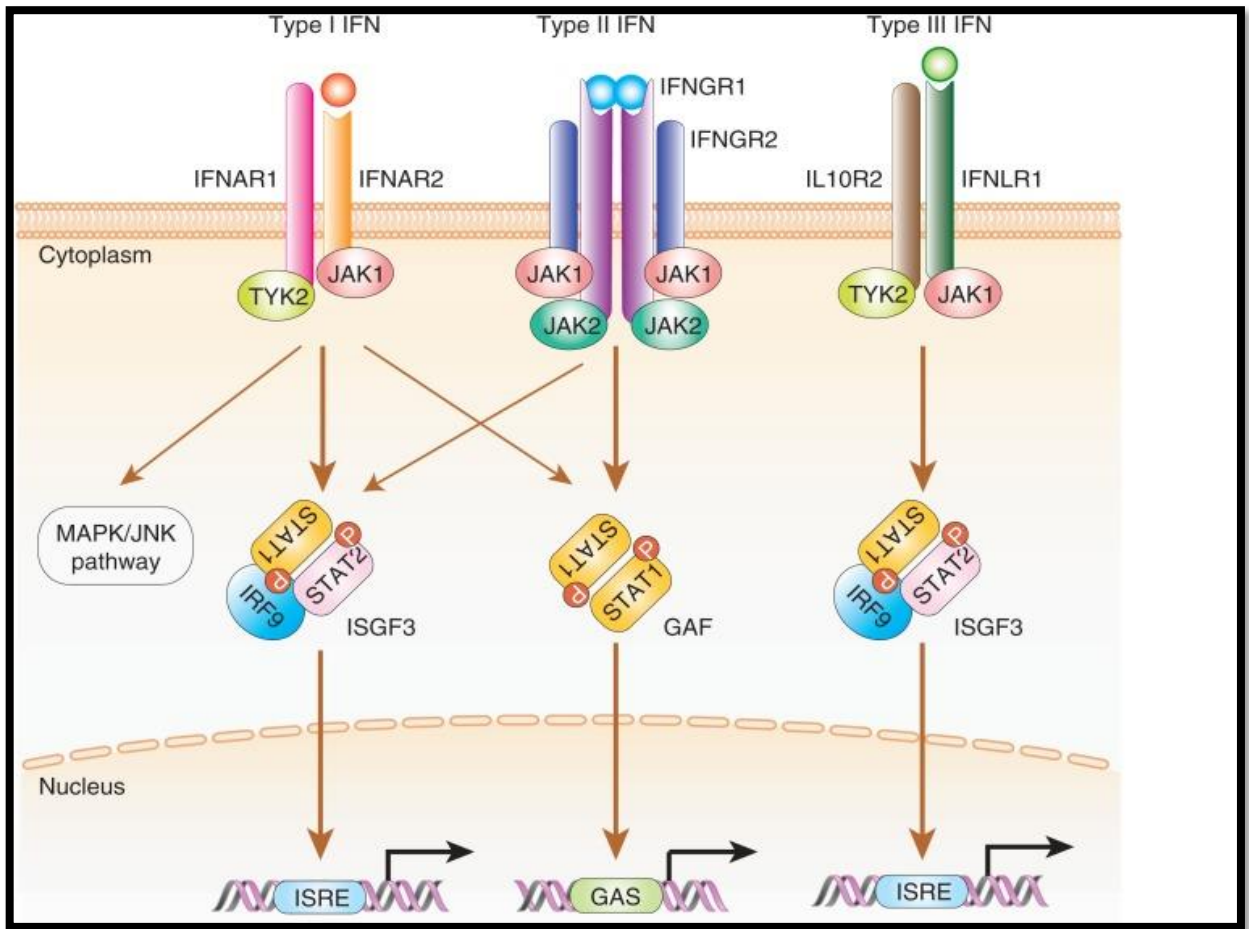


Figura 7. Vías de señalización del IFN tipo I, II y III. Los receptores de IFN tipo I y tipo III son heterodímeros compuestos por subunidades IFNAR1 e IFNAR2 o subunidades IFNLR1 e IL10R β , respectivamente. Los IFN primero se unen a una cadena receptora con alta afinidad (IFNAR2 o IFNLR1), luego reclutan una cadena receptora de baja afinidad (IFNAR1 o IL10R β) para crear un complejo ternario. La dimerización del receptor activa las cinasas TYK2 y JAK1, que fosforilan STAT1 y STAT2. Los heterodímeros STAT1 y STAT2 fosforilados forman un complejo con IRF9 para producir el factor de transcripción ISGF3. ISGF3 se transloca al núcleo para unirse a los ISRE y promueve la expresión de cientos de ISG. El IFN de tipo II se une como un homodímeros e induce la dimerización de las subunidades de IFNGR1 y el reclutamiento de las subunidades de IFNGR2. Esta asociación provoca la fosforilación de las cinasas JAK1 y JAK2, lo que lleva a la fosforilación de STAT1. STAT1 fosforilado forma el complejo GAF. GAF se transloca al núcleo para unirse a los GAS e iniciar la transcripción de cientos de genes (Lazear *et al.*, 2019; Negishi *et al.*, 2018).

Este trabajo se centra en el IFN tipo II cuyo único miembro es el IFN- γ , por lo que a continuación se describen los principales aspectos relacionados a sus mecanismos de acción y de regulación.

1.5 La vía de señalización canónica del IFN- γ

Los efectos biológicos de IFN- γ se provocan a través de la activación de la vía JAK/STAT, que modula la transcripción de cientos de genes. La vía inicia cuando el IFN- γ se une a su receptor transmembranal formado por dos subunidades de IFNGR1 y dos subunidades de IFNGR2, y en sus dominios intracelulares se asocia las cinasas de tirosina JAK1 y JAK2, respectivamente, al unirse el IFN- γ a su receptor ocurre un cambio conformacional que acerca a las subunidades del receptor y simultáneamente a las cinasas JAK1/2, lo que induce su activación por transfosforilación. Las JAK1/2 activadas fosforilan a la subunidad intracelular IFNGR1 del receptor de IFN- γ , lo que genera sitios de acoplamiento para las proteínas STAT1, para ser fosforiladas por las proteínas JAK, en el extremo C-terminal en los residuos de tirosina Y701 y la serina 727, lo que resulta en la formación de homodímeros de fosfo-STAT1, conocidos como factores activados por gamma (GAF), que se translocan al núcleo y se une a los sitios activados por gamma (GAS) ubicados en los promotores de los genes estimulados por el interferón (ISG). Uno de los reguladores negativos más importantes de la vía IFN- γ es el supresor de las proteínas de señalización de citocinas (SOCS). Los dominios SH2 en las proteínas SOCS se unen directamente a los residuos de tirosina fosforilados de las JAK activadas, inhibiendo la fosforilación de JAK y STAT1. A través de la desfosforilación y desacetilación, la configuración de los homodímeros de STAT1 vuelve a ser paralela, provocando su salida del núcleo. Además, SOCS promueve interacciones que conducen a la ubiquitinación y la degradación por el proteasoma de los componentes de la señalización JAK/STAT (Figura 8) (Castro *et al.*, 2018; Zamora *et al.*, 2023).

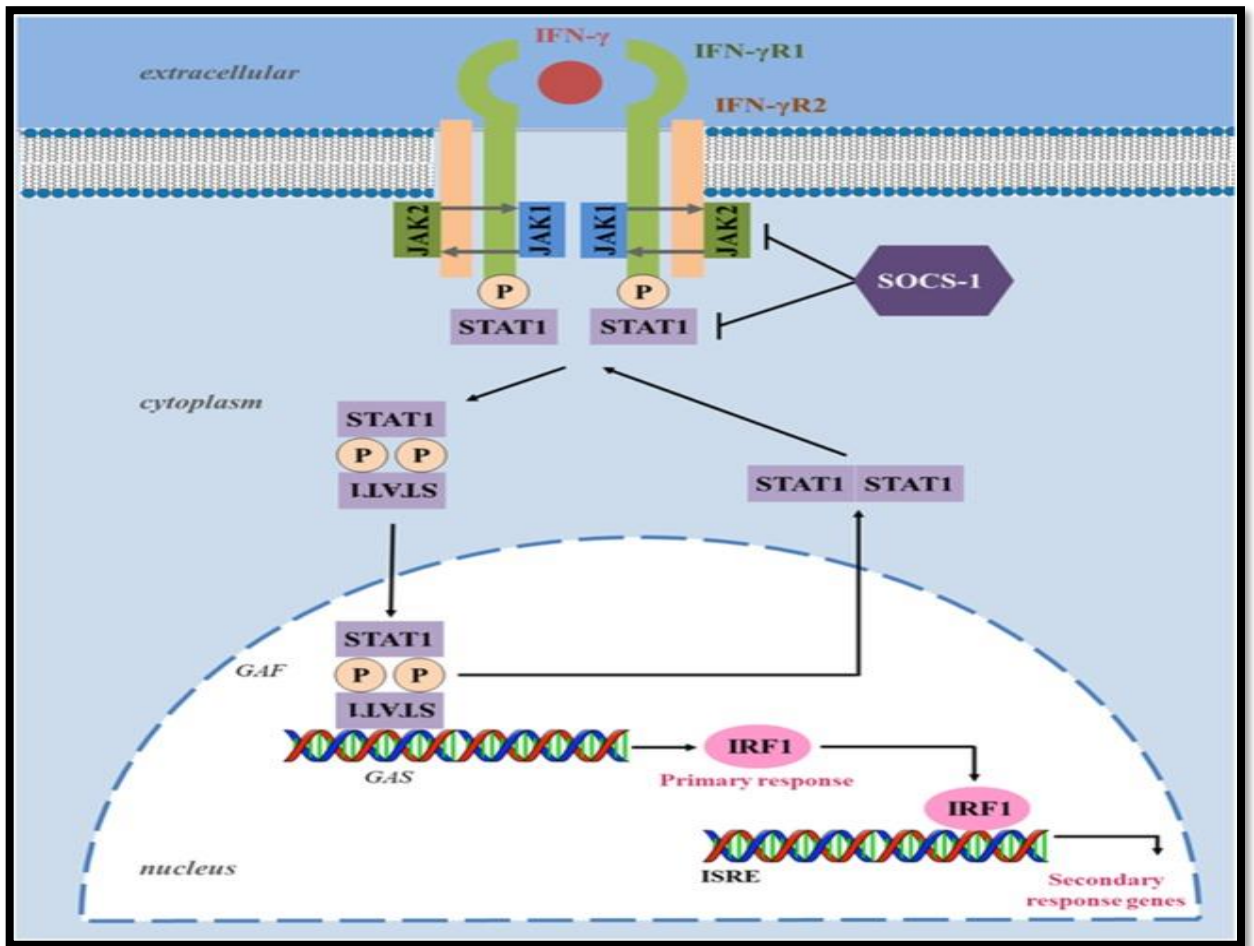


Figura 8. Vía de señalización canónica del IFN- γ . La vía del IFN- γ comienza con la unión de IFN- γ a su receptor lo que induce la transfosforilación de las proteínas JAK. Las proteínas JAK1 y JAK2 activadas fosforilan al receptor de IFN- γ , lo que provoca que se formen sitios de acoplamiento para las proteínas STAT1, al unirse STAT1 se fosforilan y se forman homodímeros de STAT1, los cuales se translocan al núcleo donde se unirán a sitios consenso GAS dentro del promotor de los genes diana de IFN- γ (Castro *et al.*, 2018; Zamora *et al.*, 2023).

2. Antecedentes

2.1 La vía de señalización del IFN- γ en cáncer.

Se ha visto, que los efectos biológicos de IFN- γ se provocan a través de la activación de la vía de señalización JAK/STAT, la cual modula la transcripción de cientos de genes (Castro *et al.*, 2018). El IFN- γ es una citocina proinflamatoria que activa al sistema inmune adaptativo e innato, que puede tener una actividad dual en el cáncer, siendo anti-tumorigénica y pro-tumorigénica (Figura 9) (Du *et al.*, 2022).

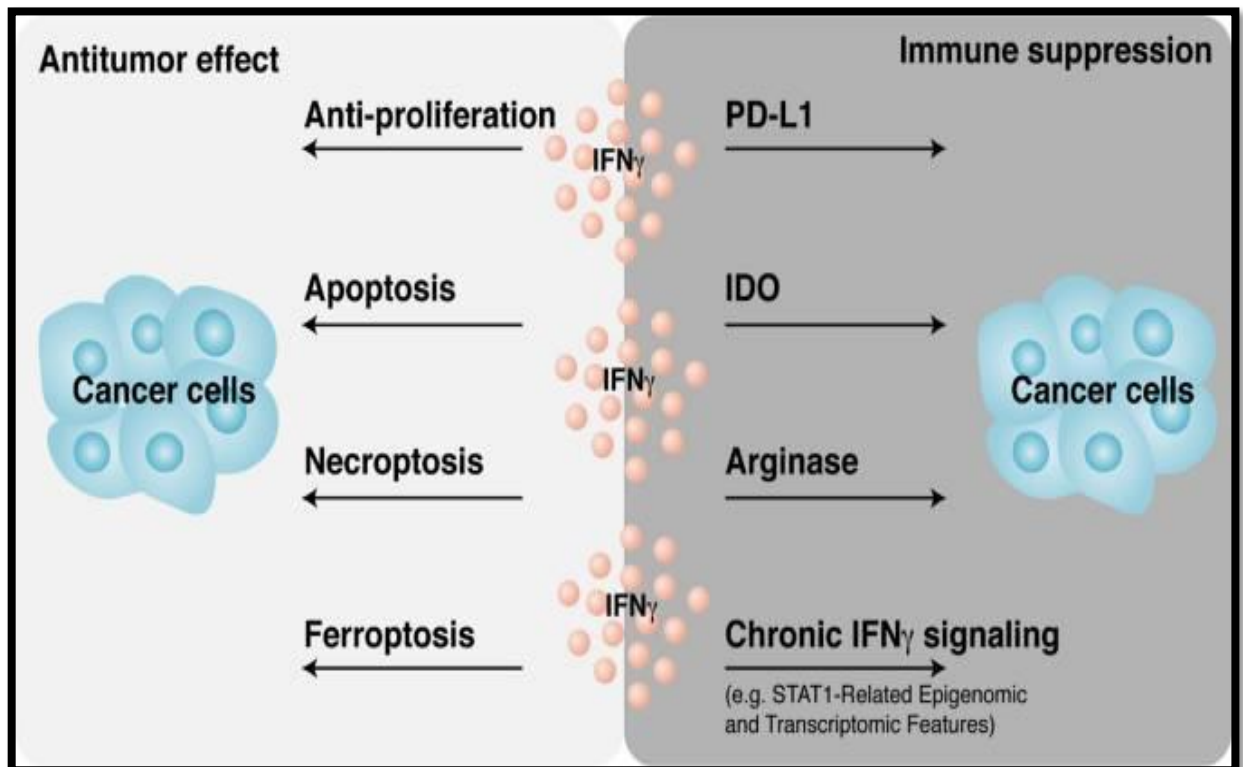


Figura 9. Efectos duales de IFN- γ en la inmunidad del cáncer. IFN- γ ejerce efectos antitumorales a través de anti proliferación celular, apoptosis, necroptosis y ferroptosis. Por el contrario, el IFN- γ puede proteger a las células cancerosas del ataque de las células inmunitarias al inducir la expresión de PD-L1, IDO y arginasa. La señalización crónica de IFN- γ refuerza los mecanismos inmunosupresores en el microambiente tumoral (Du *et al.*, 2022).

El IFN- γ cumple funciones antitumorigénicas al activar a células inmunológicas como los macrófagos M1, las células T, las células presentadoras del antígeno y las células dendríticas, que son necesarias para la presentación eficaz de antígenos y la activación de la respuesta inmunitaria adaptativa, en particular, las respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) contra patógenos y tumores(Alspach *et al.*, 2019) .

2.1.2 La vía de señalización del IFN- γ y su actividad antitumoral

El proceso conocido como inmunoedición del cáncer ejemplifica mejor las acciones del IFN- γ en la respuesta antitumoral. La inmunoedición tumoral implica tres etapas: (1) Etapa de eliminación, en la que el sistema inmunitario produce células como NKT (células T asesinas naturales); NK, (células asesinas naturales); MHC, (complejo mayor de histocompatibilidad); DC, célula dendrítica que reconoce y destruye las células tumorales que expresan antígenos potentes. Las células NK, NKT y células T son las primeras fuentes de IFN- γ para activar funciones inmunoestimuladoras; (2) Etapa de equilibrio, en la que el sistema inmunitario controla el crecimiento de las células tumorales inmunogénicas restantes manifestando en ellas un estado de latencia mediado por el sistema inmunitario; y (3) Etapa de escape, en la que el sistema inmunitario ya no puede controlar el crecimiento de células tumorales, lo que da como resultado el crecimiento progresivo de tumores clínicamente aparentes y el establecimiento de un microambiente tumoral inmunosupresor, mediado por la expresión de *PD-L1* en las células tumorales a través del IFN- γ (Figura 10) (Alspach *et al.*, 2019).. El IFN- γ promueve la diferenciación de los monocitos, los cuales inhiben la metástasis del cáncer de pulmón al inducir la expansión de células NK a través de IL-27 (Wang *et al.*, 2022).

El IFN- γ activa la vía JAK/STAT, que modula la transcripción de IRF-1, un factor de transcripción que tiene actividad antioncogénica por medio de cinco mecanismos principales: (I) regulación del ciclo celular; (II) represión de genes promotores del crecimiento; (III) inducción de genes supresores de tumores; (IV) regulación positiva de la maquinaria apoptótica, y (V) modulación de la respuesta inmune (Alspach *et al.*, 2019).

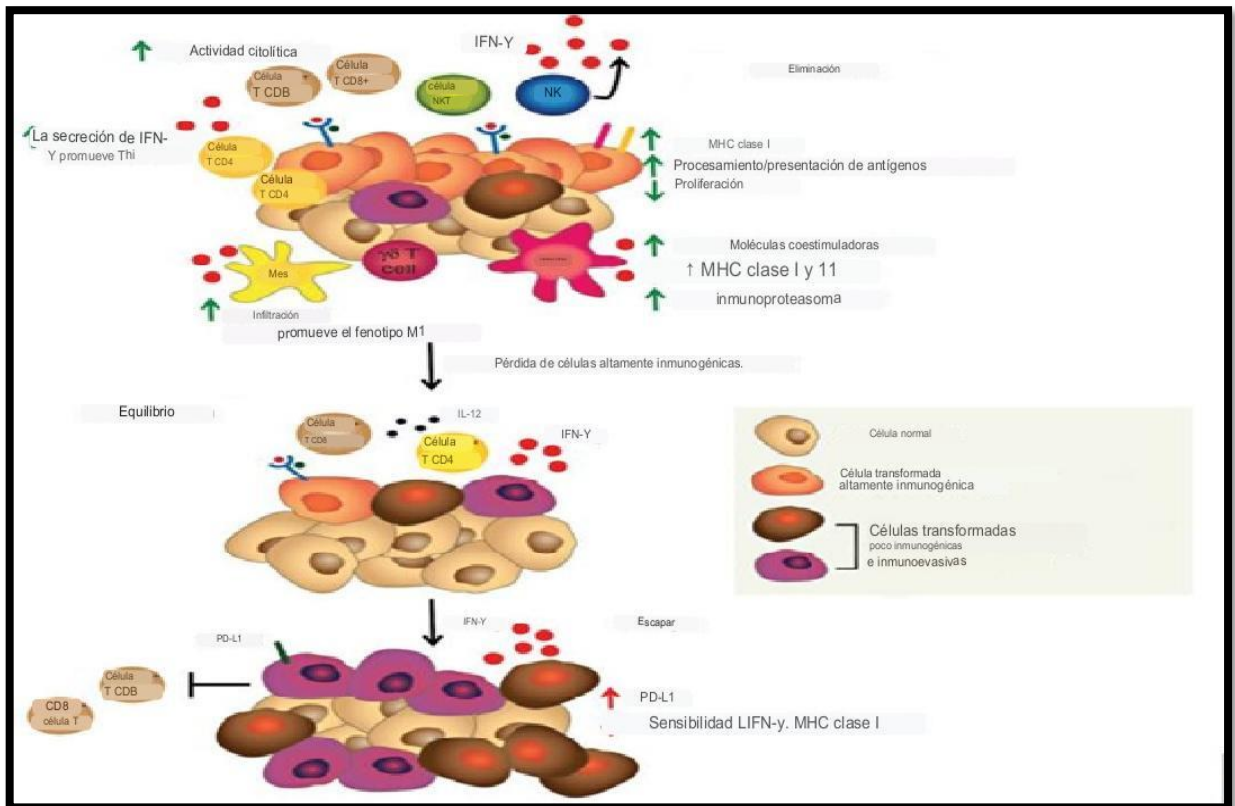


Figura 10. El IFN- γ influye en todas las etapas de la inmunoección tumoral. La inmunoección tumoral implica tres etapas: 1) eliminación, 2) equilibrio, 3) escape (Alspach *et al.*, 2019).

No obstante, existen otros factores que producen IFN- γ como los virus oncolíticos que pueden inhibir el crecimiento tumoral. Los virus oncolíticos como medida terapéutica, estimulan la respuesta inmunitaria antitumoral al replicarse específicamente en las células tumorales del huésped. **El virus oncolítico de la estomatitis vesicular (VSV), codifica al IFN- γ en tumores mamarios murinos, inhibe el crecimiento tumoral, activa a las células dendríticas y estimula la producción de citocinas proinflamatorias (Bourgeois *et al.*, 2016).**

2.1.3 La vía de señalización del IFN- γ y su actividad protumoral

La señalización persistente del IFN- γ permite que los tumores adquieran resistencia inmunitaria y efectos protumorales al aumentar la expresión de moléculas inhibitoras del sistema inmune. Por ejemplo, IFN- γ induce la expresión de moléculas inmunosupresoras, como: el ligando de muerte celular programada 1 (CD274/PD-L1), la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y la arginasa, en el microambiente tumoral.

PD-L1 es un proteína transmembranal de tipo I de 33 kDa que se compone de un dominio N terminal extracelular, un dominio citoplasmático con dos motivos de señalización basados en tirosina (Du *et al.*, 2022). *PD-L1* se une con el receptor de muerte programada 1 (*PD-1*; *CD279*) expresado en la superficie de las células T, lo que se conoce como eje PDL-1/PD1, para bloquear la activación de las células T, inhibiendo la respuesta inmunitaria; en condiciones fisiológicas normales ayuda a mantener el equilibrio entre tolerancia y autoinmunidad; por lo tanto, *PD-L1* es vital en la homeostasis inmune. *PD-L1* se expresa en tumores y de forma fisiológica en células linfoides como: células presentadoras de antígeno (APC), células B, macrófagos, células dendríticas (DC) y mastocitos, así como en células no linfoides como: células endoteliales vasculares, queratinocitos, células de los islotes pancreáticos, astrocitos, placenta y células epiteliales y endoteliales de la córnea. La alteración del eje PD-L1/PD-1 puede provocar enfermedades autoinmunes, como el lupus y la artritis. Sin embargo, *PD-L1* se sobreexpresa en diferentes tipos de cánceres como: mama, vejiga, colon, melanoma, carcinoma de células escamosas de pulmón y cabeza y cuello (Horita *et al.*, 2017; Benci *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2008).

