

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
MAESTRÍA EN CIENCIAS GENÓMICAS**

**“Caracterización de la vía del IFN- γ e
identificación de sus miRNAs blanco en células
de glioblastoma”**

T E S I S

QUE PARA OBTENR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A :

SAYRA XIMENA ZAMORA SALAS

DIRECTORA:

Dra. Angeles Concepción Tecalco Cruz

CODIRECTORA:

Dra. Marina Macías Silva

**POSGRADO EN
CIENCIAS
GENÓMICAS**

Ciudad de México, Junio, 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.

COMITÉ DE CERTIFICACIÓN:

Presidente: Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

Secretario: Dra. Angeles Concepción Tecalco Cruz

Vocal: Dra. Marina Macías Silva

Plantel de Adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTORA:

Dra. Angeles Concepción Tecalco Cruz

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

CODIRECTORA:

Dra. Marina Macías Silva

Universidad Nacional Autónoma de México

AGRADECIMIENTOS

Se reconoce el apoyo de CONACyT que me otorgó una beca para los estudios de Maestría en Ciencias Genómicas en la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (CVU: 1103317).

El desarrollo experimental y de escritura de esta tesis se llevó a cabo en el laboratorio 224-Norte del Instituto de Fisiología Celular (IFC) UNAM y en el cubículo A-38 del Posgrado de Ciencias Genómicas del Plantel del Valle.

Esta tesis fue apoyada por los Proyectos de Investigación del Colegio de Ciencia y Tecnología (CCyT) de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México con el número de folio **CCYT-2022-08**, para la Dra. Angeles C. Tecalco como responsable de este proyecto, que es parte de sus líneas de investigación.

Reconozco el apoyo de la Dra. Angeles C. Tecalco Cruz por la dirección de este trabajo.

Agradezco la colaboración de la Dra. Marina Macías Silva como co-directora de este trabajo, y por brindarme el espacio físico e infraestructura en el IFC-UNAM para la fase experimental de este proyecto.

Adicionalmente, agradezco el asesoramiento teórico y técnico otorgado por el Dr. Josué O. Ramírez Jarquín (Instituto de Fisiología Celular-UNAM), la Dra. Bibiana Ortega Domínguez (Instituto de Fisiología Celular-UNAM), y la Biol. Marcela Sosa Garrocho (Instituto de Fisiología Celular-UNAM).

Reconozco y agradezco la asesoría por parte de mi comité conformado por:

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez (PCG, UACM)

Dr. Mauricio Castañón Arreola (PCG, UACM)

DEDICATORIA

La maestría de inicio a fin fue una de las etapas más desafiantes de mi vida adulta, indudablemente hacerlo sola habría cambiado por completo el resultado y quiero agradecer a algunas personas por acompañarme.

Principalmente quiero agradecer a Alex por estar 24/7 en este proceso, por ser tan paciente, tan comprensivo, por alimentarme cuando lo olvidaba y por cada vez que yo quise renunciar, él me recordó lo capaz que soy y que podría lograrlo, siempre dándome ánimos y muchos abrazos para seguir. Gracias por ser parte de mi vida, te amo.

A mi familia porque aún sin saberlo con una simple llamada o mensaje me refrescaban, me alegraban y me daban fuerzas para seguir.

A mi mejor amiga Gaby por siempre escucharme y aconsejarme en las buenas y malas. Sin ti no sería lo mismo.

Y por último, pero no menos importante, quiero agradecer el apoyo y guía de mi tutora la Dra. Angeles por ayudarme a llegar a este punto y apoyarme académicamente en este proceso.

ÍNDICE

3	Agradecimientos
4	Dedicatoria
5	Índice
7	Índice de tablas
7	Índice de figuras
9	Abreviaturas
11	Resumen
12	Abstract
13	Introducción
13	Generalidades del glioblastoma
14	Tipos de glioblastoma
16	Aspectos clínicos del glioblastoma
19	Estrategias terapéuticas actuales para el glioblastoma
20	El microambiente tumoral en glioblastoma
24	Factores inflamatorios en el TME
27	Citocinas importantes en el TME
31	Antecedentes
31	Vía de señalización canónica del IFN- γ
33	Efecto del IFN- γ sobre el transcriptoma y proteoma celular
35	Actividades anti-tumorales y pro-tumorales del IFN- γ
40	Generalidades de los miRNAs y su importancia en cáncer
43	miRNAs desregulados en glioblastoma
45	Justificación
45	Hipótesis
45	Objetivos
46	Estrategia experimental
47	Materiales y métodos
47	Análisis in silico
47	Cultivo celular y tratamiento con IFN- γ
47	Obtención de extractos proteicos totales.
48	Electroforesis SDS-PAGE y Western Blot
48	Ensayo calceína-yoduro de propidio
49	Prueba de cierre de herida
49	Obtención de RNA y microarreglo para miRNAs
49	Resultados
49	Expresión de los componentes de la vía del IFN- γ en glioblastoma con respecto a tejido cerebral sano.
49	Expresión de los elementos de la vía del IFN- γ en glioblastoma
54	Relación de la sobreexpresión de la vía de señalización del IFN- γ con la supervivencia de los pacientes con glioblastoma.
56	Determinación de la activación de la vía del IFN- γ en células derivadas de glioblastoma.
59	Efecto del tratamiento con IFN- γ sobre la viabilidad y migración de las células de glioblastoma.
61	miRNAs modulados por IFN- γ en células de glioblastoma