La indoleamina 2,3-dioxigenasa (*IDO*) es una enzima inmunosupresora. Se cree que esta enzima desempeña un papel en una variedad de procesos fisiopatológicos, como la defensa antimicrobiana, la neuropatología, la inmunorregulación y la actividad antioxidante. A través de su expresión en células dendríticas, monocitos y macrófagos, así como en células tumorales, esta enzima rechaza a las células T mediante el catabolismo del triptófano para formar N-formil-quinurenina. IFN- γ induce la expresión del gen *IDO*, implicado en la evasión del sistema inmune y se correlaciona con un mal pronóstico en un amplio espectro de tipos de cáncer incluyendo el cancer colorrectal (Figura 11). Los metabolitos de quinurenina activan la señalización de PI3K-AKT en el epitelio neoplásico, promoviendo la proliferación celular y la resistencia a la apoptosis. La arginasa es una enzima que hidroliza la arginina a ornitina y urea. El IFN γ induce la expresión de arginasa en muchos tipos de células. La arginasa contribuye a las actividades inmunosupresoras de los macrófagos, DC y MDSC en el

microambiente tumoral al metabolizar nutrientes que son clave para CD8+ Activación de células T (Du *et al.*, 2022).

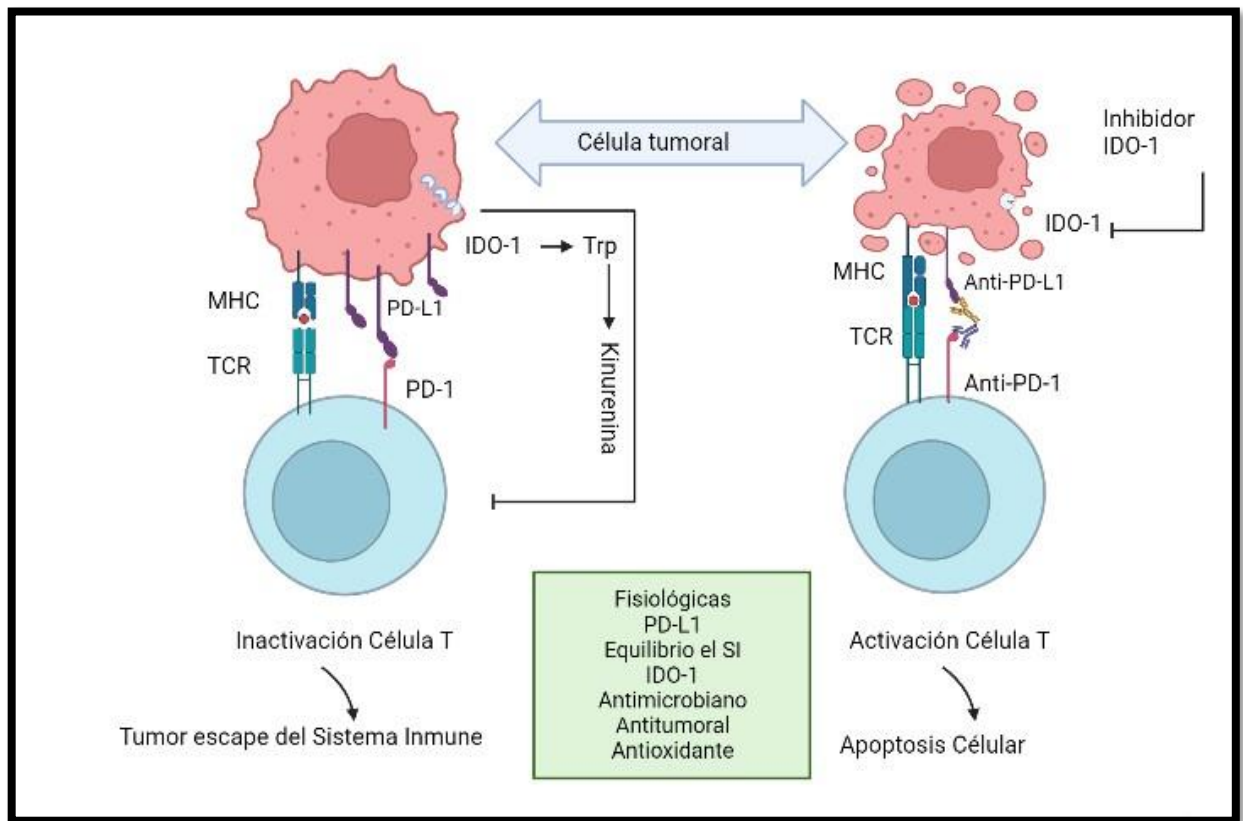


Figura 11. Escape inmunológico a través de IDO y PD-L1. La sobreexpresión de *IDO-1* y *PD-L1* están implicados en la evasión de sistema inmune y se correlaciona con un mal pronóstico en varios tipos de cáncer incluyendo el glioblastoma (Jung *et al.*, 2022). Imagen creada en BioRender.com.

El IFN- γ por medio de la señalización de STAT1 induce *IRF1*, uniéndose al elemento de respuesta estimulado por interferón (ISRE), mejorando la transcripción de varios genes con funciones inmunomoduladoras como *ISG15* y *MHCI* (Alsamman y El-Masry, 2018). El gen 15 estimulado por interferón (*ISG15*) codifica para una proteína de 15 kDa, similar a la ubiquitina, que es inducida principalmente por los interferones tipo I, pero también es inducida por infecciones virales y bacterianas, así como por el lipopolisacárido (LPS), el ácido retinoico o por ciertos factores estresantes genotóxicos. *ISG15* existe en dos formas: libre y conjugada a proteínas diana. La proteína *ISG15* libre se une covalentemente a residuos de lisina con sus proteínas diana mediante un sistema de tres enzimas: la enzima de activación E1 (Ube1L), la enzima de conjugación E2 (UbCH8) y la enzima ligasa E3 (HERC5, HHARI, y EFP).

La primera de ellas, la Ube1L activa a ISG15 por medio de un mecanismo de dos pasos que depende de ATP, primero efectúa una adenilación del extremo carboxilo terminal de ISG15 y luego realiza una tioesterificación para enlazar el carboxilo con un residuo de cisteína de la enzima E1. Luego ISG15 es transferido a UbCH8 por medio de una reacción de transtioesterificación. Por último, la E3 ligasa cataliza el enlace isopeptídico entre ISG15 y un residuo de lisina de la proteína blanco. Este proceso es similar a la ubiquitinación, pero en este caso, constituye la modificación postraduccional conocida como ISGilación, siendo un proceso reversible conocido como deISGilación, en la cual la enzima USP18 (UBP43) rompe el enlace covalente quedando la proteína ISG15 libre (Desai *et al.*, 2013; Tecalco, 2020). El tratamiento con IFN- γ de las células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 aumenta la expresión de ISG15 y la subsiguiente ISGilación de proteínas, que induce cambios en la morfología celular asociados con la reorganización del citoesqueleto (Tecalco *et al.*, 2019).

Además, se han visto otros efectos protumorales de, IFN- γ como la expresión de iNOS y FAS-FASL. La óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, NOS2) es una de las tres isoformas que pertenecen a la familia de las óxido nítrico sintasas, que son enzimas que catalizan la producción de óxido nítrico (NO) por oxidación de L-arginina (L-Arg) a L-citrulina. iNOS no está constantemente presente en las células y solo se expresa cuando la célula es inducida o estimulada, típicamente por citocinas proinflamatorias y/o por el LPS bacteriano. Las concentraciones altas de NO, por la sobreexpresión o la desregulación de iNOS, pueden provocar efectos tóxicos y están asociadas con una variedad de enfermedades humanas, incluido el shock séptico, la disfunción cardíaca, el dolor, la diabetes y el cáncer (Cinelli *et al.*, 2020; Kielbik *et al.*, 2019). La iNOS derivada de tumores promueve la angiogénesis, lo que permite una mayor vascularización y crecimiento tumoral (Gocher *et al.*, 2022).

El receptor de muerte de la superficie celular (Fas/CD95/APO-1/TNFRSF6) es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) y es un conocido como activador de la apoptosis. La unión con el ligando Fas (FasL), expresado

en la superficie de los linfocitos T citotóxicos activados (CTL), puede conducir al reclutamiento de la proteína asociada a Fas con dominio de muerte (FADD) y de la procaspasa-8, formando el complejo de señalización inductor de muerte (DISC). Esto da como resultado la activación de la cascada de caspasas y, en última instancia, la apoptosis. Fas-FasL activa diversas vías de señalización, incluida la vía de señalización de muerte celular extrínseca, que es uno de los mecanismos efectores que utilizan los CTL para destruir a las células tumorales. Así es como la señalización alternativa de no muerte que conduce a la supervivencia celular, proliferación, motilidad, transición epitelio-mesénquima, crecimiento del cáncer y a la metástasis, en algunos contextos. Además, la pérdida de la expresión de Fas es un sello distintivo del melanoma humano (Al Subeh *et al.*, 2022; Chakrabandhu *et al.*, 2016). IFN- γ inhibe la proliferación de células de leucemia K562 y promueve la apoptosis celular al facilitar la expresión de las proteínas Fas y FasL (Xia *et al.*, 2017).

2.2 La vías de señalización del IFN- γ y sus efectos anti-tumorigénicos en el glioblastoma.

La actividad anti-tumorigénica del IFN- γ se ha observado en diferentes tumores, incluyendo el glioblastoma. Por ejemplo, el IFN- γ inhibe la proliferación celular del glioblastoma y disminuye las propiedades invasivas de las células de glioma, a través de la reducción de la unión de la molécula de ácido hialurónico (HA) a la matriz extracelular (Knüpfer *et al.*, 1997). El IFN- γ combinado con retinoides induce la apoptosis en células T98G y U87MG a través de vías dependientes de caspasa y calcio. En modelos animales, el IFN- γ exógeno induce la regresión del glioma y los efectos antitumorales del IFN- γ pueden reforzarse mediante la inhibición de la iNOS. Además de los efectos directos de eliminación de tumores, el IFN- γ , junto con el IFN- α , incrementa la expresión de la molécula MHC de clase I en la superficie de las células de glioblastoma humanas, aumentando su inmunogenicidad (H. Ji *et al.*, 2021). La proliferación de la línea celular U-87 de glioblastoma es estimulada a través de diferentes vías de señalización (MAPKs, PI3K/Akt/mTOR, PKA y PKC), en donde la comunicación cruzada o “crosstalk” entre ellas es común en la regulación celular. HeberFERON, (una formulación conjunta de IFN- α 2b e IFN- γ) actúa sobre la

mayoría de estas vías de señalización y ajusta las respuestas biológicas, provocando un efecto antiproliferativo en estas células. HeberFERON también puede contribuir a disminuir el número de células mediante mecanismos de muerte como la apoptosis y la autofagia (Vázquez *et al.*, 2022).

2.3 La vías de señalización del IFN- γ y sus efectos pro-tumorigénicos en glioblastoma.

Por otro lado, con respecto al SNC, el IFN- γ constituye uno de los factores activadores de la microglía más potentes. Muchos de los efectos reguladores del IFN- γ en la microglía parecen estar mediados por IRF-1 y/o STAT1, que transcriben múltiples genes efectores, incluidas la proteína 10 inducible por IFN- γ (*IP-10*), *CD40*, *IL-12* e *iNOS*, todas relacionadas con procesos inflamatorios y trastornos autoinmunes (Delgado, 2003). El IFN- γ también aumenta los niveles de la proteína ISG15 a nivel citoplasmático y nuclear, en células de glioblastoma (Tecalco *et al.*, 2022).

El IFN- γ induce la expresión de la proteína principal de la bóveda (*MVP*) la cual interfiere con las señales JAK/STAT activadas por IFN- γ . Sin embargo, la presencia de *MVP* en células H65 de cáncer de pulmón bloquea la expresión de *ICAM-1*, tanto basal como inducida por IFN- γ , mientras que la modulación negativa de los niveles endógenos de *MVP* por un shRNA mejoró la expresión de *ICAM-1* inducida por IFN- γ en células derivadas de glioblastoma U373 (Steiner *et al.*, 2006). El tratamiento con IFN- γ aumentó la expresión de *IDO-1* en macrófagos/microglía del espacio perivascular, en el espacio subaracnoideo y en el glioblastoma, pero no en la microglía parenquimatosa del cerebro en humanos o modelos murinos (Ji *et al.*, 2021). El IFN- γ induce la expresión de genes inmunosupresores como *IDO-1* y *PD-L1* en líneas celulares dBT114 y dBT116 de glioblastoma. La presencia de *IDO-1* y *PD-L1* en vesículas extracelulares (EV) promueve la inducción de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) y de monocitos no clásicos (NCM), que a su vez inhiben la proliferación de células T (Jung *et al.*, 2022).

Las células de glioblastoma inducen la secreción de *PD-L1* mediante la activación de varios receptores, como el receptor toll like (TLR), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el receptor de interferón alfa (IFNAR), el receptor de interferón gamma (IFNGR) (Litak *et al.*, 2019). Así mismo, en líneas celulares de glioblastoma que fueron tratadas con IFN- γ , aumentó la expresión de *PDL-1* y la actividad de *IDO*, pero disminuyó la secreción de TGF-beta2 (Avril *et al.*, 2010). En células de glioblastoma, el IFN- γ aumenta la expresión de *PD-L1* mediante la activación de las vías de señalización de p38/JNK/ERK. *PD-L1* mejora la proliferación y migración de células de glioblastoma mediante la regulación de moléculas de vimentina, CDK4, CDK6 y MMP-2. Sin embargo, la inhibición de *PD-L1* suprimió la proliferación y migración de células de glioblastoma (Jia *et al.*, 2022).

En un análisis *in silico* con datos de tejidos de pacientes con glioblastoma se mostró que los elementos de la vía de señalización del IFN- γ están sobreexpresados, haciendo especial énfasis en el receptor del IFN- γ y en los factores de transcripción STAT1 e IRF1, en comparación con muestras de tejido normal (Figura 12). Además, se observó que el tratamiento con IFN- γ incrementa la migración celular sin afectar la viabilidad de las células de glioblastoma (Zamora, 2023).

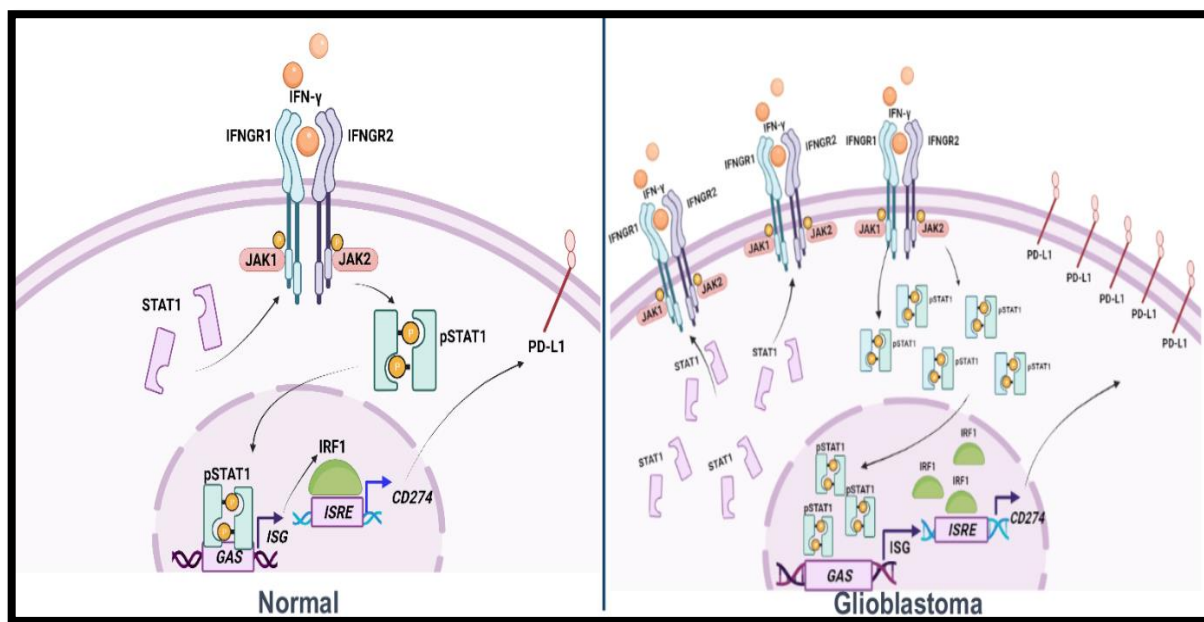


Figura 12. Elementos de la vía de señalización del IFN- γ están desregulados en glioblastoma. Los componentes de la vía del IFN- γ están sobreexpresados en glioblastoma, los cuales incluyen el receptor del IFN- γ , los factores de transcripción STAT1 e IRF1 (Zamora, 2023).

Por lo tanto, el IFN- γ induce la expresión de los genes *IDO-1* y *PD-L1*, implicados en la evasión del sistema inmune en varios tipos de tumores malignos, incluyendo el glioblastoma. Sin embargo, hasta ahora se desconoce si hay otros genes modulados por la señalización canónica del IFN- γ que tengan implicaciones en la progresión del glioblastoma.

2.4 Planteamiento del problema

En este trabajo nos interesa identificar genes asociados a la progresión del glioblastoma que sean modulados por la señalización del IFN- γ . Por lo que inicialmente se pretende abordar la siguiente pregunta.

¿La señalización del IFN- γ tiene efecto sobre el perfil de genes asociados a cáncer en células derivadas de glioblastoma A-172?

3. Hipótesis

La vía de señalización del IFN- γ regula positiva y negativamente la expresión de genes asociados a cáncer en células derivadas de glioblastoma A-172.

4. Justificación

Las funciones de la señalización del IFN- γ en cáncer, incluyendo el glioblastoma, parecen ser duales, promoviendo o inhibiendo la progresión tumoral de acuerdo con diferentes estudios. Sin embargo, se sabe poco sobre la expresión de genes modulados por IFN- γ en glioblastoma, y si este perfil génico podría explicar la dualidad de la señalización del IFN- γ en este tipo de cáncer. El glioblastoma es un tumor de grado 4, altamente agresivo y letal del SNC, por lo que se requiere de más investigaciones en busca de genes blancos como posibles potenciales biomarcadores para su diagnóstico y futuros tratamientos. Por lo tanto, en este estudio será central identificar si existen genes con funciones duales modulados por IFN- γ en glioblastoma. Los hallazgos de este estudio serán importantes para proponer nuevas moléculas clave en la progresión del glioblastoma.

5. Objetivos

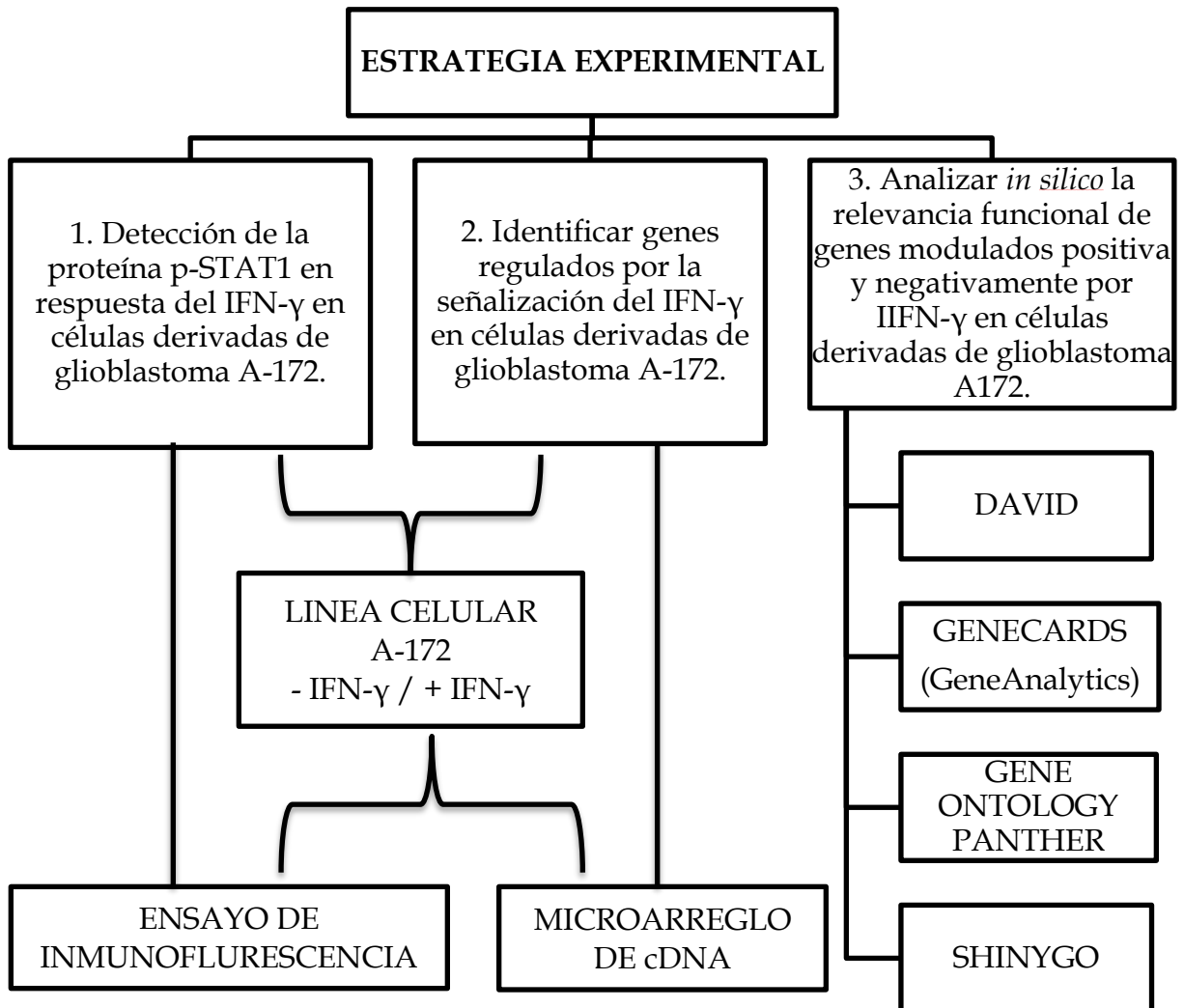
5.1 Objetivo general

Identificar genes modulados por la señalización del IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172 con potenciales implicaciones funcionales en la progresión del cáncer.

5.2 Objetivos particulares

1. Analizar la activación de p-STAT1 en respuesta al IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172.
2. Identificar genes regulados por la señalización del IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172.
3. Analizar *in silico* la relevancia funcional de los genes modulados por IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172.

6. Estrategia experimental



7. Metodología

7.1 Línea celular

Se utilizó la línea celular A-172 derivada de glioblastoma de un hombre de 53 años, la cual presentó mutaciones de diferentes genes como: *CDKN2A*, *PTEN*, *LMNA*, *NOTCH1*, *DIS3*, *ARID1B*, *ARHGAP26* y *TLL1*. La línea celular se mantuvo en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal al 10 % y antibióticos (penicilina/estreptomocina), y se incubó en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C. Los medios de cultivo se obtuvieron de Invitrogen y ATCC.

7.2 Inmunofluorescencia

Las células A-172 se sembraron en cubreobjetos que fueron previamente tratados con polilisina por 10 min e irradiados con luz UV por 30 min. Las células se incubaron sin y con el tratamiento de IFN- γ 100ng/mL durante 24 h; posteriormente, las células se lavaron con PBS frío y luego se fijaron con paraformaldehído al 4% por 15 min a temperatura ambiente y se permeabilizaron con 1 mL de tritón al 0.1% por 8 min. La solución de bloqueo consistió en albumina al 1% que se usó por 1 h a temperatura ambiente. Las células se incubaron con el anticuerpo primario anti-pSTAT1 (Cell Signaling) toda la noche a 4°C. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado al fluoroforo Alexa 488 (Abcam) durante 1 h. Por último, las muestras se montaron en el portaobjetos con solución DAPI (Invitrogen), para la tinción nuclear. Finalmente, las células fueron analizadas en el microscopio confocal Olympus y las imágenes obtenidas fueron procesadas con el software Imagen J. Los ensayos se realizaron por triplicado.