64 Discusión

75 Conclusiones

75 Perspectivas

76 Bibliografía

90 Anexos

90 Constancia del curso “Aplicación de tecnologías de alto rendimiento a la biomedicina” concluido el 11 de noviembre de 2022.

91 Artículo de revisión “Interferón-gamma: vías de señalización y sus implicaciones en el cáncer” publicado en la revista TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas.

ÍNDICE DE TABLAS

- 47 Tabla 1. Línea células LN-18 de glioblastoma utilizada en este proyecto y las principales alteraciones genéticas que porta.

ÍNDICE DE FIGURAS

- 14 Figura 1. Imágenes de resonancia magnética de un paciente con glioblastoma de rápida evolución.
- 17 Figura 2. Epidemiología del glioblastoma.
- 22 Figura 3. Esquematación de la distribución de los nichos en el TME de glioblastoma.
- 25 Figura 4. Complejidad del TME de glioblastoma.
- 27 Figura 5. Factores solubles en el TME.
- 32 Figura 6. Vía de señalización canónica del IFN- γ .
- 39 Figura 7. Actividad dual del IFN- γ en cáncer
- 41 Figura 8. Biogénesis de los miRNAs.
- 50 Figura 9. Expresión diferencial del receptor del IFN- γ en glioblastoma.
- 51 Figura 10. Expresión de JAK1 y JAK2 en glioblastoma.
- 52 Figura 11. Expresión de STAT1 en glioblastoma.
- 52 Figura 12. Expresión de IRF1 y CD274 en glioblastoma
- 53 Figura 13. Mapa de calor con la expresión diferencial de los participantes de la vía de señalización del IFN- γ en pacientes con glioblastoma en comparación con pacientes en condiciones normales.
- 54 Figura 14. Mapa de calor con la expresión diferencial de los participantes de la vía de señalización del IFN- γ en pacientes con glioblastoma en comparación con pacientes en condiciones normales.
- 55 Figura 15. Diagramas de Kaplan Meier sobre la relación de la expresión de los elementos de la vía de IFN- γ con la supervivencia de los pacientes con glioblastoma
- 56 Figura 16. Niveles de STAT1 y pSTAT1 en la línea celular LN-18 sin estímulo y con estímulo de IFN- γ (100 ng/mL y 50 ng/mL) a diferentes tiempos (16h y 24h).
- 57 Figura 17. Niveles de IRF1 y PD-L1 en la línea celular LN-18 sin estímulo y con estímulo de IFN- γ (100 ng/mL y 50 ng/mL) a diferentes tiempos (16h y 24h).
- 58 Figura 18. Niveles proteicos de los participantes de la vía canónica del IFN- γ sin y con estímulo de 100 ng/mL de IFN- γ durante 24 h.
- 59 Figura 19. Prueba de calceína-yoduro de propidio para determinar si el estímulo con 100 ng/mL de IFN- γ afecta la viabilidad celular de la línea LN-18 de glioblastoma.
- 60 Figura 20. Prueba de cierre de herida para determinar la capacidad de migración de las células LN-18 estimuladas sin y con IFN- γ (100 ng/mL).

- 62 Figura 21. Nivel de expresión de los miRNAs regulados positivamente y negativamente por el estímulo de 100 ng/mL de IFN- γ durante 24 h sobre células LN-18 de glioblastoma.
- 663 Figura 22. Análisis de enriquecimiento funcional de los miRNAs regulados a la alta por acción del IFN- γ en células LN-18 de glioblastoma con las bases de datos KEGG y Reactome.
- 64 Figura 23. Análisis de enriquecimiento funcional de los miRNAs regulados a la baja por acción del IFN- γ en células LN-18 de glioblastoma con las bases de datos KEGG y Reactome.
- 74 Figura 25. Modelo propuesto sobre los miRNAs modulados por la vía de señalización canónica del IFN- γ a la alza y a la baja, así como de las respuestas celulares con las que se encuentran relacionados.

ABREVIATURAS

APCs	Del inglés, <i>Antigen Presenting Cells</i>
Bak	Del inglés, <i>Bcl2 antagonist killer 1</i>
Bax	Del inglés, <i>Bcl-2 Associated X-protein</i>
BBB	Del inglés, <i>Blood Brain Barrier</i>
Bcl-2	Del inglés, <i>B-cell lymphoma 2</i>
CDK	Del inglés, <i>Cyclin-dependent kinases</i>
CGT	Células de GLIOBLASTOMA tipo troncales
CNS	Del inglés, <i>Central Nervous System</i>
CTLA-4	Del inglés, <i>Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4</i>
CXC3CL1	Del inglés, <i>C-X3-C Motif Chemokine Ligand 1</i>
CXCL11	Del inglés, <i>C-X-C motif chemokine 11</i>
DCs	Del inglés, <i>Dendritic Cells</i>
ECM	Del inglés, <i>Extra Cellular Matrix</i>
EGF	Del inglés, <i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	Del inglés, <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMT	Del inglés, <i>Epithelial to Mesenchymal Transition</i>
EV	Del inglés, <i>Extracellular Vesicles</i>
IDH	Isocitrato Deshidrogenasa
IDO	Indoleamina -2,3- dioxigenasa
IFN	Interferón
IHQ	Inmunohistoquímica
ISG	Del inglés, <i>Interferon Stimulated Genes</i>
ISRE	Del inglés, <i>Interferon-Stimulated Response Element</i>
GAS	Del inglés, <i>Gamma Activated Sequences</i>
GDNF	Del inglés, <i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GM-CSF	Del inglés, <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HIF-1 α	Del inglés, <i>Hypoxia-inducible factor-1 α</i>
lncRNA	Del inglés, <i>long non-coding RNA</i>
MDSCs	Del inglés, <i>Myeloid-Derived Suppressor Cells</i>
MGMT	O6-metilguanina-metiltransferasa de DNA

MHC	Del inglés, <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MMP	Del inglés, <i>Matrix Metallo-Proteases</i>
NF-κB	Del inglés, <i>Nuclear Factor kappa B</i>
NK	Del inglés, <i>Natural Killer</i>
NO	Del inglés, <i>Nitric Oxide</i>
NSCLC	Del inglés, <i>Non-Small Cell Lung Cancer</i>
PARP	Del inglés, <i>Poly-ADP-ribose polymerase</i>
PD-1	Del inglés, <i>Programmed Death-1</i>
PD-L1	Del inglés, <i>Programmed Death-Ligand 1</i>
PMN	Del inglés, <i>Polymorphonuclear</i>
ROS	Del inglés, <i>Reactive Oxygen Species</i>
SDF-1	Del inglés, <i>stromal derived factor-1</i>
TAMs	Del inglés, <i>Tumor Associated Macrophages</i>
TERT	Del inglés, <i>telomerase reverse transcriptase</i>
TGF-β	Del inglés, <i>Transforming growth factor beta</i>
TME	Del inglés, <i>Tumor Micro Environment</i>
TMZ	Temozolomida
TNF	Del inglés, <i>Tumor Necrosis Factor</i>
VEGF	Del inglés, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

RESUMEN

El glioblastoma es el cáncer del sistema nervioso central más recurrente y agresivo en pacientes con 64 años en promedio. Es un tumor altamente invasivo y progresa rápidamente, resultando en una esperanza de vida reducida que ronda los 14 meses. El microambiente tumoral en el glioblastoma fomenta su agresividad por la acción de las citocinas secretadas por las células tumorales, la microglía y los macrófagos. Una de las citocinas más relevante es el IFN- γ , que activa al factor de transcripción STAT1 para promover la expresión de *IRF1*, otro factor de transcripción que induce la expresión de genes secundarios como el *PD-L1* que restringe la actividad antitumoral de las células T. Sin embargo, se sabe poco sobre la señalización del IFN- γ sobre la regulación transcripcional en el glioblastoma. Por otro lado, en el glioblastoma, diversos miRNAs están relacionados con la regulación de la proliferación, la evasión de la apoptosis, y la radioresistencia, pero la modulación de su expresión por el IFN- γ no se ha estudiado. Por lo tanto, el interés de este proyecto fue identificar los miRNAs asociados con la progresión del tumor que son inducidos por la activación de la vía del IFN- γ . Para lo anterior se realizó un análisis *in silico* sobre la expresión de los componentes de la vía del IFN- γ en glioblastoma, se analizó la activación de la vía en células de glioblastoma a través de western blot, se realizó un ensayo de viabilidad celular e invasión y finalmente un tamizaje de miRNAs, todo esto bajo el estímulo de 100 ng/mL de IFN- γ . Los resultados de este trabajo indican que la expresión de los elementos de la vía de señalización del IFN- γ está aumentada en muestras de pacientes con glioblastoma, especialmente el receptor del IFN- γ (subunidades IFNGR1 e IFNGR2) y los factores de transcripción STAT1 e IRF1. La activación de la vía canónica de señalización del IFN- γ en las células de glioblastoma LN-18 aumentó los niveles proteínicos del factor de transcripción IRF1 y de uno de sus productos génicos el PD-L1, dando cuenta de su actividad pro-tumoral. El estímulo con IFN- γ no afectó la viabilidad celular, pero sí favoreció significativamente la migración de las células LN-18. Finalmente, se identificó una firma de miRNAs que es regulada diferencialmente por el IFN- γ y que se asocia con un efecto pro-tumoral por influir en respuestas celulares como la proliferación celular, la evasión de la apoptosis, la progresión del ciclo celular, la EMT, y la angiogénesis. En conclusión, en este estudio

se demostró que la activación de la vía de señalización del IFN- γ modula los niveles de expresión de una firma de miRNAs asociados con su efecto pro-tumoral en las células de glioblastoma.