7.3 Extracción de RNA y microarreglo de cDNA

Se llevó a cabo un análisis de microarreglos de cDNA de células de glioblastoma A-172 con y sin tratamiento con IFN- γ , para identificar genes modulados por IFN- γ específicos en líneas celulares de glioblastoma. Se usó TRIzol para aislar el RNA total de células de glioblastoma tratadas con y sin IFN- γ (100 ng/mL) durante 24 h. La concentración y la pureza del RNA se determinó utilizando un NanoDrop, ND-1000. La integridad del RNA se evaluó mediante electroforesis en un gel de agarosa. Se usó RNA total (10 μ g) para la síntesis de cDNA para el microarreglo.

El cDNA de la línea celular A-172 de glioblastoma sin IFN- γ se usó como control y se marcó con Alexa 555, y el de la línea celular A-172 de glioblastoma tratadas con IFN- γ se marcó con Alexa 647, se mezclaron y se hibridaron en Human cancer 50-mer oligo array de MWGBiotech Oligo Sets (<http://www.mwgbio.com>). Los resultados obtenidos de la cuantificación de imágenes de microarrays de cDNA se analizaron utilizando el software GenArise. Se utilizó el servicio de la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular (IFC), y se seleccionaron los genes regulados negativa y positivamente por IFN- γ , con un Z-score > 2 para estudiar los cambios de expresión génica. Los resultados de los microarreglos de cDNA se analizaron en diferentes bases de datos como: David, GeneCards, Gene Ontology Panther y ShinyGO.

7.4 Análisis in silico

Se usaron las siguientes bases de datos: David Gene Ontology, GeneCards, Gene Ontology Panther y ShinyGO. David gene Ontology (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>) se usó para identificar a los genes de acuerdo con la lista de símbolos. David es una base de datos que proporciona la siguiente información: a) ontología genética de diferentes genes enriquecidos; b) Visualiza los genes en los mapas de vías de BioCarta y KEGG; c) Muestra lista de proteínas que interactúan y resalta los dominios y motivos funcionales de proteínas; d) Explora nombres de genes en lote; e) Vincula asociaciones gen-enfermedad; f) Redirige a publicaciones relacionadas. En GeneCards (<https://www.genecards.org/>) se realizó

el análisis de genes para conocer la ontología genética de la lista de genes regulados por IFN- γ en glioblastoma. GeneCards es una base de datos que permite realizar búsquedas y proporciona información sobre todos los genes humanos anotados y predichos. GeneCards integra automáticamente datos centrados en genes de aproximadamente 150 fuentes web, incluida información genómica, transcriptómica, proteómica, genética, clínica y funcional. GeneAnalytics utiliza algoritmos sofisticados para proporcionar asociaciones genéticas significativamente enriquecidas con patologías, vías, términos GO, expresión y compuestos de GeneCards y MalaCards. Gene Ontology Panther (<http://www.pantherdb.org/>) es una base de datos que permite el análisis de proteínas a través de relaciones evolutivas, fue diseñado para clasificar proteínas y sus genes a fin de facilitar un análisis de alto rendimiento. Se utilizó para conocer diferentes ontologías. ShinyGO (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/#tab-9561-5>) es un programa que usa términos GO de genes enriquecidos y otras vías para más de 420 especies de plantas y animales, según la anotación de Ensembl. Además, produce diagramas de vías KEGG con sus genes resaltados, redes y árboles de agrupamiento jerárquico que resumen términos/vías superpuestas, redes de interacción proteína-proteína, gráficos de características genéticas y motivos de promotores enriquecidos. Este programa se usó para identificar las diferentes vías de señalización en diferentes tipos de cáncer y sus genes relacionados.

8. Resultados

8.1 Análisis de la activación de p-STAT1 en respuesta al IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172

Para determinar que las células derivadas de glioblastoma A-172 son capaces de responder al tratamiento del IFN- γ activando su vía de señalización canónica, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia para detectar a la proteína p-STAT1. La proteína STAT1 es fosforilada por las proteínas JAK1/2, una vez que el IFN- γ se une al complejo de sus receptores desencadenando su vía de señalización. En consecuencia, STAT1 es fosforilada por las cinasas JAK, provocando cambios en su conformación, su homodimerización y su enriquecimiento en el núcleo celular. Nuestros resultados mostraron que la detección de p-STAT1 fue escasa o nula en las células A-172 en ausencia de tratamiento, mientras que una fuerte señal de p-STAT1 se observó en el núcleo de las células A-172 tratadas con IFN- γ . Por lo tanto, la identificación de p-STAT1 en el núcleo de las células A-172, es un indicativo de que la vía de señalización canónica del IFN- γ se activó (Figura 13).

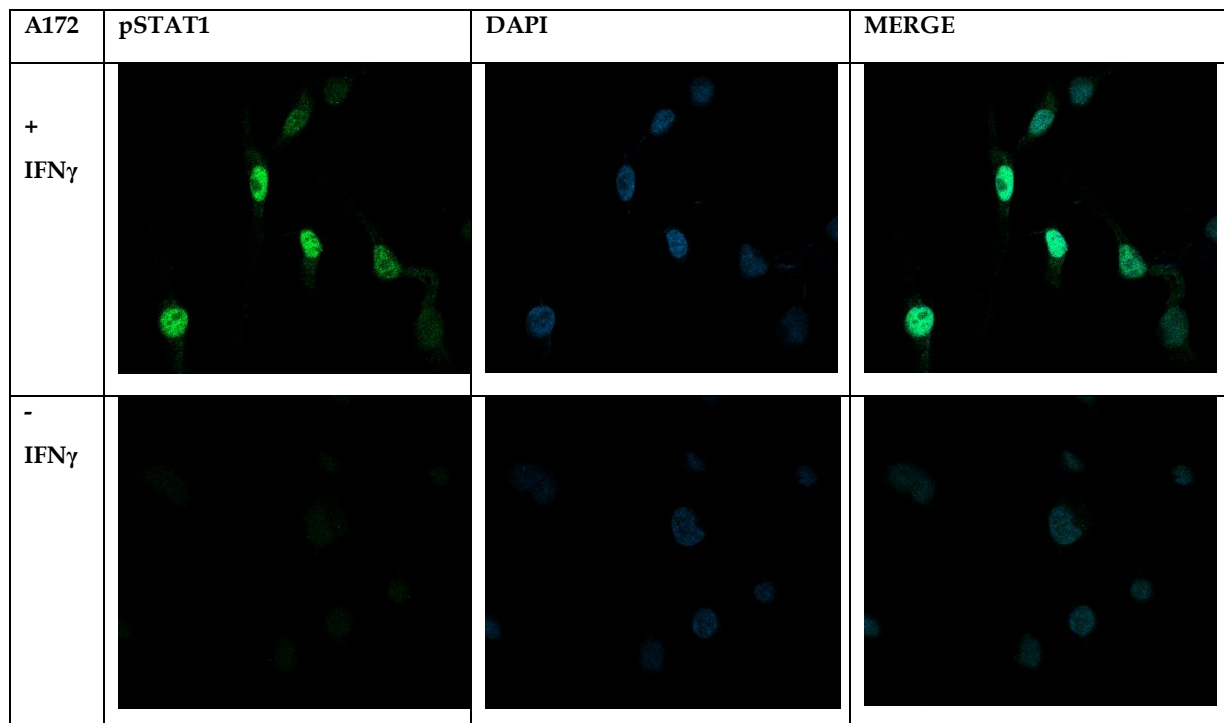


Figura 13. La proteína p-STAT1 se acumula en el núcleo celular en respuesta al estímulo del IFN- γ . Células de glioblastoma A-172 en condiciones basales y estimuladas con IFN- γ se analizaron por inmunofluorescencia usando un anticuerpo primario anti-p-STAT1 y un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a un fluoróforo Alexa 488 (verde). Se uso DAPI (azul) para la tinción nuclear.

8.2 Identificación de genes regulados por la señalización del IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172

Una vez que demostramos que la vía de señalización canónica del IFN- γ es activada en las células derivadas de glioblastoma A-172, debido a la acumulación nuclear de p-STAT1 en células tratadas con este interferón, analizamos los potenciales genes blanco de la vía de señalización del IFN- γ /p-STAT1. Para identificar a los genes modulados por el tratamiento con IFN- γ en las células A-172, se realizó un microarreglo de cDNA, correspondiente a genes asociados a cáncer. Para ello, las células A-172 fueron tratadas con 100 ng/mL de IFN- γ durante 24 h, y posteriormente se llevó a cabo la extracción del RNA total con la técnica de TRIzol y se verificó la integridad del RNA, para proseguir con la obtención del cDNA.

El cDNA de la línea celular A-172 de glioblastoma sin IFN- γ (Control) se marcó con Alexa 555, y el de la línea celular A-172 de glioblastoma tratada con IFN- γ se marcó con Alexa 647, luego se mezclaron y se hibridaron en un microarreglo de 1920 genes asociados a cáncer. Los resultados obtenidos se analizaron con el software GenArise, y solo se seleccionaron los genes modulados por IFN- γ en glioblastoma con un Z-score > 2 , y un fold change > 1 , para estudiar los cambios de expresión génica. Los genes expresados diferencialmente (DEG, por su denominación en inglés *differentially expressed genes*) en las células de glioblastoma tratadas con IFN- γ fueron 92, de los cuales, solo 29 fueron modulados negativamente; en comparación con 63 genes que fueron sobreexpresados por IFN- γ . A continuación, se muestran los DEG por IFN- γ (Tabla I y II).

Tabla I. Genes reprimidos por IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172

Símbolo del gen	Nombre del gen	Z-score	Fold chance
ANXA1	Anexina A1	-2.254107	-1.287557
CDK8	Cinasa dependiente de ciclina 8	-2.559104	-1.83925
CSF2RB	Subunidad beta del receptor del factor 2 estimulante de colonias	-2.43984	-1.42901
CYP2C19	Citocromo P450 familia 2 subfamilia C miembro 19	-2.24914	-1.656228
DAP3	Proteína 3 asociada a la muerte	-2.34044	-2.013566
DNM1	Dinamina 1	-2.31499	-1.369985
EPHA3	Receptor de EPH A3	-3.44105	-1.756556
EPHX1	Epóxido hidrolasa 1	-3.70192	-1.70706
EPS15P1	Vía del receptor del factor de crecimiento epidérmico sustrato 15 pseudogén 1	-3.20723	-1.65163
ERCC4	Reparación por escisión de ERCC 4, subunidad catalítica de endonucleasa	-2.16048	-1.268152
FER	FER tirosina cinasa	-2.19789	-1.386198
FGF3	Factor de crecimiento de fibroblastos 3	-2.54333	-1.643395
HR	HR lisina desmetilasa y correpresor del receptor nuclear (HR)	-2.9065	-1.611978
HSD17B2	Hidroesteroide 17-beta deshidrogenasa 2)	-2.2282	-2.333333
IL13	Interleucina 13	-2.18167	-2.260042
INHA	Subunidad de inhibina alfa	-2.35925	-1.923841
LBX1	Mariquita homeobox 1	-2.34741	-1.457598
MRPL28	Proteína ribosómica mitocondrial L28	-2.53584	-1.363111
MTAP	Metiltioadenosina fosforilasa	-2.24839	-1.910646
OPTN	Optineurina	-2.29784	-1.735879
RB1	Correporador transcripcional RB 1	-2.03932	-1.29687
SLC22A3	Familia de transportadores de soluto 22 miembro 3	-2.91901	-1.483132
TAF15	Factor asociado a la proteína de unión a la caja TATA 15	-2.34531	-1.349308
TFG	Tráfico de ER al regulador de Golgi	-2.01682	-1.348147
TGFBR2	Receptor beta 2 del factor de crecimiento transformante	-2.47165	-1.545489
VTN	Vitronectina	-2.20833	-1.870649
ZNF71	proteína de dedo de zinc 71	-2.12004	-1.316721
ARMET	Proteína recombinante ARMET	-2.45065	-1.758193
CUTL1/CUX1	Corte de Proteína Homeobox 1	-2.2282	-2.333333

Tabla II. Genes regulados positivamente por IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172

Símbolo del gen	Nombre del gen	Z-score	Fold chance
ACO1	Aconitasa 1	2.582208	2.119505
ADAMTS6	ADAM metalopeptidasa con trombospondina tipo 1 motivo 6	3.023156	1.362273
ADRB2	Adrenoceptor beta 2	2.30434	2.509091
APOA1	Apolipoproteína A1	2.067684	1.315617
ARHGDI1	Inhibidor beta de la disociación de Rho GDP	2.320148	1.247638
AXL	AXL receptor tirosina cinasa	3.118667	1.87343
BCL7A	Subunidad del complejo de remodelación de cromatina BAF BCL7A	2.488095	1.40311
BMI1	Protooncogén BMI1, dedo anular polycomb (BMI1)	2.602619	1.291482
C9	Complemento C9	2.190437	1.450774
CASP10	Caspasa 10	2.933194	1.523658
CASP8	Caspasa 8	3.210845	1.651948
CDC25A	Ciclo de división celular 25A	2.178284	1.988359
CDH2	Cadherina 2	4.277334	1.476138
CTSO	Catepsina O	2.021604	1.309387
CYP7B1	Citocromo P450 familia 7 subfamilia B miembro 1	2.658437	2.531421
EIF4B	Factor de iniciación de la traducción eucariota 4B	2.387375	1.353008
FMR1	Ribonucleoproteína 1 del mensajero X frágil	2.181587	1.239779
FUS	Proteína de unión a ARN FUS	2.124035	1.484368
FZD4	Receptor de clase frizzled 4	2.979583	1.459215
GPR19	Receptor acoplado a proteína G 19	2.483222	3.088235
GRB14	Proteína unida al receptor del factor de crecimiento 14	2.168514	1.263491
GTF2F2	Subunidad 2 del factor de transcripción general IIF	3.412211	1.518098
HDAC1	Histona desacetilasa 1	2.147889	1.21098
HFE	Regulador de hierro homeostático	2.981833	2.228007
HHAT	Erizo aciltransferasa	2.206109	1.211083
LCN2	Lipocalina 2	2.987799	1.630882
LMO1	Solo dominio LIM 1	3.747641	1.7781
MADD	Dominio de muerte activador de MAP cinasa	2.408087	1.241506
MAPRE1	Proteína asociada a microtúbulos miembro de la familia RP/EB 1	3.271179	1.570427
MBD2	Proteína 2 del dominio de unión a metil-CpG	2.721258	1.79845
MLANA	Melan-A	2.295612	1.466432
MLF1	Factor de leucemia mieloide 1	2.080746	1.454095
MXI1	MAX interactor 1, proteína de dimerización	3.00598	1.371869
ECM1/ NDE1	NudE proteína de neurodesarrollo 1	2.475674	1.327234
NR2F1	Miembro 1 del grupo F de la subfamilia 2 de receptores nucleares	2.441384	1.367319

PILRA	Receptor tipo 2 tipo inmunoglobina emparejado alfa	2.059121	1.603887
POLB	ADN polimerasa beta	2.079885	1.45889
PPIE	Peptidilprolil isomerasa E	2.044348	1.466611
PRKCZ	Proteína cinasa C zeta	2.376653	1.569996
PTTG1IP	Proteína que interactúa con PTTG1	2.556663	2.64564
RBL2	Correpresor transcripcional RB como 2	2.533052	1.359159
RHOF	Miembro de la familia de homólogos ras F, asociado a filopodios	2.100509	1.4102
RNF139	Proteína del dedo anular 139	2.247797	1.397094
RPL22	Proteína ribosómica L22	2.31006	3.022727
RPS16	Proteína ribosómica S16	2.758239	1.492608
RPS3	Proteína ribosómica S3	2.186868	1.268293
RRAS2	RAS relacionado 2	2.008182	1.41207
SET	SET protooncogén nuclear	2.175218	1.54695
SLC22A4	Familia de portadores de soluto 22 miembro 4	2.125026	1.394555
SMAD3	Miembro de la familia SMAD 3	2.153011	1.276551
SPP1	Fosfoproteína 1 secretada	3.417722	1.455082
SUMO1	Pequeña ubiquitina como modificador 1	2.294487	1.442884
SYT1	Sinaptotagmina 1	2.45766	1.243131
TFF1	Factor de trébol 1	2.299571	1.212652
TNFAIP3	Proteína 3 inducida por TNF alfa	2.355932	1.694087
TP53	Proteína tumoral p53	2.465199	1.458357
TRPM1	Miembro 1 de la subfamilia M del canal catiónico potencial del receptor transitorio	2.49256	1.574979
USP32	Peptidasa específica de ubiquitina 32	2.478623	1.713618
VILL	Villano como	2.519781	1.905961
NBS1/NBN	Nibrina	2.898663	1.236504
FLJ11021/RSRC2	Coil 2 rico en arginina y serina	3.86582	3.131195
ZNF278/PATZ1	Gancho POZ/BTB y AT con dedo de zinc 1	2.184921	1.312885
RAD51L1/RAD51B	RAD51 paralog B	2.373234	1.374425

8.3 Análisis *in silico* de la relevancia funcional de los genes modulados por IFN- γ en células de glioblastoma A-172

Para determinar las potenciales implicaciones funcionales de los DEG modulados por el tratamiento del IFN- γ en las células derivadas de glioblastoma A-172, se realizó un análisis *in silico* utilizando las bases de datos de GeneCards, Panther y ShinyGO. A través de estos programas fue posible realizar un análisis de enriquecimiento de genes, es decir, un análisis de la asociación de un conjunto de genes con el fenotipo celular en respuesta a la activación de la vía de señalización del IFN- γ . A continuación, se describen los resultados obtenidos.

8.3.1 Análisis de los genes modulados por IFN- γ en células de glioblastoma A-172 por GeneCards.

GeneCards es una base de datos que permite buscar información sobre todos los genes humanos, incluida información transcriptómica, proteómica, genética clínica y funcional. En específico se ocupó la opción GeneAnalytics que utiliza algoritmos sofisticados para proporcionar asociaciones genéticas significativamente enriquecidas, proporcionando información como: tejidos, sistemas, patologías, vías, y la ontología génica. Dentro de GeneCards/GeneAnalytics, el programa de *Gene Ontology* o GO permitió un análisis basado en tres ontologías las cuales fueron: función molecular, proceso biológico y componente celular. Respecto a los 29 genes regulados negativamente por IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172, los genes *DAP3*, *TAF15*, *RB1*, *EPHA3*, *ERCC4*, *HR*, *ANXA1*, *MTAP*, *CDK8*, *OPTN* resultaron estar asociados con el “nucleoplasma” de la ontología de componente celular; en la ontología de procesos biológicos resaltó el proceso de “diferenciación celular”, donde se encontraron los genes *CSF2RB*, *TGFBR2*, *EPHA3*, *FER*, *CDK8*; en relación a la ontología de función molecular, la más sobresaliente fue la función de “unión de proteína” y se encontraron los genes *DAP3*, *CSF2RB*, *TAF15*, *TF6*, *DNM1*, *RB1*, *TGFBR2*, *LBX1*, *MRPL28*, *IL13*, *EPHA3*, *EPHX1*, *FER*, *FGF3*, *ERCC4*, *VTN*, *HR*, *SLC22A3*, *ANXA1*, *ZNF71*, *MTAP*, *CDK8*, *OPTN*, *INHA* (Figura 14/Anexo). Los genes que más se representaron en relación a las categorías de unión de proteínas, de diferenciación celular y de nucleoplasma, de las respectivas ontologías génicas fueron los siguientes:

EPHA3, *CDK8*. El algoritmo LifeMap detectó 7 genes abundante: *ANXA1*, *DAP3*, *EPHX1*, *MRPL28*, *OPTN*, *RB1*, *TAF15*. El algoritmo LifeMap identificó 7 genes como genes house keeping en humanos: *CDK8*, *DAP3*, *EPHX1*, *MRPL28*, *OPTN*, *TAF15*, *TFG*.

En el caso de los genes regulados positivamente por IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172, en el componente celular predominaron genes con funciones en el "citoplasma" como *RPS16*, *MAPRE1*, *MBD2*, *FUS*, *RPS3*, *SMAD3*, *SET*, *SUMO1*, *ARHGDI1B*, *TP53*, *HDAC1*, *CASP10*, *BMI1*, *PPIE*, *PTTG1IP*, *CASP8*, *ACO1*, *RPL22*, *CDC25A*, *MADD*, *CDH2*, *NDE1*, *SYT1*, *PRKCZ*, *USP32*, *TNFAIP3*, *RHOF*, *FMR1*, *VILL*, *GRB14*, *MLF1*, *POLB*. En procesos biológicos predominaron genes que codifican para "proteínas asociadas con procesos apoptóticos" como *AXL*, *RPS3*, *LCN2*, *TP53*, *CASP10*, *CASP8*, *MADD*, *TNFAIP3*, *POLB*. Sin embargo, también se observó un enriquecimiento para genes asociados a migración, ciclo celular, y diferenciación. Con relación a la función molecular se obtuvo un enriquecimiento en genes con función de "unión de proteína", por ejemplo, *AXL*, *C9*, *RPS16*, *MAPRE1*, *APOA1*, *MBD2*, *FUS*, *TFF1*, *EIF4B*, *RPS3*, *BCL7A*, *FZD4*, *SMAD3*, *TRPM1*, *SET*, *SUMO1*, *MXI1*, *LCN2*, *ARHGDI1B*, *TP53*, *ADRB2*, *RBL2*, *RRAS2*, *CTSO*, *HDAC1*, *CASP10*, *BMI1*, *PPIE*, *PILRA*, *PTTG1IP*, *CASP8*, *NR2F1*, *RNF139*, *SLC22A4*, *HFE*, *ACO1*, *HHAT*, *RPL22*, *CDC25A*, *MADD*, *GTF2F2*, *CDH2*, *LMO1*, *NDE1*, *SPP1*, *SYT1*, *PRKCZ*, *USP32*, *MLANA*, *TNFAIP3*, *FMR1*, *GRB14*, *MLF1*, *POLB* (Figura 15/Anexo). Los genes que más se representaron en relación a las categorías de unión de proteínas, de citoplasma y procesos apoptóticos de las respectivas ontologías génicas fueron los siguientes: *RPS3*, *TP53*, *CASP10*, *CASP8*, *MADD*, *TNFAIP3*, *POLB*. El algoritmo LifeMap identificó 10 genes como genes abundantes: *BMI1*, *CDH2*, *FMR1*, *FUS*, *HDAC1*, *MBD2*, *PRKCZ* Y *RBL2*, *SET*, *SUMO1*. El algoritmo LifeMap destacó 18 genes como genes house keeping en humanos: *ACO1*, *BMI1*, *CTSO*, *EIF4B*, *FUS*, *FZD4*, *GTF2F2*, *MADD*, *MAPRE1*, *MBD2*, *MXI1*, *PPIE*, *PTTG1IP*, *RPL22*, *RPS16*, *RPS3*, *SET*, *SUMO1*.