ABSTRACT

Glioblastoma is the most recurrent and aggressive cancer of the central nervous system in 64 years old patients. It is a highly invasive tumor that progresses rapidly, resulting in a short lifespan of around 14 months on average. The tumor microenvironment in glioblastoma promotes its aggressiveness due to the cytokines secreted by tumor cells, microglia, and macrophages. One of the most relevant cytokines is IFN- γ ; its signaling pathway activates the transcription factor STAT1 to promote IRF1 expression, another transcription factor that induces the expression of secondary genes as PD-L1, which restricts the anti-tumor activity of T cells. Nevertheless, the impact of the IFN- γ signaling at the transcriptional level is not completely known. Moreover, in glioblastoma, several miRNAs are related to proliferation, apoptosis evasion, and radioresistance, but the modulation of their expression by IFN- γ has not been studied. Therefore, this project's main interest was identifying IFN- γ -induced miRNAs associated with tumor progression. The results indicate that the IFN- γ signaling pathway elements expression is incremented in glioblastoma patient's samples, especially in two specific points of this pathway: the IFN- γ receptor (IFNGR1 and IFNGR2 subunits) and the downstream transcription factors of this pathway, STAT1, and IRF1. The IFN- γ canonical signaling pathway activation augmented the protein levels of transcription factor IRF1 and the expression of PD-L1, one of its target genes, in the LN-18 glioblastoma cell line. Finally, a miRNA gene signature was identified that was upregulated and downregulated by IFN- γ and was also associated with its pro-tumor effect by inducing cellular responses such as cell proliferation, apoptosis evasion, and cell cycle progression, EMT, and angiogenesis. In conclusion, in this study, we demonstrated that the IFN- γ signaling pathway modulates the expression levels of a miRNA gene signature associated with its pro-tumor effect in glioblastoma cells.

INTRODUCCIÓN

Generalidades del glioblastoma

Los gliomas son el tipo de tumor primario más común en el cerebro, contribuyendo a las principales causas de muerte por tumores primarios en los Estados Unidos de América (Ostrom et al., 2022). Los gliomas se clasifican dentro de seis grupos: 1) Gliomas difusos de tipo adulto dentro del que se encuentra el glioblastoma. 2) Gliomas difusos de bajo grado de tipo pediátrico. 3) Gliomas difusos de alto grado de tipo pediátrico. 4) Gliomas astrocíticos circunscritos. 5) Tumores neuronales y glioneuronales. 6) Ependimomas (Louis et al., 2021).

El glioblastoma, un tipo de glioma tipo adulto de grado 4, es un tumor astrocítico difuso, caracterizado por la presencia de necrosis, proliferación microvascular, mutación del promotor del gen *TERT*, amplificación del gen *EGFR*, ganancia de copias del cromosoma 7 y pérdida de copias del cromosoma 10 (Louis et al., 2021). Este tipo de cáncer es altamente letal y su incidencia incrementa con la edad, siendo los adultos de 75 a 84 años los más afectados (Ostrom et al., 2022). La sintomatología en esta enfermedad es variada, sin embargo, la mayoría de los pacientes presentan dolores de cabeza, déficits sensomotores y afasia. El tratamiento estándar consta de la remoción quirúrgica del tumor acompañada de radioterapia y quimioterapia con Temozolomida (TMZ), el agente alquilante más usado para estos fines. Sin embargo, a pesar del tratamiento descrito, la esperanza de vida de los pacientes se ve reducida considerablemente, rondando los 15 meses después del diagnóstico (Figura 1) (Lim et al., 2011).

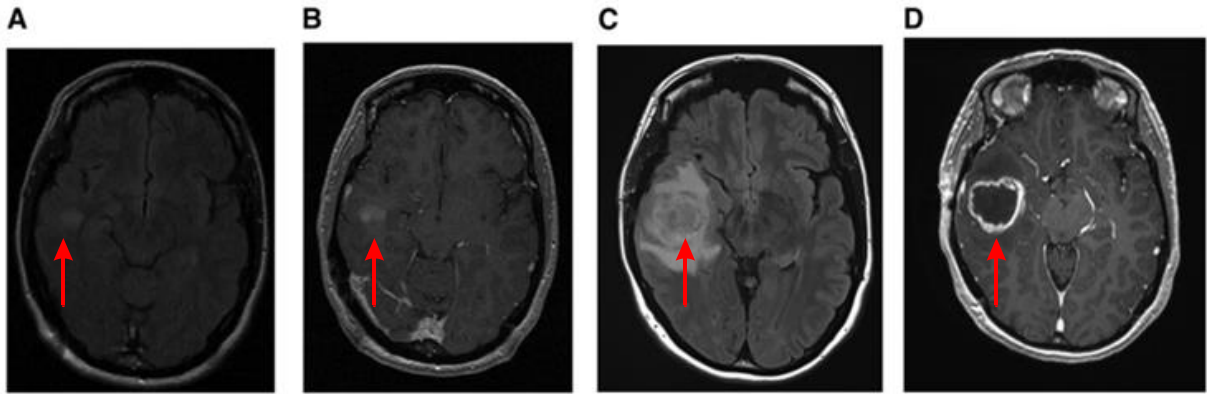


Figura 1. Imágenes de resonancia magnética de un paciente con glioblastoma de rápida evolución. A y B) Tumor alojado en el lóbulo temporal derecho. C y D) Imágenes del mismo tumor, 20 días después de las imágenes A y B (Alexander & Cloughesy, 2017).

Tipos de glioblastoma

Para estudiar a fondo este tipo de cáncer, se ha recurrido a la clasificación basada en diferentes criterios, como: el origen del tumor, su histología y las características génicas de las células tumorales que lo conforman (Louis et al., 2021).

El glioblastoma es un tumor primario que se origina de las células astrocíticas del SNC que, al transformarse en células cancerosas, ganan una o más alteraciones moleculares como son: ganancia de copias del cromosoma 7, pérdida de copias del cromosoma 10, mutaciones en el promotor del gen *TERT*, amplificación del gen *EGFR* y delección homocigota del gen *CDKN2A/2B* (Berger et al., 2022).

En años anteriores la clasificación de los tumores de glioblastoma se apoyaba del uso de un marcador molecular como la mutación del gen de *IDH*, este gen codifica para la enzima IDH participante en el ciclo de Krebs que convierte el isocitrato en α -cetoglutarato; sin embargo, existen mutaciones en este gen que dan como resultado una ganancia de función, lo que conlleva a la generación del oncometabolito 2-hidroxiglutarato que, al acumularse, favorece un metabolismo dependiente de glutamina, inhibe a las desmetilasas de histonas, beneficia la hipermetilación del DNA, causa la inhibición de genes supresores de tumores, aumenta la proliferación y el desarrollo del cáncer (Louis et al., 2007).

Anteriormente se contemplaba una subdivisión del glioblastoma de acuerdo con el estado mutacional de IDH, considerando dos subtipos de glioblastoma, uno

expresando a IDH-wt (wild type, por su significado en inglés) y otro a la IDH-mutante con un mejor pronóstico (Quinones & Le, 2018). Sin embargo, con la reciente actualización de la Clasificación de Tumores del Sistema Nervioso Central (SNC) por la Organización Mundial de la Salud (5ta edición), para que un tumor pueda ser considerado como glioblastoma, estrictamente debe expresar a IDH-wt (Louis et al., 2021).

Adicionalmente se han establecido parámetros moleculares para diferenciar cuatro subtipos principales de glioblastoma con base en las alteraciones génicas más frecuentes en las células que conforman el tumor. Estos subtipos son proneural, neural, clásico y mesenquimal (Z. Chen & Hambardzumyan, 2018). El glioblastoma proneural presenta células con características oligodendrogiales, se desarrolla como un glioblastoma secundario principalmente en pacientes jóvenes y tiene una menor tasa de incidencia. El glioblastoma neural se desarrolla a partir de células astrocíticas y oligodendrocíticas; aunque presenta una firma genética similar a las neuronas normales, se caracteriza por presentar altos niveles de los receptores del Factor de Crecimiento Epidermal (del inglés, EGFR) y una expresión similar al tejido cerebral normal.

El glioblastoma clásico expresa marcadores de precursores de células neuronales y células troncales, así como características de astrocitos mientras que los glioblastomas mesenquimales cuentan con características de gliomas astrocíticos en cultivo (Quinones & Le, 2018; Soomro et al., 2017).

Sin embargo, estudios recientes muestran que dentro de un tumor de glioblastoma se puede encontrar una gran heterogeneidad celular, dado que es común que un solo tumor presente características de diferentes subtipos de glioblastoma, las cuales son dinámicas en función del tiempo de desarrollo del tumor y la respuesta a terapias. Más aún, dentro de esta heterogeneidad celular, se han identificado cuatro estadios celulares: células tipo mesenquimales, tipo astrocíticas, tipo precursoras de células oligodendrocíticas y tipo progenitoras de células neurales. Además, se reconoce una dominancia de estadios celulares determinados en cada tipo de tumor de glioblastoma (p. ej., los tumores de glioblastoma proneurales presentan enriquecimiento en células

del tipo precursoras de células oligodendrocíticas y del tipo progenitoras de células neurales) (Antunes et al., 2020).