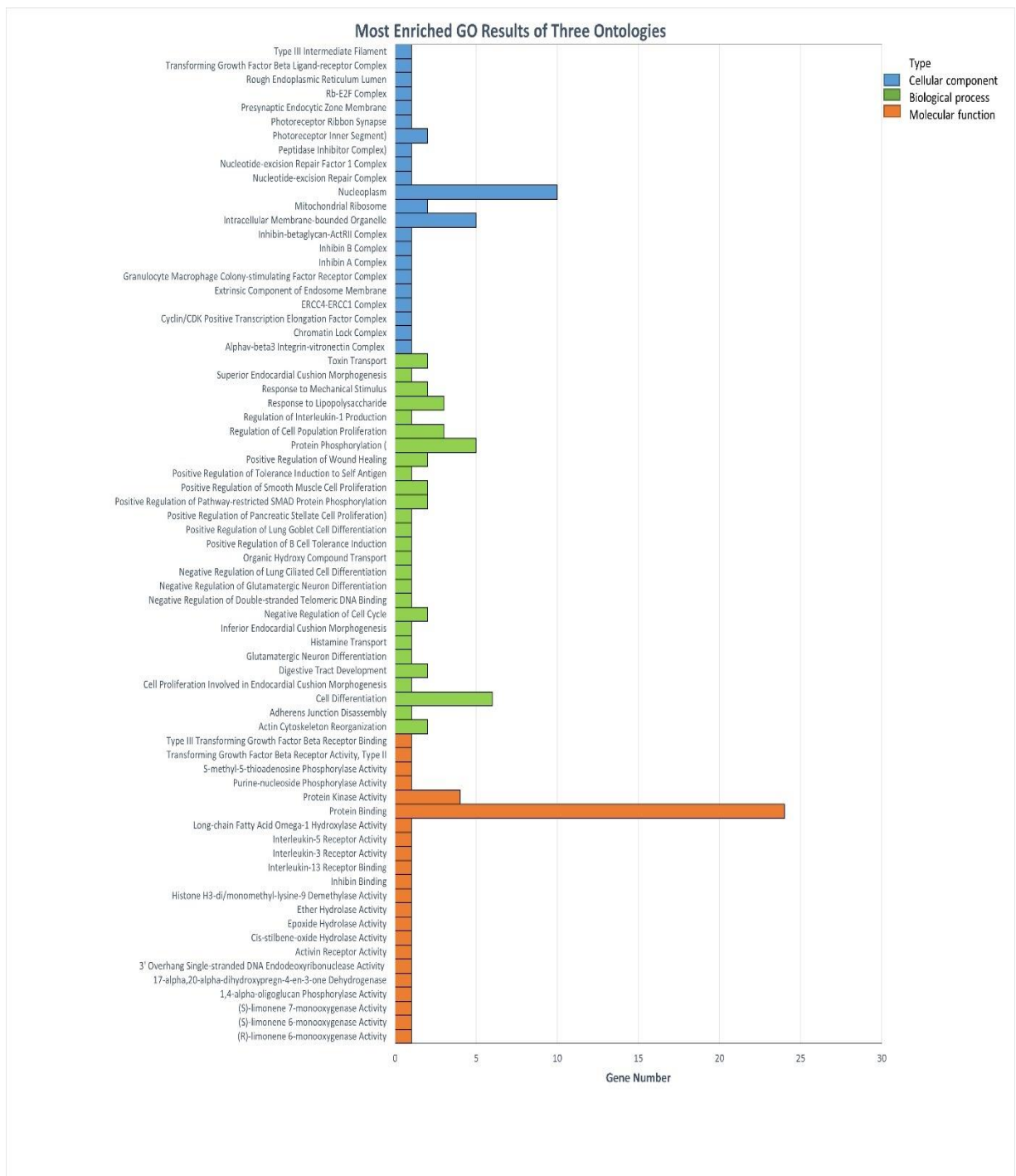


Figura 14. Análisis ontológico de los genes reprimidos por IFN- γ en células de glioblastoma A-172. El análisis GO de GeneCards mostró tres ontologías las cuales fueron: función molecular, procesos biológicos y componente celular. En la ontología de función molecular destacaron genes asociados a proteína de unión con el mayor número de genes (*DAP3*, *CSF2RB*, *TAF15*, *TF6*, *DNM1*, *RB1*, *TGFBR2*, *LBX1*, *MRPL28*, *IL13*, *EPHA3*, *EPHX1*, *FER*, *FGF3*, *ERCC4*, *VTN*, *HR*, *SLC22A3*, *ANXA1*, *ZNF71*, *MTAP*, *CDK8*, *OPTN*, *INHA*). En la ontología de procesos biológicos destacaron genes de diferenciación celular (*CSF2RB*, *TGFBR2*, *EPHA3*, *FER*, *CDK8*). Y en la ontología de componente celular destacaron genes de nucleoplasma (*DAP3*, *TAF13*, *RB1*, *EPHA3*, *ERCC4*, *HR*, *ANXA1*, *MTAP*, *CDK8*, *OPTN*).

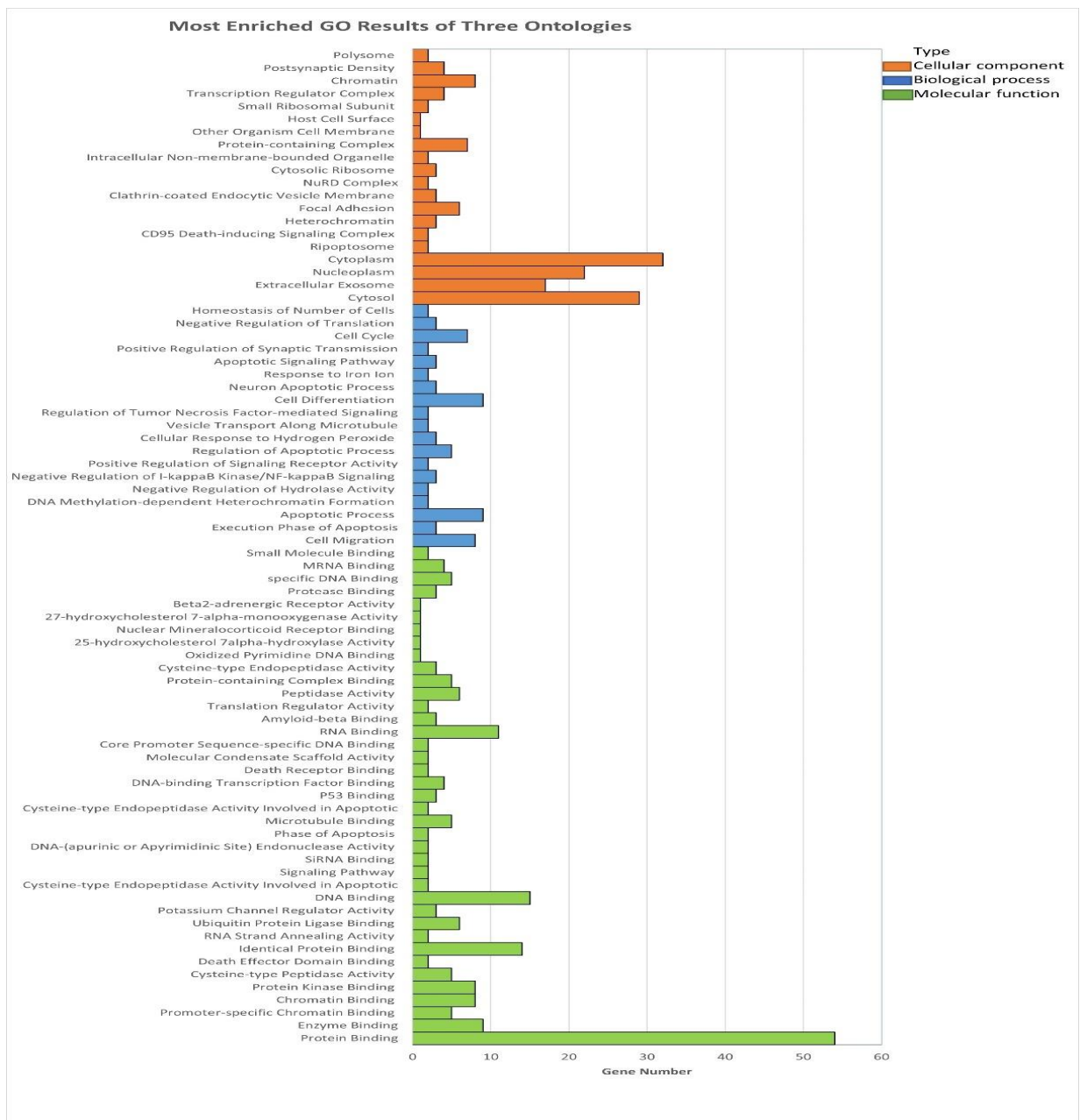
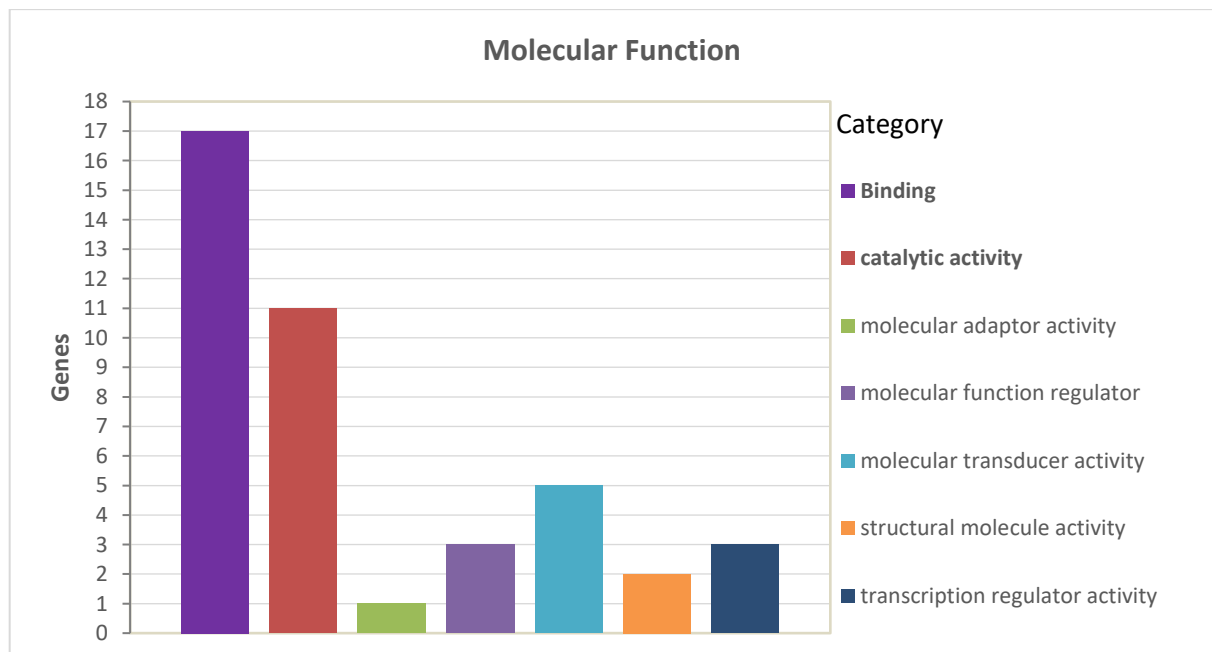


Figura 15. Análisis ontológico de los genes regulados positivamente por IFN- γ en células de glioblastoma A-172. El análisis GO de GeneCards mostró tres ontologías las cuales fueron: función molecular, procesos biológicos y componente celular. En la ontología de componente celular con funciones en el citoplasma destacaron los genes *RPS16*, *MAPRE1*, *MBD2*, *FUS*, *RPS3*, *SMAD3*, *SET*, *SUMO1*, *ARHGDI1*, *TP53*, *HDAC1*, *CASP10*, *BMI1*, *PPIE*, *PTTG1IP*, *CASP8*, *ACO1*, *RPL22*, *CDC25A*, *MADD*, *CDH2*, *NDE1*, *SYT1*, *PRKCZ*, *USP32*, *TNFAIP3*, *RHOF*, *FMR1*, *VILL*, *GRB14*, *MLF1*, *POLB*; en la ontología de procesos biológicos con funciones en procesos apoptóticos se expresaron los genes *AXL*, *RPS3*, *LCN2*, *TP53*, *CASP10*, *CASP8*, *MADD*, *TNFAIP3*, *POLB*; en relación a la función molecular con función de unión de proteína se expresaron los genes *AXL*, *C9*, *RPS16*, *MAPRE1*, *APOA1*, *MBD2*, *FUS*, *TFF1*, *EIF4B*, *RPS3*, *BCL7A*, *FZD4*, *SMAD3*, *TRPM1*, *SET*, *SUMO1*, *MXI1*, *LCN2*, *ARHGDI1*, *TP53*, *ADRB2*, *RBL2*, *RRAS2*, *CTSO*, *HDAC1*, *CASP10*, *BMI1*, *PPIE*, *PILRA*, *PTTG1IP*, *CASP8*, *NR2F1*, *RNF139*, *SLC22A4*, *HFE*, *ACO1*, *HHAT*, *RPL22*, *CDC25A*, *MADD*, *GTF2F2*, *CDH2*, *LMO1*, *NDE1*, *SPP1*, *SYT1*, *PRKCZ*, *USP32*, *MLANA*, *TNFAIP3*, *FMR1*, *GRB14*, *MLF1*, *POLB*.

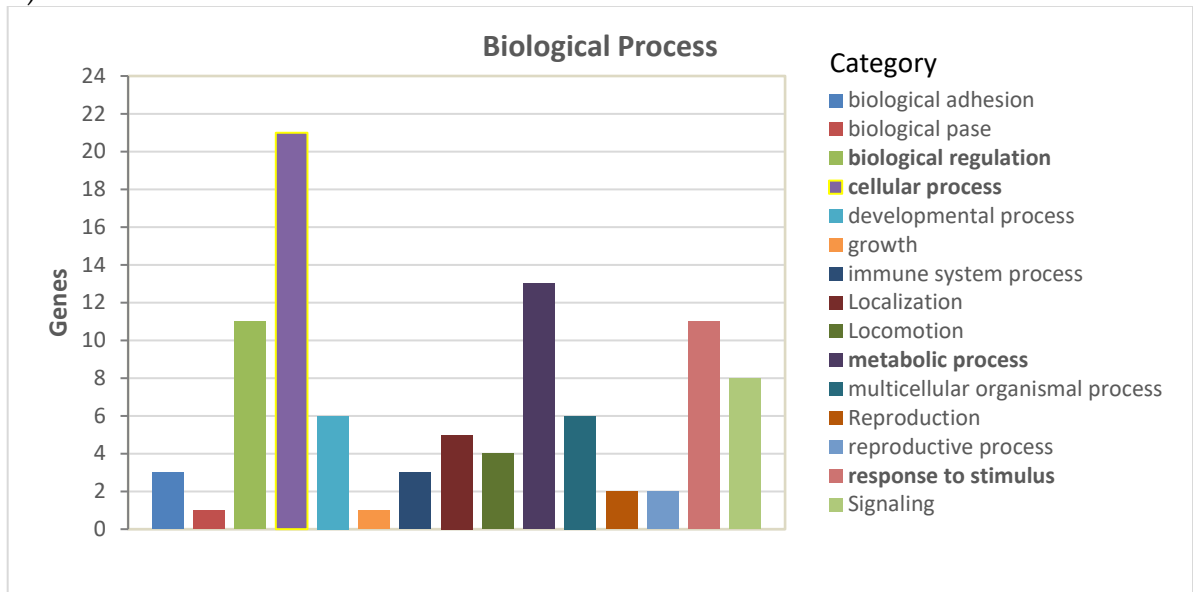
8.3.2 Genes modulados por IFN- γ en células de glioblastoma A-172 analizados por Panther.

Se realizó un estudio de diferentes ontologías usando particularmente la base de datos *Gen Ontology Panther* para analizar la relación de los genes regulados negativamente por IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172. En la ontología de función molecular destacó la de “unión” en la cual se encontraron los siguientes genes: *RB1*, *CSF2RB*, *TGFBR2*, *DNM1*, *ZNF71*, *TAF15*, *HR*, *CDK8*, *FGF3*, *ERCC4*, *OPTN*, *INHA*, *ANXA1*, *DAP3*, *VTN*. En relación con la ontología de procesos biológicos destacó la función de “procesos celulares” en la cual se encontraron los siguientes genes: *RB1*, *CSF2RB*, *EPHX1*, *TGFBR2*, *TFG*, *ARMET*, *CYP2C19*, *TAF15*, *ZNF71*, *HR*, *CDK8*, *FGF3*, *ERCC4*, *OPTN*, *INHA*, *EPHA3*, *ANXA1*, *FER*, *DAP3*, *MTAP*, *VTN*. Con relación a la ontología de componente celular destacaron genes que codifican a proteínas asociadas a la “membrana”, como: *CSF2RB*, *TGFBR2*, *DNM1*, *TFG*, *ARMET*, *CYP2C19*, *DAP3*, *ZNF71*, *TAF15*, *HR*, *CDK8*, *ERCC4*, *OPTN*, *EPHA3*, *ANXA1*. Los genes que más se representaron en relación a las categorías de unión de proteínas, procesos celulares y de membrana fueron los siguientes: *CSF2RB*, *TGFBR2*, *DAP3*, *ZNF71*, *TAF15*, *HR*, *CDK8*, *ERCC4*, *OPTN*, *ANXA1*. En la Figura 16. A, B, C, se muestran los resultados obtenidos de Panther de las diferentes clasificaciones ontológicas.

A)



B)



C)

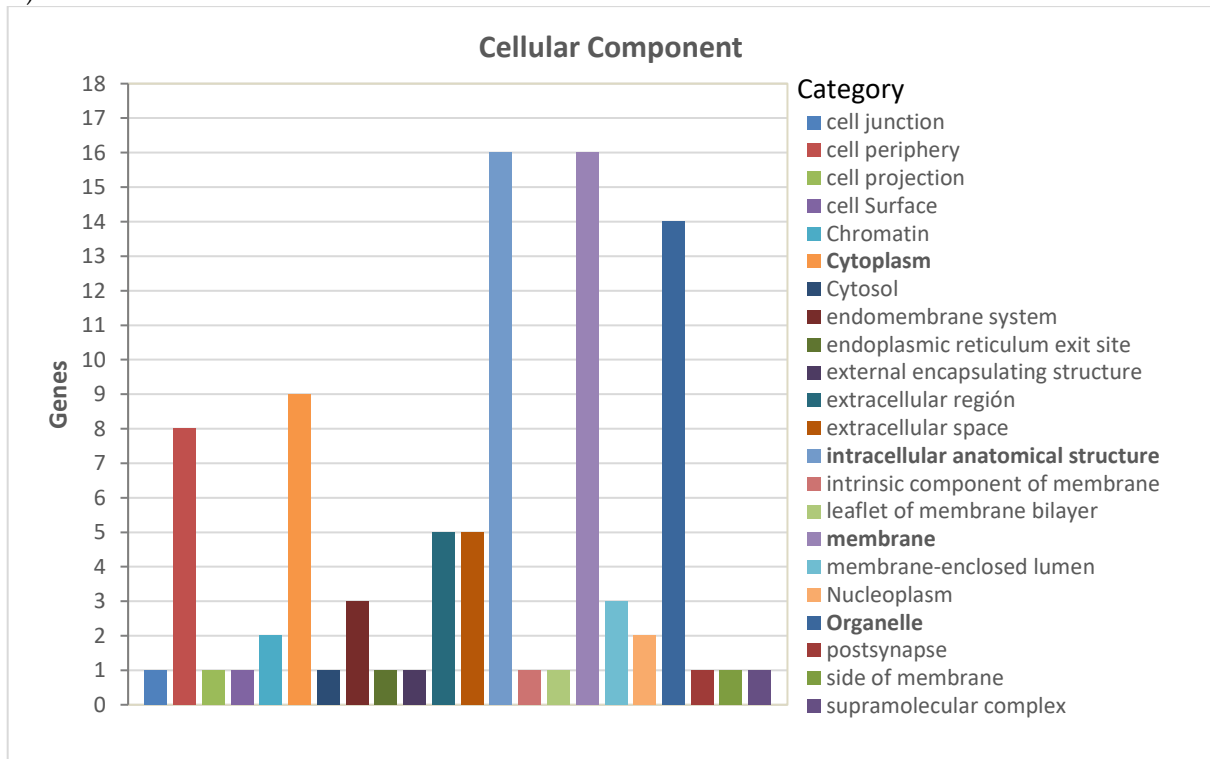
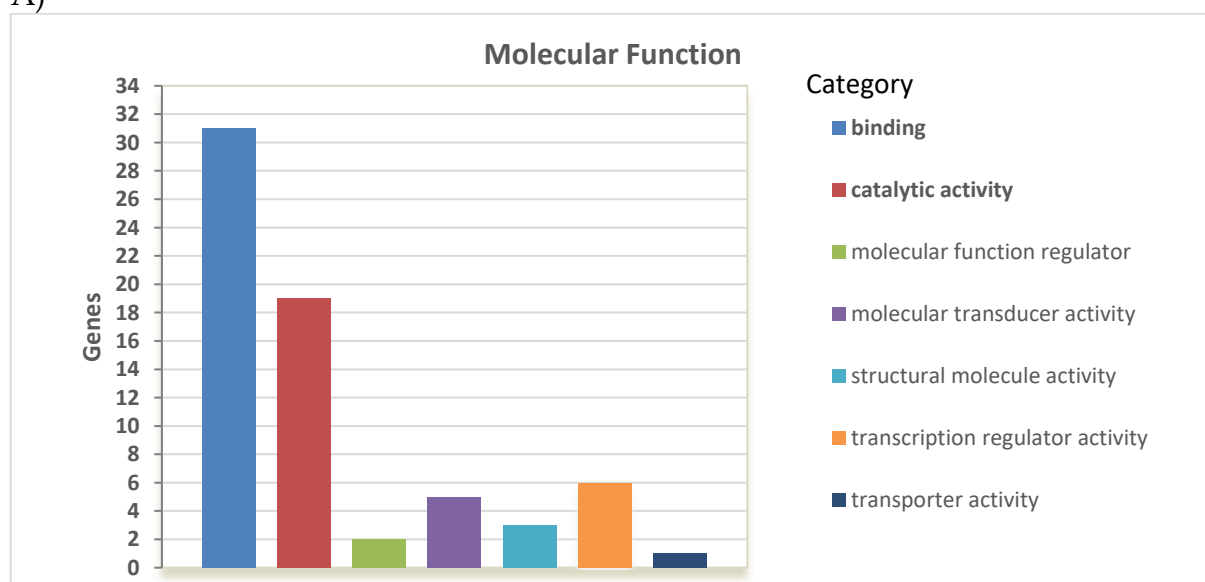


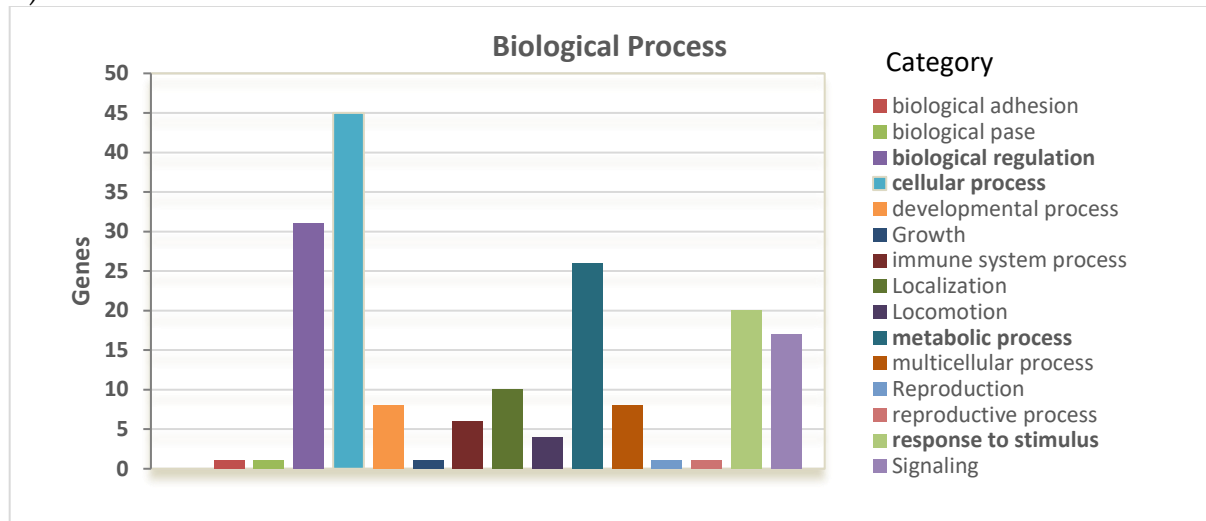
Figura 16. Análisis de ontología génica usando la base de datos GO Panther. A) En la ontología de función molecular destacó la de unión molecular en la cual se encontraron los siguientes genes: *RB1, CSF2RB, TGFBR2, DNM1, CYP2C19, TAF12, ZNF71, TAF15, HR, CDK8, FGF3, ERCC4, OPTN, INHA, ANXA1, DAP3, VTN*. **B)** En la Ontología de procesos biológicos destaco la función de procesos celulares en la cual se encontraron los siguientes genes: *RB1, CSF2RB, EPHX1, TGFBR2, TFG, ARMET, CYP2C19, TAF15, ZNF71, HR, CDK8, FGF3, ERCC4, OPTN, INHA, EPHA3, ANXA1, FER, DAP3, MTAP, VTN*. **C)** En la Ontología de componente celular destacó la categoría de membrana con los siguientes genes: *CSF2RB, TGFBR2, DNM1, TFG, ARMET, CYP2C19, TAF15, DAP3, ZNF71, TAF15, HR, CDK8, ERCC4, OPTN, EPHA3, ANXA1*.