Aspectos clínicos del glioblastoma

Los síntomas del glioblastoma son variados entre pacientes y esta variación se ha visto influenciada por la localización y tamaño del tumor (Alexander & Cloughesy, 2017; Iacob & Dinca, 2009). El tumor de glioblastoma se aloja principalmente en el lóbulo frontal seguido del lóbulo temporal y el parietal; sin embargo, en casos raros el glioblastoma también se desarrolla en el lóbulo occipital, el cerebelo, el tallo encefálico y la médula espinal. Cerca de la mitad de los glioblastomas se infiltran en más de un lóbulo cerebral y cerca del 5% crecen de forma multifocal (Wirsching et al., 2016).

Los principales síntomas que presentan los pacientes con glioblastoma son producto del aumento de la presión intracraneal por el rápido crecimiento de la masa tumoral, tales como cefaleas, fatiga, entumecimiento, pérdida o dificultades para la visión, afasia, hemiparesia, hemiplejía, náuseas, vómitos, mareos, entre otros (Iacob & Dinca, 2009; Wirsching et al., 2016).

La epilepsia es un síntoma que ocurre con frecuencia en pacientes cuyo tumor se localiza en el lóbulo temporal. Este se presenta en más de la mitad de los casos de glioblastoma durante el curso de la enfermedad y está asociado con una supervivencia más larga por facilitar un diagnóstico más temprano, su ubicación cortical y un tamaño tumoral menor, lo que favorece una buena resecabilidad (Wirsching et al., 2016).

La aparición de algunos síntomas sutiles da lugar al diagnóstico erróneo en los pacientes, lo que reduce significativamente su calidad de vida y la probabilidad de supervivencia. Los cambios de personalidad y desórdenes de carácter son síntomas que presentan pacientes con tumores localizados en el lóbulo frontal y con frecuencia se interpretan como condiciones psicológicas o trastornos psiquiátricos. Por otra parte, síntomas como confusión, pérdida de la memoria o hemiparesia se traducen como signos del proceso de envejecimiento normal del paciente (Yuile et al., 2006). Por lo tanto, la calidad de vida en la mayoría de los pacientes con glioblastoma se ve impactada severamente por la acumulación gradual de síntomas y el aumento en la gravedad de los ya existentes.

El glioblastoma es el tumor maligno de grado 4 más común dentro del SNC; representa el 14.2% de todos los tumores en el SNC y el 50.1% de los tumores primarios malignos del cerebro en el periodo 2015-2019 en los Estados Unidos de América. En México los datos de la epidemiología del glioblastoma son limitados, sin embargo, Aguirre-Cruz y sus colaboradores en 2020 reportaron que de 1965 a 2014 se presentaron 1270 casos de glioblastoma en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, lo que corresponde al 55.5% de los tumores astrocíticos de ese periodo (Aguirre-Cruz et al., 2020). La incidencia anual de este tipo de tumor es de 3.26 por cada 100,000 habitantes y su probabilidad incrementa conforme avanza la edad, siendo diagnosticado principalmente en pacientes de 65 años, aunque la ventana de incidencias va de los 65 a los 84 años. El glioblastoma es 1.6 veces más común en hombres y 1.95 veces más común en la población caucásica (Figura 2) (Ostrom et al., 2022).

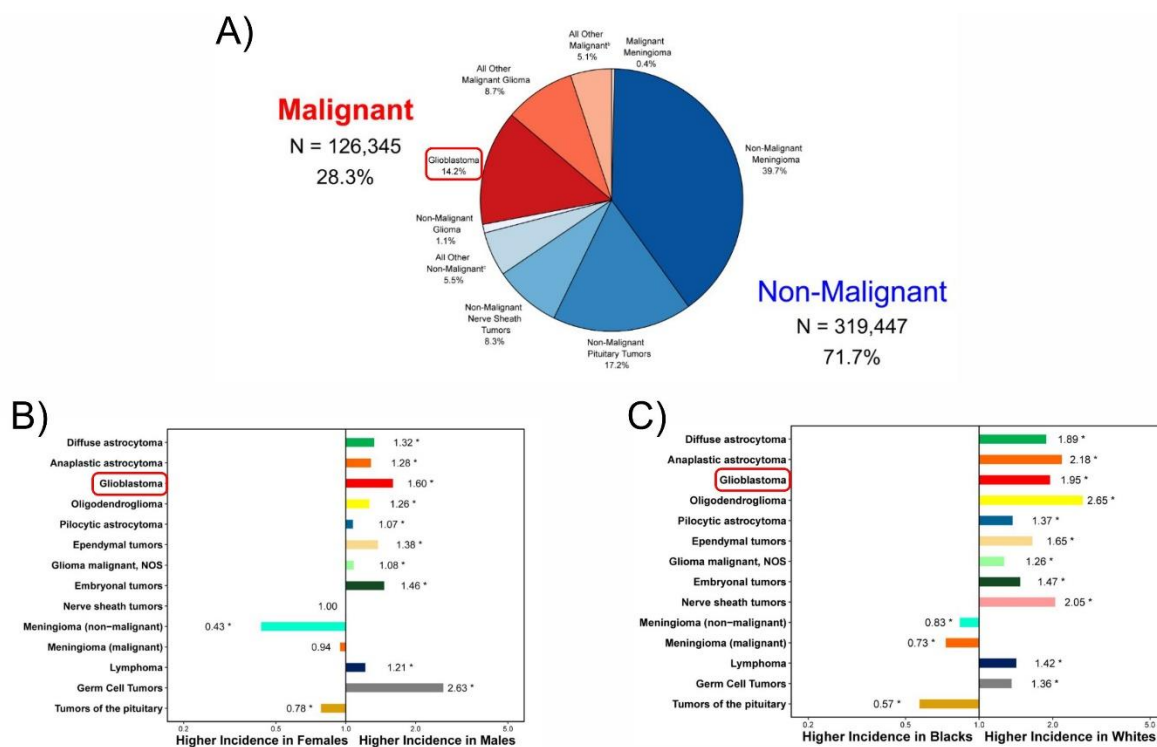


Figura 2. Epidemiología del glioblastoma. El glioblastoma es el más recurrente de los tumores malignos del SNC (A). Sucede principalmente en hombres (B) caucásicos (C) de 64 años en promedio (Ostrom et al., 2022).

La supervivencia de los pacientes que padecen glioblastoma es baja y está influenciada por la edad del paciente. Sólo el 6.9% de los pacientes sobreviven más

allá de los 5 años después de ser diagnosticados, pero es mayor en aquellos pacientes diagnosticados en edades menores a los 20 años (Ostrom et al., 2022).

Los pacientes que padecen glioblastoma a menudo reciben un diagnóstico tardío debido a la presencia frecuente de síntomas sutiles e inespecíficos como dolores de cabeza, confusión, pérdida de memoria, y cambios de personalidad. Sin embargo, a medida que avanza la enfermedad, frecuentemente se presentan síntomas como convulsiones o déficits neurológicos que favorecen el inicio de estudios en busca de un diagnóstico (Jovčevska, 2019). Para el diagnóstico, se utilizan técnicas como la resonancia magnética y la tomografía computarizada con contraste, y se confirma con inmunohistoquímica (IHQ), principalmente (Wirsching et al., 2016).

La resonancia magnética es la herramienta más utilizada ya que es la más sensible y específica. Bajo este método, el tumor se observa como una lesión infiltrante, heterogénea, realzada por un anillo con necrosis central y edema circundante. La apariencia del glioblastoma puede variar y en ocasiones se observa una lesión inicial pequeña sin realce, que, al pasar algunos días, crece y se ajusta a la descripción previa (Alexander & Cloughesy, 2017). Las imágenes obtenidas pueden ser confundidas con otras lesiones como abscesos o metástasis de tumores cerebrales, por lo que es necesario el uso de técnicas de análisis del tejido para confirmar el diagnóstico, como la IHQ. A pesar de no contar con la misma exactitud y sensibilidad que la resonancia magnética, en casos puntuales (p. ej., cuando el paciente posee marcapasos) la tomografía computarizada con contraste también es utilizada como herramienta inicial de diagnóstico (Wirsching et al., 2016).

La confirmación del diagnóstico usualmente se realiza con muestras de tejido tomadas tras la extracción del tumor, o de biopsias para realizar una técnica histológica e IHQ. El aspecto histológico del glioblastoma incluye necrosis, proliferación microvascular, pleomorfismo, anaplasia, invasividad, entre otros. Se utilizan marcadores para IHQ como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) para confirmar la diferenciación del linaje astrocítico, MIB-1/Ki-67 para evaluar la proliferación celular y el anticuerpo para la proteína IDH-1 mutante para obtener más información sobre la firma génica del tumor.

Estrategias terapéuticas actuales para el glioblastoma

La estrategia terapéutica estándar que se sigue para tratar a los pacientes con glioblastoma está conformada por tres métodos: cirugía, radioterapia y quimioterapia.

La extracción quirúrgica del tumor es el primer paso en el tratamiento contra el glioblastoma, la extensión de la cirugía depende de la localización y las áreas cerebrales involucradas. Con este procedimiento, los pacientes reportan mejoras, como la liberación de la presión intracraneal, la reversión de déficits neurológicos, entre otros (Alexander & Cloughesy, 2017). Sin embargo, la cirugía no garantiza la eliminación definitiva del tumor. Por la naturaleza altamente infiltrativa de este tipo de células tumorales, el tumor de glioblastoma no puede extirparse por completo (Wirsching et al., 2016). Se ha reportado que, a partir del borde visible del tumor, en un margen de 0 a 2 cm es posible encontrar hasta un 6% de células cancerosas dentro de la población celular total, en un margen de 2 a 4 cm se encuentra 1.8% de células cancerosas y 0.2% en un margen mayor a 4 cm (Iacob & Dinca, 2009). Por esta razón, la cirugía debe ser acompañada por otros enfoques terapéuticos.