A través de la base de datos *Gen Ontology Panther* se analizó la relación de los genes sobreexpresados por IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172. En la ontología de función molecular con la función de “unión” se encontraron los siguientes genes: *CDH2, BMI1, ARHGDIB, RHOF, RPS16, LMO1, SMAD3, NDE1, FZD4, VILL, RPL22, MXI1, ACO1, CASP10, SET, ADRB2, NBS1, RBL2, MAPRE1, SYT1, NR2F1, SUMO1, TP53, FUS, CASP8, RRAS2, TNFAIP3, FMR1, PILRA, MADD*. En relación con la ontología de procesos biológicos destacó la función de “procesos celulares” en la cual se encontraron los siguientes genes: *CDH2, BMI1, ADAMTS6, ARHGDIB, RHOF, RPS16, HHAT, AXL, LMO1, GPR19, SMAD3, POLB, NDE1, FZD4, VILL, GTF2F2, CTSO, CDC25A, PRKCZ, RPL22, MXI1, ACO1, RPS3, CYP7B1, CASP10, ADRB2, NBS1, RBL2, MAPRE1, SYT1*. En relación con la ontología de componente celular, en la categoría de “membrana” se encontraron los siguientes genes: *CDH2, IMC1, ARHGDIB, HAT, AXL, LMO1, GPR19, SMAD3, POLB, PPIE, FZD4, GTF2F2, CTSO, CASP10, CDC25A, ACO1, RPS3, SET, ADRB2, NBS1, SYT1, RNF139, PTTG1IP, SUMO1, FUS, RRAS2, TNFAIP3, FMR1, GRB14*. Los genes que más se representaron en relación a las categorías de unión de proteínas, procesos celulares y de membrana fueron los siguientes: *CDH2, ARHGDIB, LMO1, SMAD3, FZD4, ACO1, CASP10, ADRB2, NBS1, SYT1*. En la Figura 17. A, B, C, se muestran los resultados obtenidos de Panther de las diferentes clasificaciones ontológicas.

A)



B)



C)

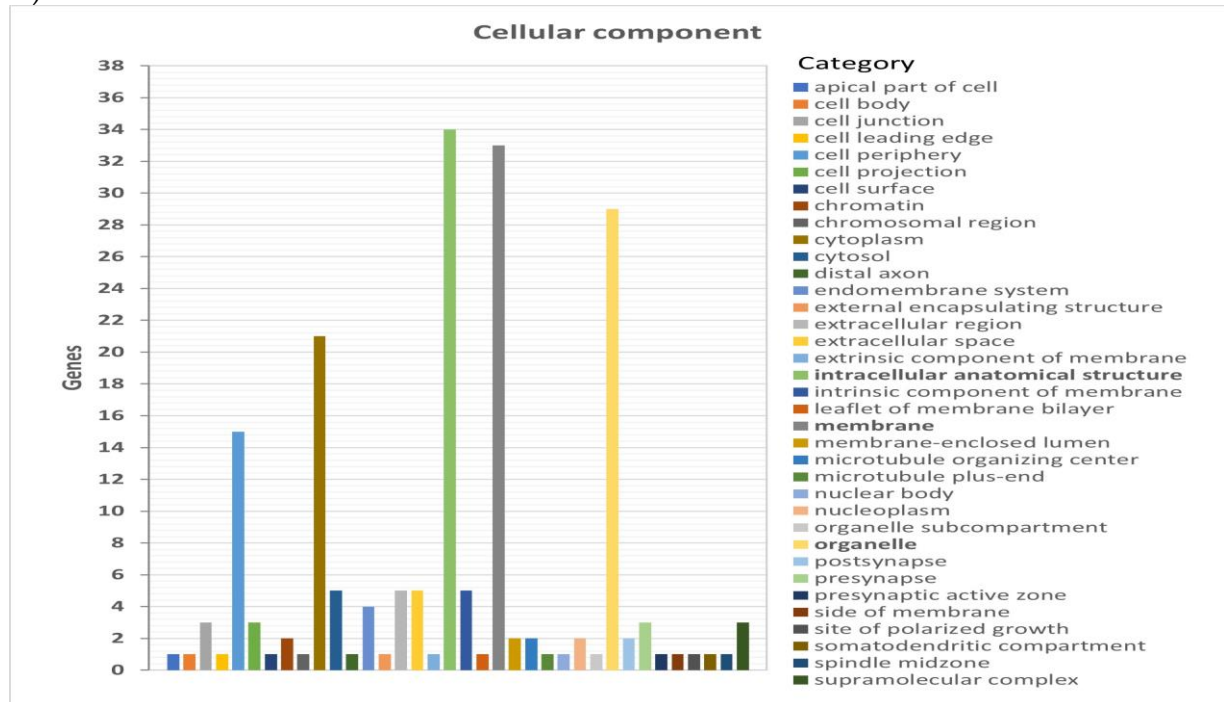


Figura 17. Análisis de ontología génica usando la base de datos GO Panther A) En la ontología de función molecular con la función de unión se encontraron los siguientes genes: *CDH2, BMI1, ARHGDI3, RHOF, RPS16, LMO1, SMAD3, NDE1, FZD4, VILL, RPL22, MXI1, ACO1, CASP10, SET, ADRB2, NBS1, RBL2, MAPRE1, SYT1, NR2F1, SUMO1, TP53, FUS, CASP8, RRAS2, TNFAIP3, FMR1, PILRA, MADD*. B) En la ontología de procesos biológicos destacó la función de procesos celulares en la cual se encontraron los siguientes genes: *CDH2, BMI1, ADAMTS6, ARHGDI3, RHOF, RPS16, HHAT, AXL, LMO1, GPR19, SMAD3, POLB, NDE1, FZD4, VILL, GTF2F2, CTSO, CDC25A, PRKCZ, RPL22, MXI1, ACO1, RPS3, CYP7B1, CASP10, ADRB2, NBS1, RBL2, MAPRE1, SYT1*. C) En la ontología de componente celular destacó la categoría de membrana con los siguientes genes: *CDH2, IMC1, ARHGDI3, HAT, AXL, LMO1, GPR19, SMAD3, POLB, PPIE, FZD4, GTF2F2, CTSO, CASP10, CDC25A, ACO1, RP53, SET, ADRB2, NBS1, SYT1, RNF139, PTTG1IP, SUMO1, FUS, RRAS2, TNFAIP3, FMR1, GRB14*.

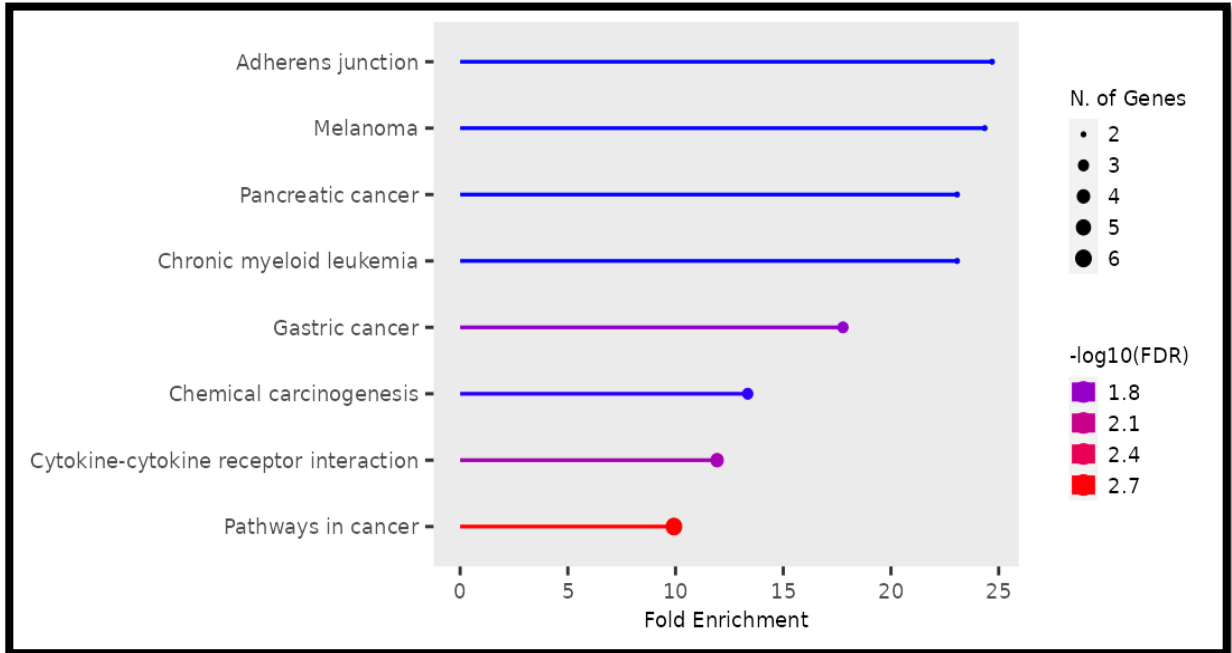
En conjunto, estos resultados obtenidos de GeneCards/GeneAnalytics y Panther muestran que los DEG modulados por IFN- γ tienen una diferente distribución subcelular, incluyendo en exosomas, y que están asociados con funciones moleculares de cinasas, unión a proteína, DNA y RNA y con procesos que pueden promover, pero también inhibir la progresión tumoral, tales como apoptosis, diferenciación, ciclo celular, y migración. Por lo tanto, de acuerdo a los DEG modulados por IFN- γ se podría sugerir un papel dual de esta vía de señalización en el glioblastoma.

8.3.3 Análisis de los genes modulados por IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172 por ShinyGO

A través del programa ShinyGO se realizó un análisis *in silico* de enriquecimiento de los genes regulados por IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172. Este programa considera el FDR (por su nombre en inglés, *false discovery rate*), la cual es una medida que permite determinar el mayor número de genes que presenten verdaderamente una expresión diferencial con la menor cantidad de falsos positivos. También este programa considera el “*fold enrichment*” que hace referencia al porcentaje de genes del análisis en cuestión, que están asociados con una ruta molecular, dividido entre el porcentaje de dichos genes contenidos en bases de datos de ontogenia. Por lo tanto, el *fold enrichment* señala la sobrerrepresentación o enriquecimiento de los genes en una determinada vía molecular.

De acuerdo con este análisis, las vías de enriquecimiento de genes que fueron estimulados negativamente por IFN- γ en glioblastoma fueron las que involucran la interacción de citocinas con sus receptores específicos, y las vías de señalización en cáncer, incluyendo genes vinculados con cáncer gástrico, melanoma, páncreas y leucemia. En cuanto a los genes que fueron sobreexpresados por IFN- γ en glioblastoma, se sobrerrepresentaron más vías las cuales fueron: ciclo celular, apoptosis, desregulación transcripcional, senescencia, microRNAs, proteoglicanos, carcinogénesis viral, y otros genes asociados con infecciones virales (Figura 18. A, B).

A)



B)

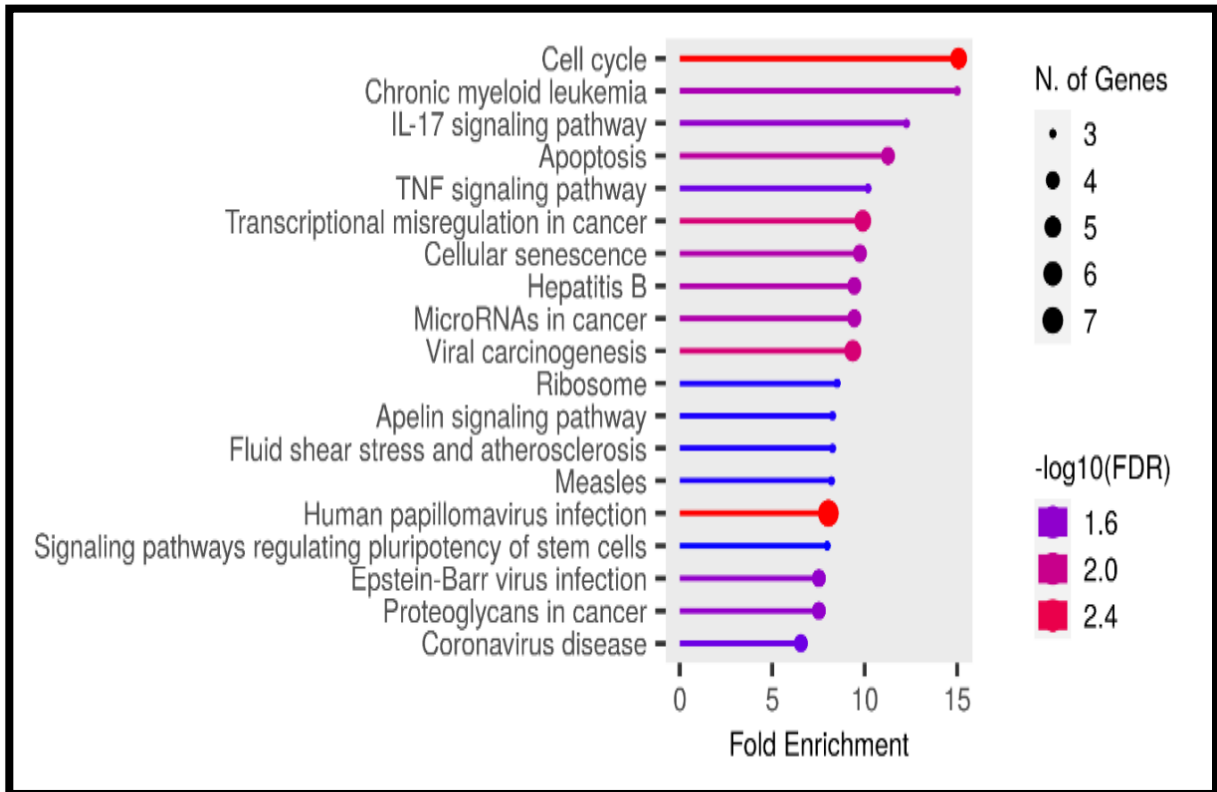
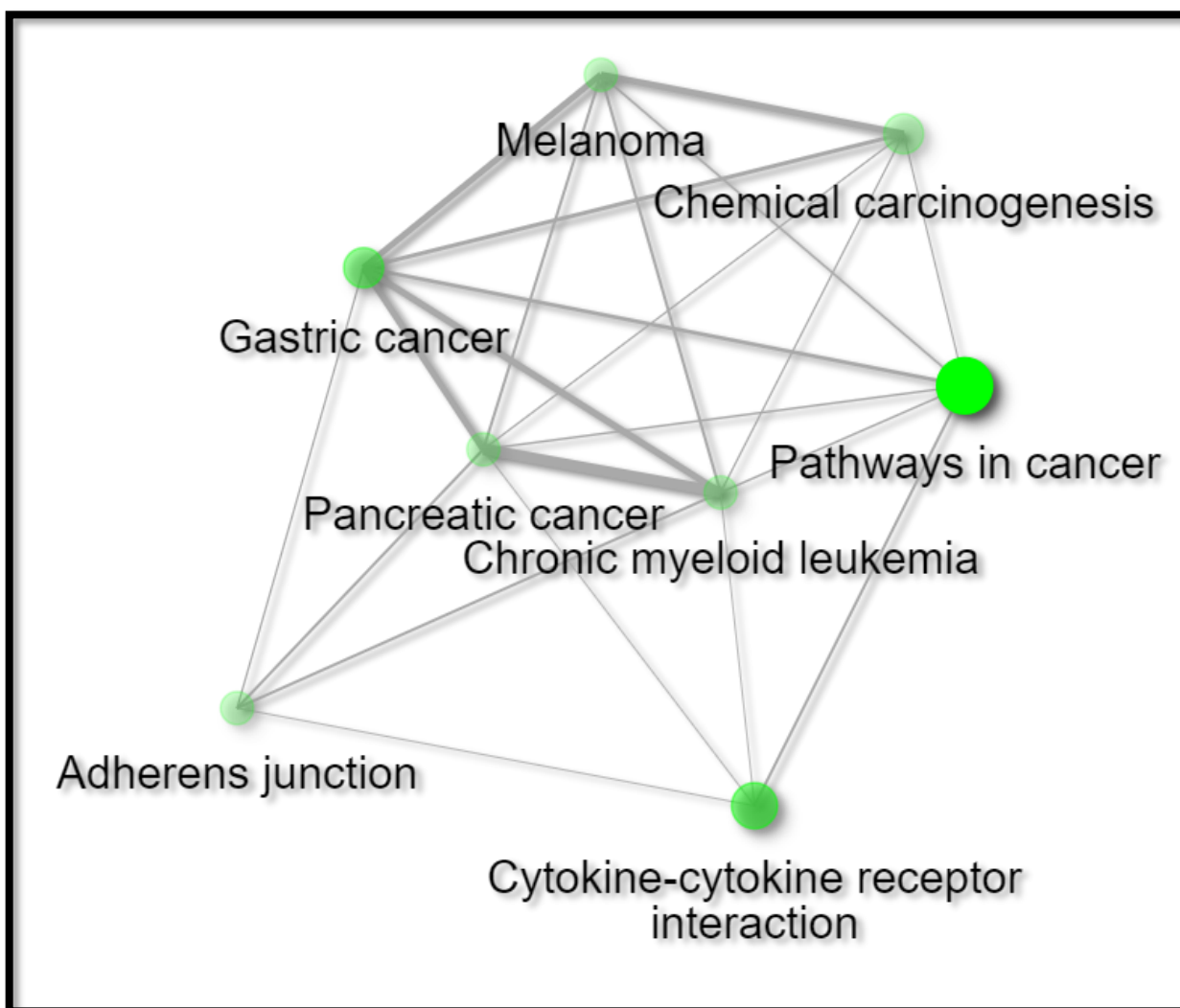


Figura 18. Análisis de enriquecimiento de los DEG por IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172, obtenidos por el programa de ShinyGO. A) Diferentes vías de enriquecimiento de genes que fueron estimulados negativamente por IFN- γ en glioblastoma, destacando la vía de cancer con 6 genes. B) Vías de enriquecimiento de genes que fueron sobreexpresados por IFN- γ en glioblastoma, destacando la vía de ciclo celular con 5 genes.

Los resultados de enriquecimiento de los DEG obtenidos del programa de ShinyGO también se representaron mediante interactomas. En estos diagramas se analizó la red de interconexión de las diferentes vías moleculares asociadas a los genes modulados diferencialmente por IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172. Estas gráficas muestran la relación entre las rutas enriquecidas, bajo el criterio de que dos vías (nodos) están conectadas si comparten un 20 % o más genes. Los nodos presentan características de intensidad de color y tamaño, siendo los más oscuros conjuntos de genes más significativamente enriquecidos. Los nodos más grandes representan conjuntos más grandes de genes. En cuanto a los bordes, mientras más grosor se representan genes más superpuestos (Figura 19. A, B).

A)



B)

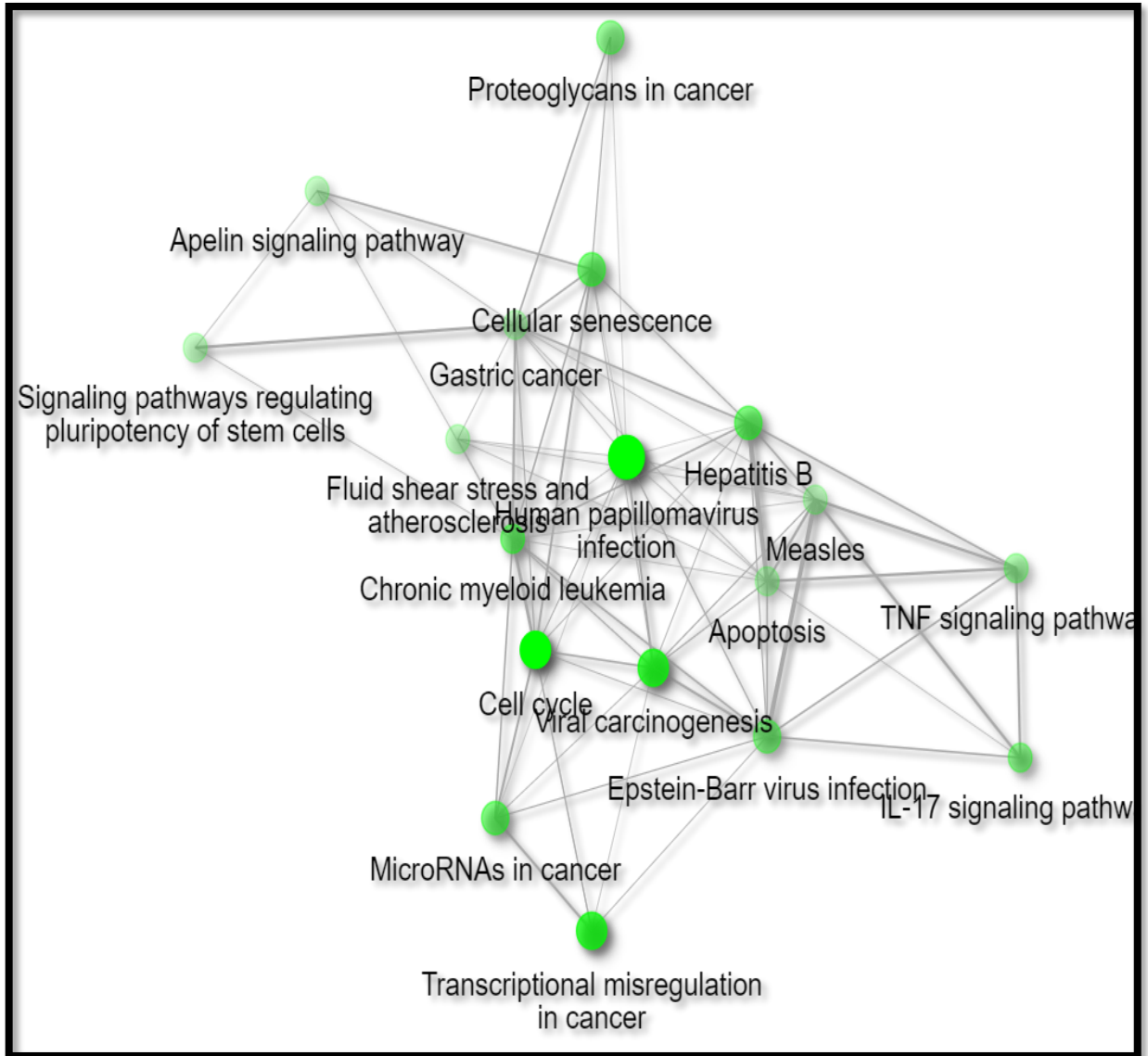
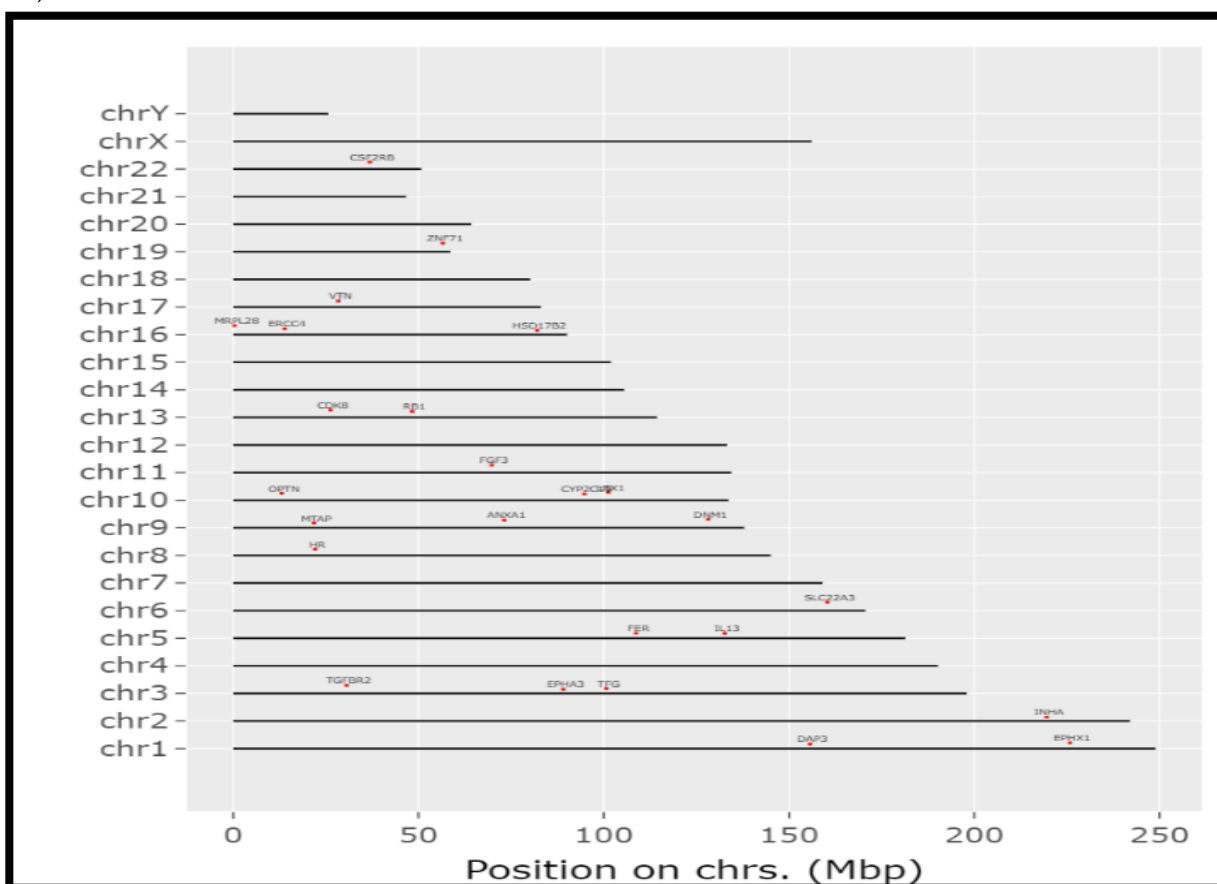


Figura 19. Interactomas de los DEG por IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172, usando el programa de ShinyGO. A) Interactomas de genes regulados negativamente por IFN- γ . B) Red de interactomas de las diferentes vías por medio de nodos de los genes que fueron modulados positivamente por IFN- γ en glioblastoma.

Por lo tanto, el análisis de enriquecimiento corroboró que los DEG por el estímulo del IFN- γ en células de glioblastoma A-172 se relacionan con vías moleculares antitumorales, pero también protumorales.

A través del programa ShinyGO también se observaron los diferentes cromosomas que contienen los DEG en respuesta al IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172. Los genes reprimidos por IFN- γ se localizaron distribuidos en el genoma, con acumulación de al menos tres de ellos en los cromosomas 16 (*MRPL*, *ERCC4* y *HSD17B2*), en el cromosoma 10 (*OPTN*, *CYP2C19* y *LBX1*), en el cromosoma 9 (*MTA*, *ANXA1* y *DNM1*), y en el cromosoma 3 (*TGFBR2*, *EPHA3* y *TFG*) (Figura 20. A). De manera similar, los genes sobreexpresados por IFN- γ en glioblastoma, se localizaron distribuidos en el genoma, presentándose hasta cuatro o cinco de ellos. Por ejemplo, en el cromosoma 12 (*GPR19*, *ARHGDIB*, *EIF4B*, *SYT1* y *RHOV*), en el cromosoma 11 (*LMO1*, *RRAS2*, *MADD*, *RPS3*, *FZD4M* y *APOA1*), en el cromosoma 9 (*MLANA*, *ACO1*, *LCN2* y *SET*), en el cromosoma 5 (*C9*, *ADAMTS6*, *NR2F1*, *SLC22A4* y *ADRB2*) y en el cromosoma 1 (*PRKCZ*, *RPL22*, *HDAC1* y *PPIE*) (Figura 20. B). Estos datos señalan que la señalización del IFN- γ tiene un impacto sobre el transcriptoma de células de glioblastoma, modulando la expresión de genes distribuidos en el genoma.

A)



B)

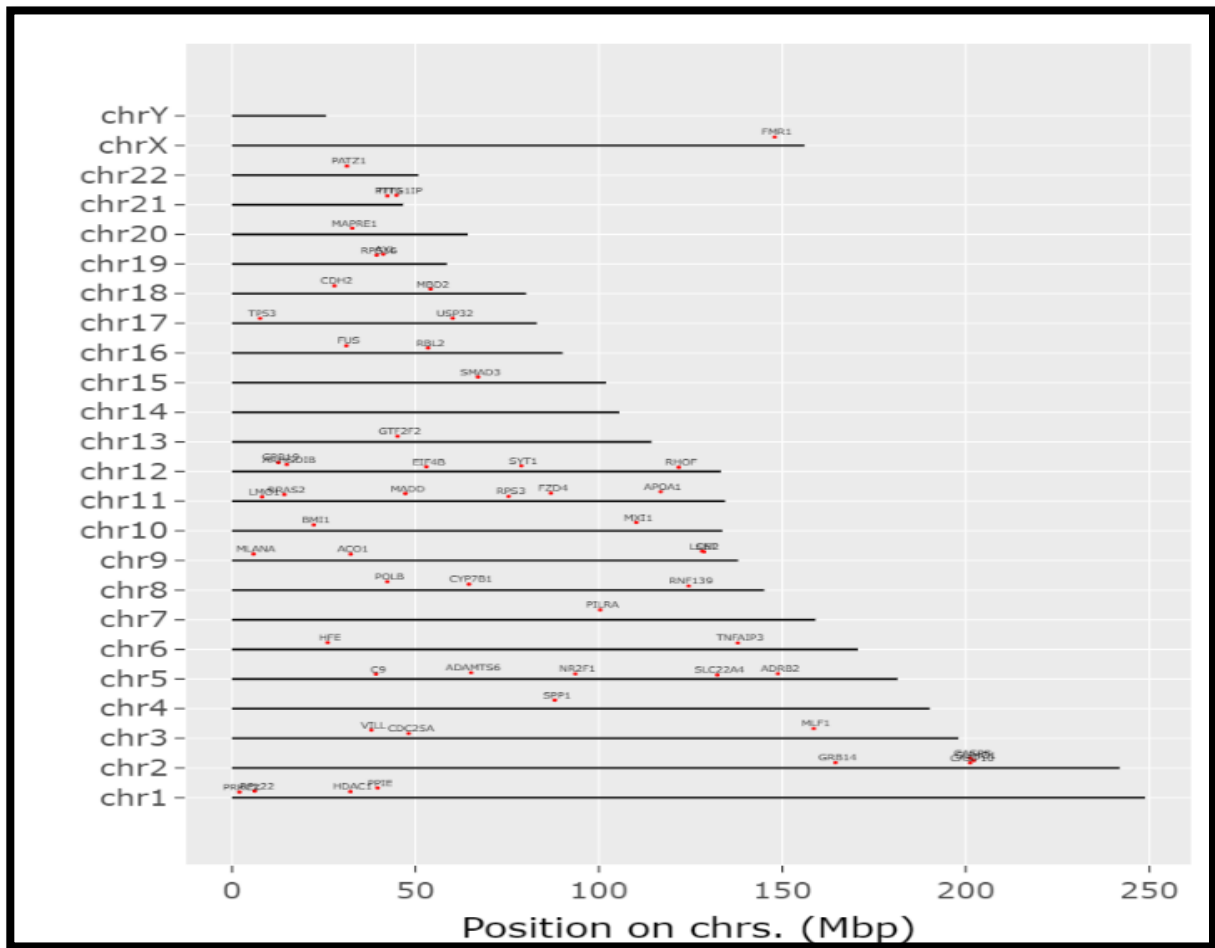


Figura 21. Análisis de la distribución de genes en el genoma, utilizando el programa de ShinyGO. A) Análisis de la distribución de los genes regulados negativamente por IFN- γ en células de glioblastoma A-172 en los diferentes cromosomas. B) Análisis de la distribución de los genes sobreexpresados por IFN- γ en células de glioblastoma en los diferentes cromosomas.

B)

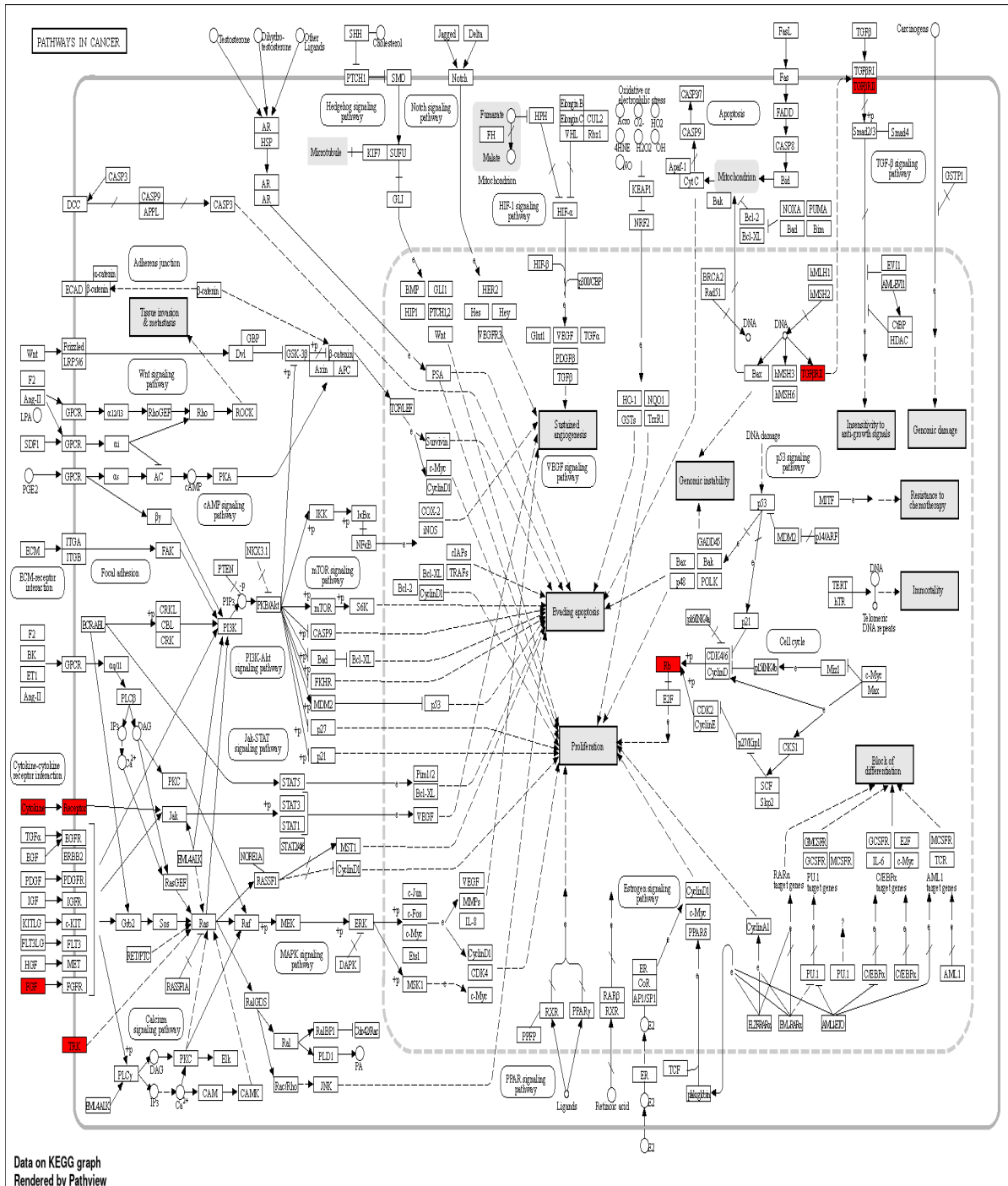
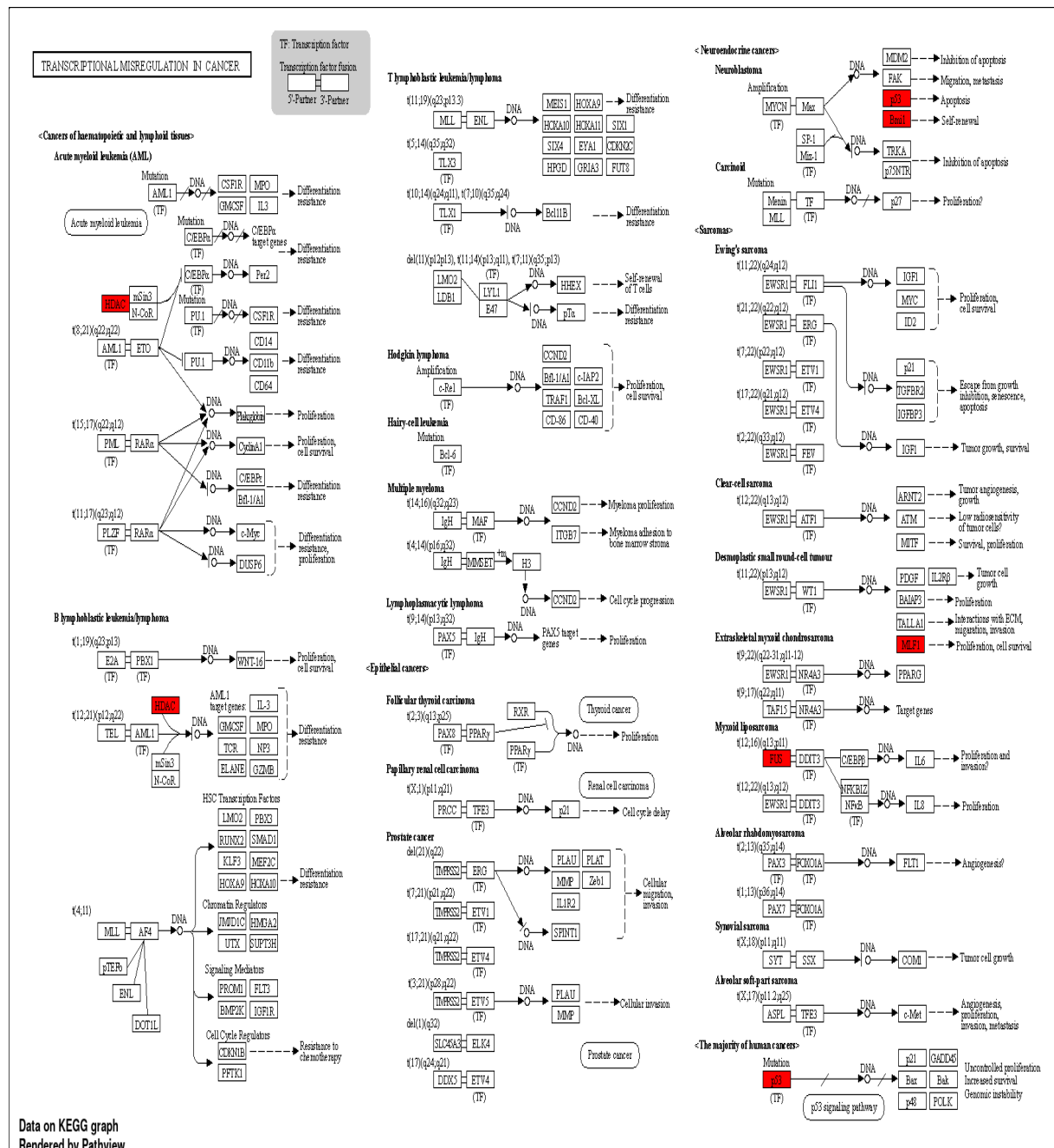


Figura 22. Vías de señalización KEEG, asociados al receptor de interacción citocina-citocina y a cáncer, utilizando el programa de ShinyGO. A) Los genes que fueron modulados negativamente por IFN- γ en células de glioblastoma A-172, asociados a las vías de Receptor de interacción citocina-citocina fueron los siguientes: CSF2RB, INHA, TGFBR2, IL13. B) Los genes que fueron reprimidos por IFN- γ en células de glioblastoma A-172, asociados a las vías en cáncer fueron los siguientes: CSF2RB, TFG, RB1, TGFBR2, IL13, FGF3.

Además, de acuerdo con KEGG, principalmente, los genes sobreexpresados por IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172, están asociados con: disregulación transcripcional en cáncer (*FUS*, *HDAC1*, *TP53*, *BMI1*, *MLF1*), procesos de ciclo celular (*RBL2*, *HDAC1*, *TP53*, *CDC25A*, *SMAD3*), (Figura 22 A, B,) senescencia (*RBL2*, *RRAS2*, *TP53*, *SMAD3*) y rutas vinculadas a proteoglicanos (*EIF4B*, *RRAS2*, *TP53*, *FZD4*) (Figura 23. C,D).

A)



B)

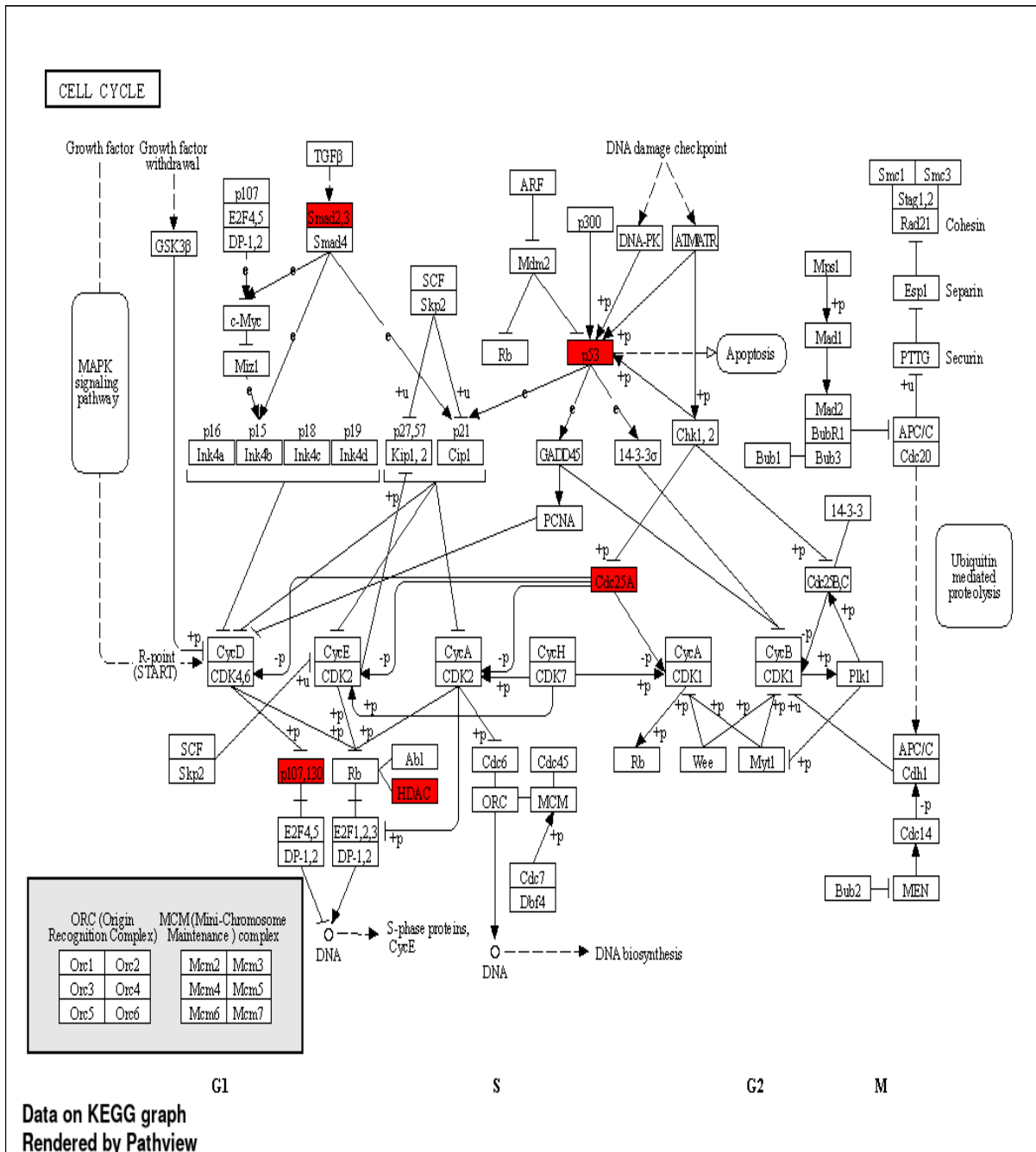
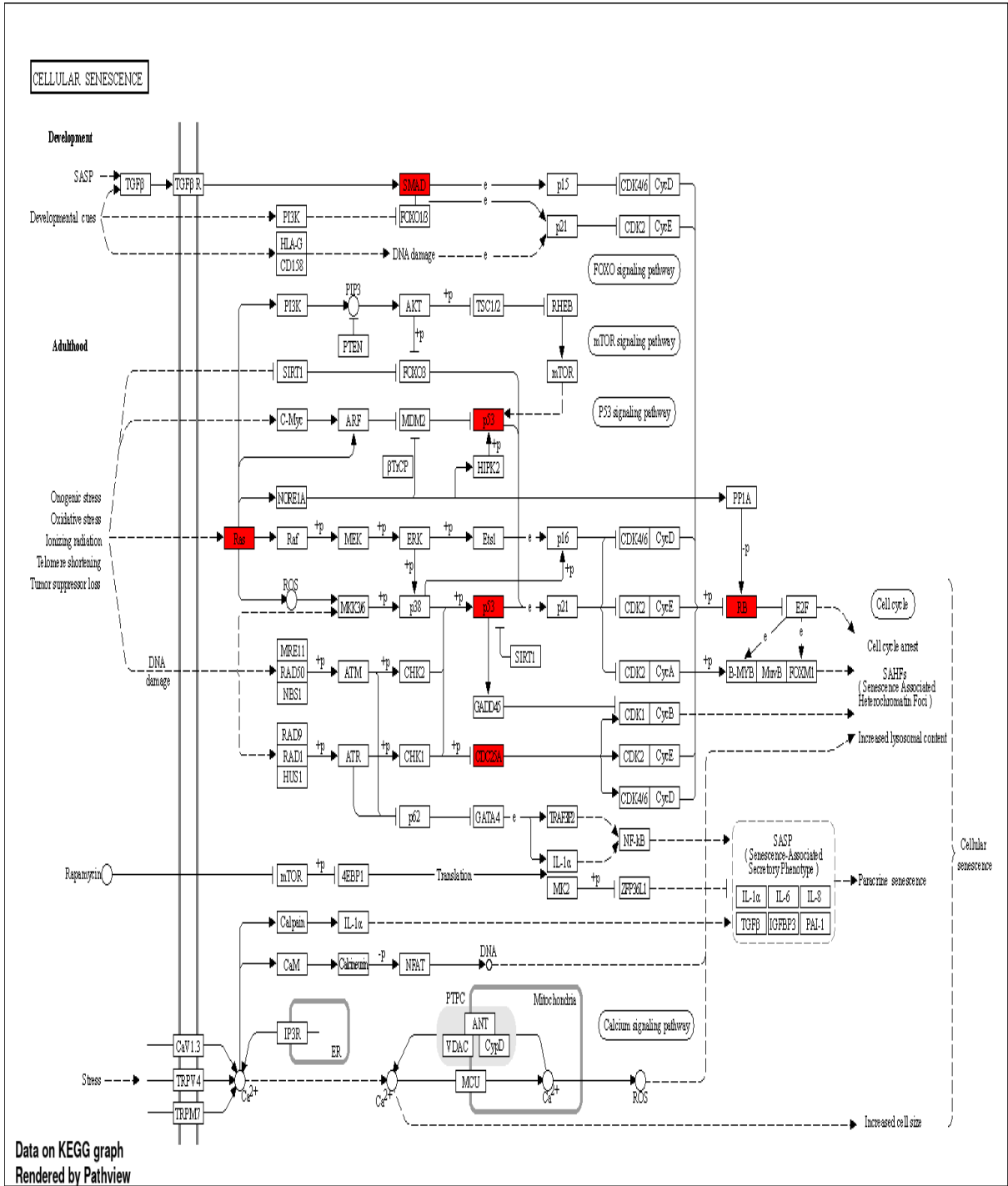


Figura 23. Vías de señalización KEGG, asociados al ciclo celular y a la desregulación transcripcional en cáncer, usando el programa de ShinyGO. A) Los genes que son modulados positivamente por IFN- γ en células de glioblastoma A-172, asociados a las vías de desregulación transcripcional en cáncer fueron los siguientes: *FUS*, *HDAC1*, *TP53*, *BMI1*, *MLF1*. B) Los genes que fueron sobreexpresados por IFN- γ en células de glioblastoma A-172, asociados a la vía de ciclo celular fueron los siguientes: *RBL2*, *HDAC1*, *TP53*, *CDC25A*, *SMAD3*.

C)



D)

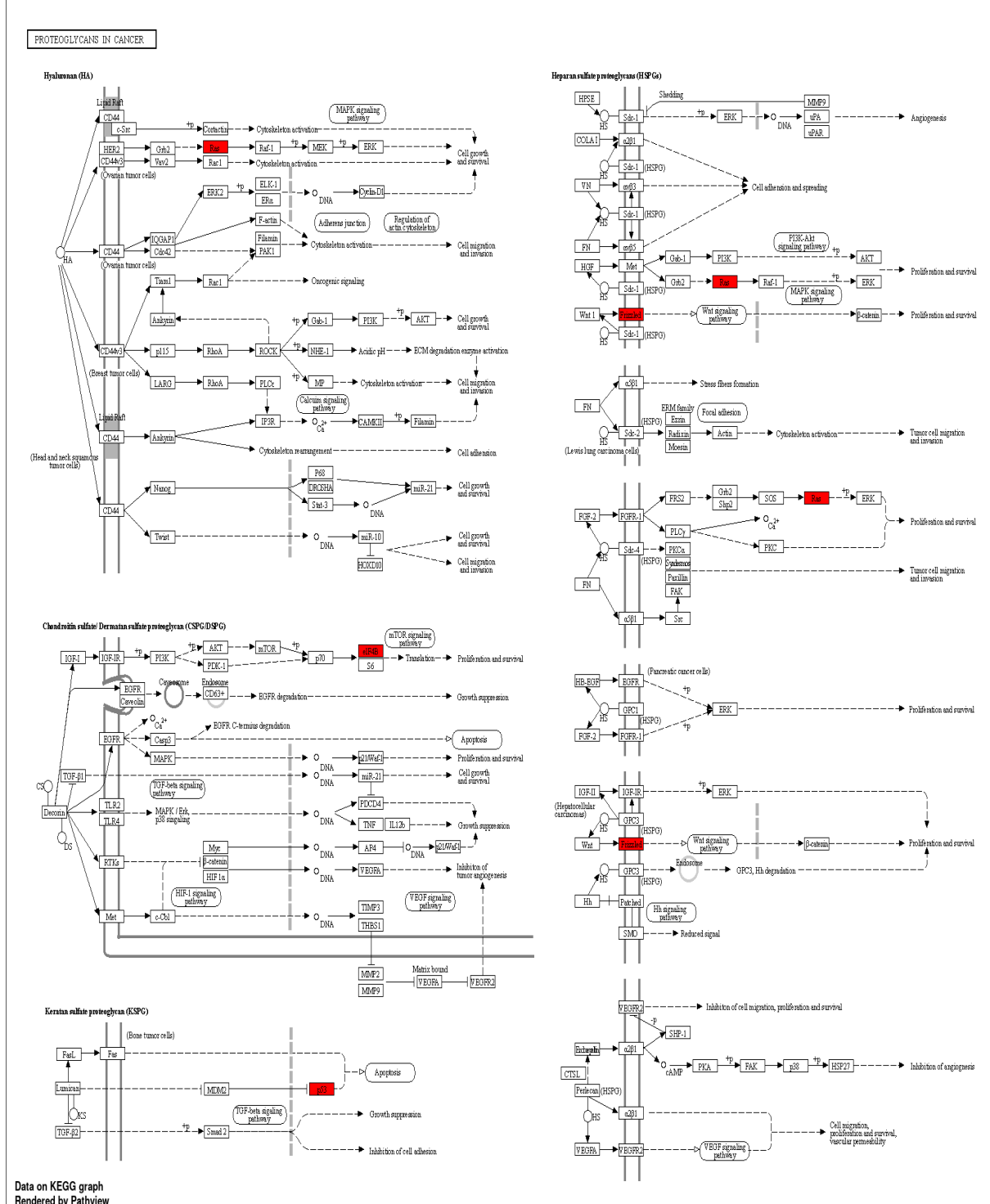


Figura 24. Vías de señalización KEGG, asociados a la senescencia celular y a la proteoglicanos en cáncer, usando el programa de ShinyGO. C) Los genes que fueron modulados positivamente por IFN- γ en células de glioblastoma A-172, asociados a las vía de senescencia celular fueron los siguientes: *RBL2*, *RRAS2*, *TP53*, *SMAD3*. D) Los genes que fueron sobreexpresados por IFN- γ en células de glioblastoma A-172, asociados a las vía de proteoglicanos en cáncer fueron los siguientes: *EIF4B*, *RRAS2*, *TP53*, *FZD4*.

9. Discusión

La señalización del IFN- γ se ha vinculado tanto con efectos pro-tumorigénicos como anti-tumorigénicos dependiendo del contexto celular, y no son claros los mecanismos implicados. El perfil de expresión génica modulado por el IFN- γ podría estar directamente involucrado con su actividad dual en los contextos de cáncer (Alspach *et al.*, 2019; Delgado, 2003). Sin embargo, el efecto de la vía de señalización del IFN- γ sobre el transcriptoma no se conoce completamente, dado que solamente la expresión de algunos genes se ha estudiado en diferentes tipos celulares.

Particularmente, en el contexto del SNC, en específico en tumores malignos como el glioblastoma, no se tiene mucha información al respecto. No obstante, se ha reportado que algunos genes pro-tumorigénicos como *CD274/PDL-1* e *IDO1*, implicados en la evasión del sistema inmune por parte del tumor, son sobreexpresados por IFN- γ en células de glioblastoma (Avril *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2022). Resultados de nuestro grupo de trabajo, han mostrado que el tratamiento con IFN- γ incrementa la migración celular sin afectar la viabilidad de las células de glioblastoma (Zamora, 2023). Basados en estos antecedentes, en este trabajo se identificaron genes modulados por la señal del IFN- γ en las células derivadas de glioblastoma A-172 y se analizaron *in silico* para proponer su posible implicación en el contexto del glioblastoma.

Como primer paso, se corroboró que el tratamiento con IFN- γ promoviera la fosforilación de STAT1 y su acumulación en el núcleo celular para efectuar su actividad como factor de transcripción. Este evento es importante en la ruta de señalización del IFN- γ para generar una respuesta celular tras el reconocimiento del IFN- γ por sus receptores, conduciendo a la activación de la cascada de señalización para llegar al núcleo y modular la expresión génica. Los resultados mostraron que las células derivadas de glioblastoma A-172 responden al estímulo del IFN- γ induciendo una acumulación de p-STAT1 en el núcleo celular. Este resultado fue importante para proseguir con el estudio del efecto de la acumulación nuclear de p-STAT1 sobre el perfil de expresión génica.

Para identificar genes regulados por IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172, se utilizó como estrategia un análisis de microarreglo de cDNA, diseñado para analizar específicamente 1920 genes asociados a cáncer. De esta manera se identificaron 92 DEG en respuesta al tratamiento con IFN- γ , dentro de los cuales, 29 genes fueron regulados negativamente, y 63 genes fueron regulados positivamente por el IFN- γ en células de glioblastoma A-172. Para entender la importancia funcional de estos genes modulados por IFN- γ en células de glioblastoma, se llevó a cabo un análisis *in silico* de ontología génica, considerando la función molecular, los procesos biológicos y el componente celular.

Nuestro análisis sugiere que la vía del IFN- γ puede inhibir la expresión de genes implicados en diferenciación y proliferación, que resultan importantes en la unión de proteínas y en la modificación de proteínas por fosforilación. En cambio, los genes sobreexpresados por IFN- γ se asocian con procesos biológicos de diferenciación y apoptosis, los cuales indican una función antitumoral; sin embargo, un número muy similar de genes sobreexpresados por IFN- γ están involucrados con el ciclo celular y la migración, indicando una acción protumoral. Estos resultados, señalan que algunos de los genes sobreexpresados por IFN- γ pueden generar proteínas con funciones inhibitoras de la progresión tumoral, pero otros podrían favorecerla, lo cual podría explicar su dualidad en el cáncer.

Al respecto, tres genes regulados por IFN- γ que sobresalieron forman parte de la familia de cinasas dependientes de ciclinas (CDK), caspasas (CASP) y cadherinas (CADH). Por ejemplo, la cinasa dependientes de ciclina 8 (CDK8) que fue regulada negativamente por IFN- γ . Las CDKs representan una familia de cinasas de serina/treonina con la función primaria de regular la progresión del ciclo celular. En algunos contextos como el cáncer colorrectal, la inhibición de CDK8 reduce la proliferación celular (Menzl *et al.*, 2019). En un estudio realizado por Hayashi *et al.*, en 2013 mostró que el flavopiridol, un inhibidor de las CDKs, en combinación con temozolomida, mejoró la citotoxicidad en una línea celular de glioblastoma y

sensibilizó a ratones xenoinjertados a la temozolomida (Lubanska y Porter, 2017). Por lo tanto, el gen *CDK8* podría ser uno de los blancos protumoral regulados negativamente por la señalización del IFN- γ .

De manera interesante, los genes que más destacaron que se modularon positivamente por IFN- γ fueron la caspasa 10 (*CASP10*) y la cadherina 2 (*CDH2*). Las caspasas son una familia de cisteína proteasas que desempeñan un papel importante en la apoptosis. Se ha reportado que la inhibición de la *CASP10* reduce la apoptosis de células de meduloblastoma y glioblastoma (Wybranska *et al.*, 2013), mientras que su expresión y actividad aumentan en condiciones de estrés metabólico de manera dependiente de p53 (Kumari *et al.*, 2019). En nuestra investigación la expresión del gen *CASP10* fue regulado positivamente por IFN- γ en células de glioblastoma A-172, lo que sugiere que la señalización del IFN- γ en glioblastoma puede también tener un efecto proapoptóticos. En cuanto a *CDH2*, codifica a la proteína N-cadherina, un marcador de la transición epitelio-mesénquima (EMT) asociado con la radioresistencia, y con una menor supervivencia del paciente con glioblastoma (László y Lele, 2022). En otro estudio, se identificó que los pacientes con glioblastoma con baja expresión de *CDH2* tuvieron un mejor pronóstico y se beneficiaron de la terapia con temozolomida (Chen *et al.*, 2018). Por lo tanto, el IFN- γ puede reducir la expresión de genes protumorales (*CDK8*), pero incrementar la expresión de genes que estimulan (*CDH2*) o inhiben la progresión tumoral (*CASP10*). La diversidad génica modulada por IFN- γ podría estar asociada con una dualidad del IFN- γ en cáncer, incluyendo el glioblastoma.

Otros datos a destacar, es que los genes sobreexpresados por IFN- γ se relacionan con una función de unión a proteínas, DNA y RNA, dado que codifican para algunos factores de transcripción y moduladores postranscripcionales y postraduccionales, sugiriendo la importancia que podría tener la señalización de este interferón en definir el transcriptoma y proteoma del glioblastoma. Además, los productos de los genes sobreexpresados por IFN- γ mayoritariamente están localizados en citoplasma/citosol, pero también pueden estar en exosomas. Esto es interesante, dado que la comunicación

exosomal es central en cáncer y en los procesos de metástasis, y la vía del IFN- γ podría tener una influencia en la biogénesis o modulación de los exosomas.

En cuanto al análisis del enriquecimiento génico usando el programa ShinyGO se identificaron diferentes vías moleculares asociadas a cáncer que son moduladas por el IFN- γ en glioblastoma. Dentro de estos resultados resaltaron vías moleculares asociadas a Retinoblastoma 1 (*RB1*). El gen *RB1* codifica para una proteína supresora de tumores por su capacidad para detener el ciclo celular mediante la represión de los genes blanco del factor de transcripción E2F. *RB1* reprime la transcripción mediada por E2F. Por el contrario, la fosforilación de *RB1* iniciada por la ciclina D-CDK4/6 en respuesta a señales mitogénicas inactiva la función represiva de RB1 al disociar a los complejos RB1-E2F-DP. La Red de Investigación Atlas del Genoma del Cáncer reveló en 2008 que la vía CycD1-CDK4/6-RB1 se encuentra entre las tres vías más alteradas en glioblastoma, lo que la convierte en un objetivo atractivo para la terapia contra el cáncer (Suwala *et al.*, 2021). De manera interesante, nuestros datos indican que el IFN- γ modula negativamente vías moleculares de *RB1*, junto con otras vías de señalización de interleucinas y factores de crecimiento.

Las vías moleculares regulados positivamente por el IFN- γ en glioblastoma están relacionadas con apoptosis, desregulación transcripcional en cáncer, senescencia celular, microRNAs, y proteoglicanos, dentro de ellas destacan las vías asociadas a *TP53*. El gen *TP53* codifica a la proteína p53 que actúa como un factor de transcripción que se considera el guardián del genoma y un supresor de tumores. *TP53* se encuentra mutado en casi la mitad de todos los cánceres humanos, adquiriendo una ganancia de función en su fenotipo (GOF) lo que puede potenciar la progresión tumoral agresiva a través del aumento de la migración celular, la proliferación, la invasión y la metástasis, proporcionando a las isoformas mutantes un mayor potencial oncogénico que la pérdida de p53. Las células de glioblastoma con mutaciones en p53 presentan un fenotipo más agresivo (Olafson *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2018). Se ha reportado que el tratamiento con temozolomida y agentes quimioterapéuticos adicionales conducen a

una baja tasa de recurrencia del tumor dentro de 1 año, cuando se inhibe la expresión de *TP53* en glioblastoma (Kurdi *et al.*, 2021). Estos datos son importantes considerando que IFN- γ podría favorecer las vías de *TP53* en este contexto.

Adicionalmente, resulta interesante la inducción de vías moleculares asociadas a SMAD3 y a proteoglicanos por IFN- γ en glioblastoma, las cuales han sido limitadamente estudiadas. En conjunto, estas vías moleculares pueden ser influenciadas por varios factores, entre ellos el microambiente tumoral, y podrían llegar a ser críticas para mantener una comunicación cruzada con la señalización del IFN- γ en glioblastoma, definiendo sus funciones protumorales o antitumorales. De acuerdo con datos de nuestro grupo de trabajo, el IFN- γ tiene mayoritariamente una función pro-tumorigénica en células de glioblastoma por promover la migración celular y estimular la expresión de vías de escape inmune como *PD-L1* (Zamora, 2023). El perfil de DEG por IFN- γ , sugiere que podrían existir vías moleculares que actúen como interruptores de las funciones oncogénicas o supresores tumorales de la señalización del IFN- γ . Además, factores como la estimulación crónica, así como la dosis de activación de la señalización podrían tener un efecto sobre sus efectos en cáncer. Sin embargo, más investigaciones son necesarias al respecto.

10. Conclusiones

- La activación de la vía de señalización del IFN- γ /pSTAT1 en las células derivadas de glioblastoma A-172 conduce a la modulación de la expresión génica.
- Se identificaron 92 DEG asociados a cáncer (63 genes reprimidos, y 29 genes sobreexpresados) en respuesta al tratamiento con el IFN- γ . La diversidad génica modulada tanto positiva como negativamente por el IFN- γ sugiere funciones duales, promoviendo o inhibiendo la progresión tumoral.
- La señalización del IFN- γ tiene un efecto predominantemente pro-tumorigénico en glioblastoma, por inducir genes que favorecen el cáncer, pero las comunicaciones cruzadas con otras vías moleculares activadas por diversos factores podrían favorecer o inhibir sus acciones pro- o anti-tumorigénicas.

11. Perspectivas

Determinar experimentalmente la modulación de la expresión de genes asociados a la progresión tumoral en respuesta al IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172, y de ellos, seleccionar genes que puedan ser potenciales biomarcadores o blancos terapéuticos, con el fin de realizar estudios funcionales y de caracterización en el contexto de glioblastoma.

12. Referencias

1. Al Subeh, Z. Y., Poschel, D. B., Redd, P. S., Klement, J. D., Merting, A. D., Yang, D., Mehta, M., Shi, H., Colson, Y. L., Oberlies, N. H., Pearce, C. J., Colby, A. H., Grinstaff, M. W., and Liu, K. (2022). Lipid Nanoparticle Delivery of Fas Plasmid Restores Fas Expression to Suppress Melanoma Growth in Vivo. *ACS Nano*, 16(8), 12695–12710. <https://doi.org/10.1021/acsnano.2c04420>
2. Alsamman, K., and El-Masry, O. S. (2018). Interferon regulatory factor 1 inactivation in human cancer. *Bioscience reports*, 38(3), BSR20171672. <https://doi.org/10.1042/BSR20171672>
3. Alspach, E., Lussier, D. M., and Schreiber, R. D. (2019). Interferon γ and Its Important Roles in Promoting and Inhibiting Spontaneous and Therapeutic Cancer Immunity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 11(3), a028480. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028480>
4. Avril, T., Saikali, S., Vauleon, E., Jary, A., Hamlat, A., De Tayrac, M., Mosser, J., and Quillien, V. (2010). Distinct effects of human glioblastoma immunoregulatory molecules programmed cell death ligand-1 (PDL-1) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) on tumour-specific T cell functions. *Journal of Neuroimmunology*, 225(1–2), 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.04.003>
5. Bourgeois-Daigneault, M. C., Roy, D. G., Falls, T., Twumasi-Boateng, K., St-Germain, L. E., Marguerie, M., Garcia, V., Selman, M., Jennings, V. A., Pettigrew, J., Amos, S., Diallo, J. S., Nelson, B., and Bell, J. C. (2016). Oncolytic vesicular stomatitis virus expressing interferon- γ has enhanced therapeutic activity. *Molecular therapy oncolytics*, 3, 16001. <https://doi.org/10.1038/mto.2016.1>
6. Castro, F., Cardoso, A. P., Gonçalves, R. M., Serre, K., and Oliveira, M. J. (2018). Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Frontiers in immunology*, 9, 847. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847>
7. Chakrabandhu, K., Huault, S., Durivault, J., Lang, K., Ta Ngoc, L., Bole, A., Doma, E., Dérijard, B., Gérard, J. P., Pierres, M., and Hueber, A. O. (2016). An Evolution-Guided Analysis Reveals a Multi-Signaling Regulation of Fas by Tyrosine Phosphorylation and its Implication in Human Cancers. *PLoS Biology*, 14(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002401>
8. Chen, Q., Cai, J., and Jiang, C. (2018). CDH2 expression is of prognostic significance in glioma and predicts the efficacy of temozolomide therapy in patients with glioblastoma. *Oncology Letters*, 15(5), 7415–7422. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8227>
9. Chowen, J. A., and Garcia-Segura, L. M. (2021). Role of glial cells in the generation of sex differences in neurodegenerative diseases and brain aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 196(3), 111473. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111473>
10. Cinelli, M. A., Do, H. T., Miley, G. P., and Silverman, R. B. (2020). Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Medicinal research reviews*, 40(1), 158–189. <https://doi.org/10.1002/med.21599>

11. Davis, M. E. (2016). Glioblastoma: Overview of disease and treatment. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 20(5), 1–8. <https://doi.org/10.1188/16.CJON.S1.2-8>
12. Delgado, M. (2003). Inhibition of interferon (IFN) γ -induced Jak-STAT1 activation in microglia by vasoactive intestinal peptide. Inhibitory effect on CD40, IFN-induced protein-10, and inducible nitric-oxide synthase expression. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 27620–27629. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303199200>
13. Desai, S. D., Reed, R. E., Babu, S., and Lorio, E. A. (2013). ISG15 deregulates autophagy in genotoxin-treated ataxia telangiectasia cells. *Journal of Biological Chemistry*, 288(4), 2388–2402. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.403832>
14. Dietz, A. G., Goldman, S. A., and Nedergaard, M. (2020). Glial cells in schizophrenia: a unified hypothesis. *The Lancet Psychiatry*, 7(3), 272–281. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(19\)30302-5](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(19)30302-5)
15. Du, W., Frankel, T. L., Green, M., and Zou, W. (2022). IFN γ signaling integrity in colorectal cancer immunity and immunotherapy. In *Cellular and Molecular Immunology*, 19(1), 23–32. Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00735-3>
16. Gaudet, A. D., and Fonken, L. K. (2018). Glial Cells Shape Pathology and Repair After Spinal Cord Injury. *Neurotherapeutics*, 15(3), 554–577. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-0630-7>
17. Gocher, A. M., Workman, C. J., and Vignali, D. A. A. (2022). Interferon- γ : teammate or opponent in the tumour microenvironment?. *Nature reviews. Immunology*, 22(3), 158–172. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00566-3>
18. Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimension. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
19. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
20. Horita, H., Law, A., Hong, S., and Middleton, K. (2017). Identifying Regulatory Posttranslational Modifications of PD-L1: A Focus on Monoubiquitination. *Neoplasia (United States)*, 19(4), 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.02.006>
21. Jacob, F., Salinas, R. D., Zhang, D. Y., Nguyen, P. T. T., Schnoll, J. G., Wong, S. Z. H., Thokala, R., Sheikh, S., Saxena, D., Prokop, S., Liu, D. ao, Qian, X., Petrov, D., Lucas, T., Chen, H. I., Dorsey, J. F., Christian, K. M., Binder, Z. A., Nasrallah, M., ... Song, H. (2020). A Patient-Derived Glioblastoma Organoid Model and Biobank Recapitulates Inter- and Intra-tumoral Heterogeneity. *Cell*, 180(1), 188–204.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.036>
22. Ji, H., Ba, Y., Ma, S., Hou, K., Mi, S., Gao, X., Jin, J., Gong, Q., Liu, T., Wang, F., Liu, Z., Li, S., Du, J., and Hu, S. (2021). Construction of Interferon-Gamma-Related Gene Signature to Characterize the Immune-Inflamed Phenotype of Glioblastoma and Predict Prognosis, Efficacy of Immunotherapy and Radiotherapy. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.729359>

23. Ji, R., Ma, L., Chen, X., Sun, R., Zhang, L., Saiyin, H., and Wei, W. (2021). Characterizing the distributions of IDO-1 expressing macrophages/microglia in human and murine brains and evaluating the immunological and physiological roles of IDO-1 in RAW264.7/BV-2 cells. *PLoS ONE*, 16(11), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258204>
24. Jia, H., Xie, X., Wang, L., Wang, L., and Che, F. (2022). IFN- γ induces PD-L1 through p38/JNK/ERK signaling pathways and counteracts the tumor promoting effect mediated by PD-L1 in Glioblastoma. *Computational Intelligence and Neuroscience*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/5492602>
25. Jung, M., Aibaidula, A., Brown, D. A., Himes, B. T., Garcia, L. M. C., and Parney, I. F. (2022). *Neuro-Oncology Advances extracellular vesicles by IFN- γ through PD-L1 and IDO1*. 4(2), 1–11.
26. Kielbik, M., Szulc-Kielbik, I., and Klink, M. (2019). The Potential Role of iNOS in Ovarian Cancer Progression and Chemoresistance. *International journal of molecular sciences*, 20(7), 1751. <https://doi.org/10.3390/ijms20071751>
27. Knüpfer, M. M., Poppenborg, H., Van Gool, S., Domula, M., and Wolff, J. E. (1997). Interferon-gamma inhibits proliferation and adhesion of T98G human malignant glioma cells in vitro. *Klinische Padiatrie*, 209(4), 271–274. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1043961>
28. Kumari, R., Deshmukh, R. S., and Das, S. (2019). Caspase-10 inhibits ATP-citrate lyase-mediated metabolic and epigenetic reprogramming to suppress tumorigenesis. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12194-6>
29. Kurdi, M., Butt, N. S., Baeesa, S., Alghamdi, B., Maghrabi, Y., Bardeesi, A., Saeedi, R., Dallol, A., Mohamed, F., Bari, M. O., Samkari, A., Lary, A. I., and Alkhayyat, S. (2021). Prognostic value of TP53 expression and MGMT methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide combined with other chemotherapies. *Journal of Neuro-Oncology*, 152(3), 541–549. <https://doi.org/10.1007/s11060-021-03723-9>
30. László, Z. I., and Lele, Z. (2022). Flying under the radar: CDH2 (N-cadherin), an important hub molecule in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases. *Frontiers in neuroscience*, 16, 972059. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.972059>
31. Lazear, H. M., Schoggins, J. W., and Diamond, M. S. (2019). Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity*, 50(4), 907–923. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.025>
32. Lin, F. ching, and Young, H. A. (2014). Interferons: Success in anti-viral immunotherapy. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 25(4), 369–376. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.015>

33. Lin, D. Y., Tanaka, Y., Iwasaki, M., Gittis, A. G., Su, H. P., Mikami, B., Okazaki, T., Honjo, T., Minato, N., and Garboczi, D. N. (2008). The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), 3011–3016. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712278105>
34. Litak, J., Mazurek, M., Grochowski, C., Kamieniak, P., and Roliński, J. (2019). PD-L1/PD-1 Axis in Glioblastoma Multiforme. *International journal of molecular sciences*, 20(21), 5347. <https://doi.org/10.3390/ijms20215347>
35. Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., von Deimling, A., and Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Neuro-Oncology*, 23(8), 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
36. Lubanska, D., and Porter, L. (2017). Revisiting CDK Inhibitors for Treatment of Glioblastoma Multiforme. *Drugs in R&D*, 17(2), 255–263. <https://doi.org/10.1007/s40268-017-0180-1>
37. Menzl, I., Witalisz-Siepracka, A., and Sexl, V. (2019). CDK8-Novel Therapeutic Opportunities. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 12(2), 92. <https://doi.org/10.3390/ph12020092>
38. Michalska, A., Blaszczyk, K., Wesoly, J., and Bluysen, H. A. R. (2018). A positive feedback amplifier circuit that regulates interferon (IFN)-stimulated gene expression and controls type I and type II IFN responses. *Frontiers in Immunology*, 9(5). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01135>
39. Negishi, H., Taniguchi, T., and Yanai, H. (2018). The interferon (IFN) class of cytokines and the IFN regulatory factor (IRF) transcription factor family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028423>
40. Olafson, L. R., Gunawardena, M., Nixdorf, S., McDonald, K. L., and Rapkins, R. W. (2020). The role of TP53 gain-of-function mutation in multifocal glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*, 147(1), 37–47. <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03318-5>
41. Seliger, B., Ruiz-Cabello, F., and Garrido, F. (2008). Chapter 7 IFN Inducibility of Major Histocompatibility Antigens in Tumors. *Advances in Cancer Research*, 101(1), 249–276. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)00407-7](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)00407-7)
42. Senga, S. S., and Grose, R. P. (2021). Hallmarks of cancer-the new testament. *Open biology*, 11(1), 200358. <https://doi.org/10.1098/rsob.200358>
43. Soomro, S. H., Ting, L. R., Qing, Y. Y., and Ren, M. (2017). Molecular biology of glioblastoma: Classification and mutational locations. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 67(9), 1410–1414.
44. Steiner, E., Holzmann, K., Pirker, C., Elbling, L., Micksche, M., Sutterlüty, H., and Berger, W. (2006). The major vault protein is responsive to and interferes with interferon- γ -mediated STAT1 signals. *Journal of Cell Science*, 119(3), 459–469. <https://doi.org/10.1242/jcs.02773>

45. Sun, C., Mezzadra, R., and Schumacher, T. N. (2018). Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity*, 48(3), 434–452. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.014>
46. Suwala, A. K., Stichel, D., Schrimpf, D., Maas, S. L. N., Sill, M., Dohmen, H., Banan, R., Reinhardt, A., Sievers, P., Hinz, F., Blattner-Johnson, M., Hartmann, C., Schweizer, L., Boldt, H. B., Kristensen, B. W., Schittenhelm, J., Wood, M. D., Chotard, G., Bjergvig, R., ... Sahn, F. (2021). Glioblastomas with primitive neuronal component harbor a distinct methylation and copy-number profile with inactivation of TP53, PTEN, and RB1. *Acta Neuropathologica*, 142(1), 179–189. <https://doi.org/10.1007/s00401-021-02302-6>
47. Tecalco-Cruz, A. C. (2020). Molecular pathways of Interferon-Stimulated Gene 15: Implications in cancer. *Current Protein & Peptide Science*, 21, 1–10. <https://doi.org/10.2174/1389203721999201208200747>
48. Tecalco-Cruz, A. C., Cortés-González, C. C., Cruz-Ramos, E., Ramírez Jarquín, J. O., Romero-Mandujano, A. K., and Sosa-Garrocho, M. (2019). Interplay between interferon-stimulated gene 15/ISGylation and interferon gamma signaling in breast cancer cells. *Cellular Signalling*, 54, 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.11.021>
49. Tecalco-Cruz, A. C., Velasco-Loyden, G., Robles-Villarruel, L., Cortes-González, C. C., Zepeda-Cervantes, J., Pineda, B., and Chagoya de Sánchez, V. (2022). Interferon-stimulated gene 15 and ISGylation are upregulated in glioblastoma. *Biochemical and biophysical research communications*, 621, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.07.011>
50. Vázquez-Blomquist, D., Hardy-Sosa, A., Baez, S. C., Besada, V., Palomares, S., Guirola, O., Ramos, Y., Wiśniewski, J. R., González, L. J., and Bello-Rivero, I. (2022). Proteomics and Phospho-Proteomics Profiling of the Co-Formulation of Type I and II Interferons, HeberFERON, in the Glioblastoma-Derived Cell Line U-87 MG. *Cells*, 11(24), 4068. <https://doi.org/10.3390/cells11244068>
51. Wang, R., Bao, W., Pal, M., Liu, Y., Yazdanbakhsh, K., and Zhong, H. (2022). Intermediate monocytes induced by IFN- γ inhibit cancer metastasis by promoting NK cell activation through FOXO1 and interleukin-27. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 10(1). <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-003539>
52. Wybranska, I., Polus, A., Mikolajczyk, M., Knapp, A., Sliwa, A., Zapala, B., Staszal, T., and Dembinska-Kiec, A. (2013). Apoptosis-related gene expression in glioblastoma (LN-18) and medulloblastoma (Daoy) cell lines. *Human Cell*, 26(4), 137–148. <https://doi.org/10.1007/s13577-011-0029-9>
53. Xia, H. L., Li, C. J., Hou, X. F., Zhang, H., Wu, Z. H., and Wang, J. (2017). Interferon- γ affects leukemia cell apoptosis through regulating Fas/FasL signaling pathway. *European review for medical and pharmacological sciences*, 21(9), 2244–2248.
54. Xu, S., Lu, J., Shao, A., Zhang, J. H., and Zhang, J. (2020). Glial Cells: Role of the Immune Response in Ischemic Stroke. *Frontiers in Immunology*, 11(2), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00294>

55. Zamora-Salas, S. X. (2023). *Caracterización de la vía del IFN- γ e identificación de sus miRNAs blanco en células de glioblastoma*". Tesis de maestría
56. Zamora-Salas, S. X., Robles-Villarruel, M. L., Macías-Silva, M., Álvarez-Sánchez, M. E., y Tecalco-Cruz, Á. C. (2023). Interferón-gamma: vías de señalización y sus implicaciones en el cáncer. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 26. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2023.533>
57. Zhang, Y., Dube, C., Gibert, M., Jr, Cruickshanks, N., Wang, B., Coughlan, M., Yang, Y., Setiady, I., Deveau, C., Saoud, K., Grello, C., Oxford, M., Yuan, F., and Abounader, R. (2018). The p53 Pathway in Glioblastoma. *Cancers*, 10(9), 297. <https://doi.org/10.3390/cancers10090297>

13. Anexos

Genes regulados negativamente por IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172

Score	Name	(Total Genes)	Ontology
8.82	(R)-limonene 6-monooxygenase Activity	1 (2)	Molecular function
8.82	(S)-limonene 6-monooxygenase Activity	1 (2)	Molecular function
8.82	(S)-limonene 7-monooxygenase Activity	1 (2)	Molecular function
7.50	1,4-alpha-oligoglucan Phosphorylase Activity	1 (5)	Molecular function
8.82	17-alpha,20-alpha-dihydroxypregn-4-en-3-one Dehydrogenase Activity	1 (2)	Molecular function
8.23	3' Overhang Single-stranded DNA Endodeoxyribonuclease Activity	1 (3)	Molecular function
7.50	Activin Receptor Activity	1 (5)	Molecular function
9.82	Cis-stilbene-oxide Hydrolase Activity	1 (1)	Molecular function
7.50	Epoxide Hydrolase Activity	1 (5)	Molecular function
8.82	Ether Hydrolase Activity	1 (2)	Molecular function
7.50	Histone H3-di/monomethyl-lysine-9 Demethylase Activity	1 (5)	Molecular function
7.82	Inhibin Binding	1 (4)	Molecular function
9.82	Interleukin-13 Receptor Binding	1 (1)	Molecular function
8.82	Interleukin-3 Receptor Activity	1 (2)	Molecular function
8.82	Interleukin-5 Receptor Activity	1 (2)	Molecular function
7.82	Long-chain Fatty Acid Omega-1 Hydroxylase Activity	1 (4)	Molecular function
11.34	Protein Binding	24 (13902)	Molecular function
8.58	Protein Kinase Activity	4 (529)	Molecular function
7.82	Purine-nucleoside Phosphorylase Activity	1 (4)	Molecular function
8.23	S-methyl-5-thioadenosine Phosphorylase Activity	1 (3)	Molecular function
8.82	Transforming Growth Factor Beta Receptor Activity, Type II	1 (2)	Molecular function
7.82	Type III Transforming Growth Factor Beta Receptor Binding	1 (4)	Molecular function

Score	Name	(Total Genes)	Ontology
8.98	Actin Cytoskeleton Reorganization	2 (59)	Biological process
9.82	Adherens Junction Disassembly	1 (1)	Biological process
10.30	Cell Differentiation	6 (1032)	Biological process
9.82	Cell Proliferation Involved in Endocardial Cushion Morphogenesis	1 (1)	Biological process
10.81	Digestive Tract Development	2 (31)	Biological process
9.82	Glutamatergic Neuron Differentiation	1 (1)	Biological process
9.82	Histamine Transport	1 (1)	Biological process
9.82	Inferior Endocardial Cushion Morphogenesis	1 (1)	Biological process
9.18	Negative Regulation of Cell Cycle	2 (55)	Biological process
9.82	Negative Regulation of Double-stranded Telomeric DNA Binding	1 (1)	Biological process
9.82	Negative Regulation of Glutamatergic Neuron Differentiation	1 (1)	Biological process
9.82	Negative Regulation of Lung Ciliated Cell Differentiation	1 (1)	Biological process
9.82	Organic Hydroxy Compound Transport	1 (1)	Biological process
9.82	Positive Regulation of B Cell Tolerance Induction	1 (1)	Biological process
9.82	Positive Regulation of Lung Goblet Cell Differentiation	1 (1)	Biological process
9.82	Positive Regulation of Pancreatic Stellate Cell Proliferation	1 (1)	Biological process
9.51	Positive Regulation of Pathway-restricted SMAD Protein Phosphorylation	2 (49)	Biological process
9.13	Positive Regulation of Smooth Muscle Cell Proliferation	2 (56)	Biological process
<u>9.82</u>	Positive Regulation of Tolerance Induction to Self Antigen	1 (1)	Biological process
<u>11.31</u>	Positive Regulation of Wound Healing	2 (26)	Biological process
10.62	Protein Phosphorylation (5 (643)	Biological process
9.57	Regulation of Cell Population Proliferation	3 (196)	Biological process
9.82	Regulation of Interleukin-1 Production	1 (1)	Biological process
10.38	Response to Lipopolysaccharide	3 (161)	Biological process
8.98	Response to Mechanical Stimulus	2 (59)	Biological process
9.82	Superior Endocardial Cushion Morphogenesis	1 (1)	Biological process
9.95	Toxin Transport	2 (42)	Biological process

Score	Name	(Total Genes)	Ontology
8.23	Alphav-beta3 Integrin-vitronectin Complex	1 (3)	Cellular component
8.23	Chromatin Lock Complex	1 (3)	Cellular component
6.82	Cyclin/CDK Positive Transcription Elongation Factor Complex	1 (8)	Cellular component
7.82	ERCC4-ERCC1 Complex	1 (4)	Cellular component
6.82	Extrinsic Component of Endosome Membrane	1 (8)	Cellular component
7.82	Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor Receptor Complex	1 (4)	Cellular component
8.82	Inhibin A Complex	1 (2)	Cellular component
9.82	Inhibin B Complex	1 (1)	Cellular component
8.23	Inhibin-betaglycan-ActRII Complex	1 (3)	Cellular component
7.21	Intracellular Membrane-bounded Organelle	5 (1107)	Cellular component
11.21	Mitochondrial Ribosome	2 (27)	Cellular component
7.22	Nucleoplasm	10 (3903)	Cellular component
7.24	Nucleotide-excision Repair Complex	1 (6)	Cellular component
8.23	Nucleotide-excision Repair Factor 1 Complex	1 (3)	Cellular component
7.82	Peptidase Inhibitor Complex)	1 (4)	Cellular component
8.50	Photoreceptor Inner Segment)	2 (70)	Cellular component
7.02	Photoreceptor Ribbon Synapse	1 (7)	Cellular component
7.82	Presynaptic Endocytic Zone Membrane	1 (4)	Cellular component
8.23	Rb-E2F Complex	1 (3)	Cellular component
8.23	Rough Endoplasmic Reticulum Lumen	1 (3)	Cellular component
8.23	Transforming Growth Factor Beta Ligand-receptor Complex	1 (3)	Cellular component
7.82	Type III Intermediate Filament	1 (4)	Cellular component

Genes regulados positivamente por IFN- γ en células derivadas de glioblastoma A-172

Score	Name	(Total Genes)	Ontology
27.37	Protein Binding	54 (13902)	Molecular function
20.97	Enzyme Binding	9 (397)	Molecular function
20.78	Promoter-specific Chromatin Binding	5 (64)	Molecular function
15.46	Chromatin Binding	8 (485)	Molecular function
15.09	Protein Kinase Binding	8 (503)	Molecular function
14.47	Cysteine-type Peptidase Activity	5 (159)	Molecular function
14.41	Death Effector Domain Binding	2 (4)	Molecular function
14.41	Identical Protein Binding	14 (1711)	Molecular function
13.77	RNA Strand Annealing Activity	2 (5)	Molecular function
13.36	Ubiquitin Protein Ligase Binding	6 (303)	Molecular function
12.56	Potassium Channel Regulator Activity	3 (43)	Molecular function
11.80	DNA Binding	15 (2288)	Molecular function
11.78	Cysteine-type Endopeptidase Activity Involved in Apoptotic Signaling Pathway	2 (10)	Molecular function
11.26	SiRNA Binding	2 (12)	Molecular function
11.26	DNA-(apurinic or Apyrimidinic Site) Endonuclease Activity	2 (12)	Molecular function
11.03	Phase of Apoptosis	2 (13)	Molecular function
11.01	Microtubule Binding	5 (267)	Molecular function
10.82	Cysteine-type Endopeptidase Activity Involved in Apoptotic	2 (14)	Molecular function
10.46	P53 Binding	3 (71)	Molecular function
10.33	DNA-binding Transcription Factor Binding	4 (169)	Molecular function
10.27	Death Receptor Binding	2 (17)	Molecular function
10.27	Molecular Condensate Scaffold Activity	2 (17)	Molecular function
10.10	Core Promoter Sequence-specific DNA Binding	2 (18)	Molecular function
9.63	RNA Binding	11 (1573)	Molecular function
9.52	Amyloid-beta Binding	3 (89)	Molecular function
9.29	Translation Regulator Activity	2 (24)	Molecular function
9.00	Peptidase Activity	6 (540)	Molecular function
8.98	Protein-containing Complex Binding	5 (367)	Molecular function
8.92	Cysteine-type Endopeptidase Activity	3 (103)	Molecular function
8.69	Oxidized Pyrimidine DNA Binding	1 (1)	Molecular function
8.69	25-hydroxycholesterol 7 α -hydroxylase Activity	1 (1)	Molecular function
8.69	Nuclear Mineralocorticoid Receptor Binding	1 (1)	Molecular function
8.69	27-hydroxycholesterol 7- α -monooxygenase Activity	1 (1)	Molecular function
8.69	Beta2-adrenergic Receptor Activity	1 (1)	Molecular function
8.69	Protease Binding	3 (109)	Molecular function
8.46	specific DNA Binding	5 (399)	Molecular function
8.26	MRNA Binding	4 (251)	Molecular function
8.22	Small Molecule Binding	2 (35)	Molecular function

Score	Name	(Total Genes)	Ontology
20.76	Cell Migration	8 (293)	Biological process
15.60	Execution Phase of Apoptosis	3 (21)	Biological process
13.70	Apoptotic Process	9 (747)	Biological process
12.81	DNA Methylation-dependent Heterochromatin Formation	2 (7)	Biological process
12.42	Negative Regulation of Hydrolase Activity	2 (8)	Biological process
11.76	Negative Regulation of I-kappaB Kinase/NF-kappaB Signaling	3 (52)	Biological process
11.51	Positive Regulation of Signaling Receptor Activity	2 (11)	Biological process
11.11	Regulation of Apoptotic Process	5 (263)	Biological process
10.89	Cellular Response to Hydrogen Peroxide	3 (64)	Biological process
10.44	Vesicle Transport Along Microtubule	2 (16)	Biological process
10.44	Regulation of Tumor Necrosis Factor-mediated Signaling	2 (16)	Biological process
10.27	Cell Differentiation	9 (1032)	Biological process
10.12	Neuron Apoptotic Process	3 (77)	Biological process
10.10	Response to Iron Ion	2 (18)	Biological process
10.01	Apoptotic Signaling Pathway	3 (79)	Biological process
9.81	Positive Regulation of Synaptic Transmission	2 (20)	Biological process
9.81	Cell Cycle	7 (665)	Biological process
9.71	Negative Regulation of Translation	3 (85)	Biological process
9.67	Homeostasis of Number of Cells	2 (21)	Biological process

Score	Name	(Total Genes)	Ontology
17.50	Cytosol	29 (5435)	Cellular component
16.23	Extracellular Exosome	17 (2215)	Cellular component
13.94	Nucleoplasm	22 (3903)	Cellular component
13.40	Cytoplasm	32 (7321)	Cellular component
13.25	Ripoptosome	2 (6)	Cellular component
13.25	CD95 Death-inducing Signaling Complex	2 (6)	Cellular component
12.01	Heterochromatin	3 (49)	Cellular component
10.71	Focal Adhesion	6 (428)	Cellular component
10.51	Clathrin-coated Endocytic Vesicle Membrane	3 (70)	Cellular component
10.44	NuRD Complex	2 (16)	Cellular component
10.17	Cytosolic Ribosome	3 (76)	Cellular component
8.85	Intracellular Non-membrane-bounded Organelle	2 (28)	Cellular component
8.74	Protein-containing Complex	7 (758)	Cellular component
8.69	Other Organism Cell Membrane	1 (1)	Cellular component
8.69	Host Cell Surface	1 (1)	Cellular component
8.66	Small Ribosomal Subunit	2 (30)	Cellular component
8.42	Transcription Regulator Complex	4 (243)	Cellular component
7.90	Chromatin	8 (1072)	Cellular component
7.79	Postsynaptic Density	4 (275)	Cellular component
7.71	Polysome	2 (42)	Cellular component