La radioterapia es la estrategia de seguimiento posterior a la cirugía. El tratamiento inicia en promedio a los 5 días posteriores a la intervención quirúrgica y se administra durante 6 a 7 semanas, 5 veces a la semana, en áreas del cerebro específicas definidas por resonancia magnética. Este enfoque terapéutico representa una ventaja modesta en la evolución de los pacientes, aunque el crecimiento del tumor durante la radioterapia es un signo de mal pronóstico, ya que indica la radioresistencia del tumor. La principal razón de la radioresistencia es la hipoxia que presentan los tumores en comparación con el tejido saludable adyacente, que puede evaluarse cuantificando el nivel del factor de transcripción HIF-1 α que es un marcador de la hipoxia y de la radioresistencia en los tumores. En general, la radioresistencia de algunos tumores, la naturaleza infiltrativa de los tumores de glioblastoma, el riesgo de necrosis por radiación y el daño neuronal permanente inducido por la radiación, hacen necesario el acompañamiento de la radioterapia con quimioterapia (Iacob & Dinca, 2009).

La quimioterapia es el factor complementario del tratamiento de rutina en pacientes con glioblastoma, con la que se busca favorecer la supervivencia de los pacientes en

conjunto con la radioterapia. Los agentes alquilantes son los agentes quimioterapéuticos más usados en glioblastoma, dentro de los que se encuentra la TMZ, un fármaco que ha sido ampliamente utilizado por sus bajos niveles de toxicidad hacia las células normales y por la tolerancia del paciente (S. Wang et al., 2019). Es un agente de metilación que, en el DNA de células cancerosas, genera lesiones llamadas O6-metilguanina (O6-mG), lo que induce el arresto del ciclo celular en el *checkpoint* G2/M y la eventual apoptosis de las células (Sasmita et al., 2018). Sin embargo, este daño puede ser reparado por una DNA alquil-transferasa codificada por el gen O6-metilguanina-metiltransferasa de DNA (*MGMT*), por lo que el nivel de expresión del gen *MGMT* está estrechamente relacionado con la eficacia del tratamiento con TMZ. Este fármaco, solo o en conjunto con la radioterapia ha mejorado significativamente la supervivencia de los pacientes con glioblastoma más allá de 2 años, lo que, en glioblastoma es considerado como una supervivencia de largo tiempo (Iacob & Dinca, 2009).

Se ha demostrado que el uso de terapias coadyuvantes mejora en gran medida el estado físico y la supervivencia de los pacientes. La terapia anti-angiogénica ha sido de las más utilizadas, ya que la angiogénesis es una característica definitoria del glioblastoma, que es mediada principalmente por el VEGF (del inglés, Vascular Endotelial Growth Factor). Por esta razón, los anticuerpos anti-VEGF como el bevacizumab han sido ampliamente aplicados en glioblastoma y otros tumores, teniendo resultados favorables entre los pacientes. Esta terapia se administra en dosis de 10 mg/kg de peso corporal de manera intravenosa de forma semanal y en general, esta dosis es tolerada adecuadamente por la mayoría de los pacientes, aunque algunos desarrollan efectos adversos como hipertensión arterial, en la mayoría de los casos y algunos otros efectos raros como hemorragias, eventos tromboembólicos, complicaciones en la cicatrización de heridas, falla congestiva del corazón y perforaciones gastrointestinales (Iacob & Dinca, 2009).

El microambiente tumoral en el glioblastoma

Los tumores son capaces de modificar el fenotipo de las células estromales creando un TME favorecedor para el desarrollo y progresión del propio tumor. En el caso de

glioblastoma, el TME es altamente complejo, conformado por diferentes tipos celulares como células endoteliales, células inmunes, células de glioblastoma, CGT (células de glioblastoma tipo troncales), astrocitos, fibroblastos, microglía y macrófagos, así como factores secretados por estas células como polisacáridos, hormonas, citocinas, entre otros (Hernández et al., 2021; Simon et al., 2020).

La complejidad del TME en el glioblastoma permite la formación de regiones dentro del tumor llamadas “nichos” con características específicas. En glioblastoma se han descrito cuatro principales nichos, como el nicho inflamatorio, el nicho hipóxico/necrótico situado al centro del tumor, el nicho perivascular y el nicho infiltrativo/frente invasivo situado en los bordes del tumor (Figura 3) (Dapash et al., 2021; Şovrea et al., 2022).

Las células de glioblastoma son los componentes principales que inician la formación del TME. Estas células propician un gran dinamismo en el flujo de información junto con otros tipos celulares a través de la secreción de moléculas, y como resultado diferentes mecanismos moleculares expresados por factores genéticos y epigenéticos inducen la proliferación descontrolada del tumor, la angiogénesis y la invasión (Şovrea et al., 2022). Las células cancerosas secretan quimiocinas al TME que favorecen la angiogénesis y atraen macrófagos y microglía, a su vez, interaccionan con la microglía para incrementar su invasividad a través de citocinas y factores de crecimiento.

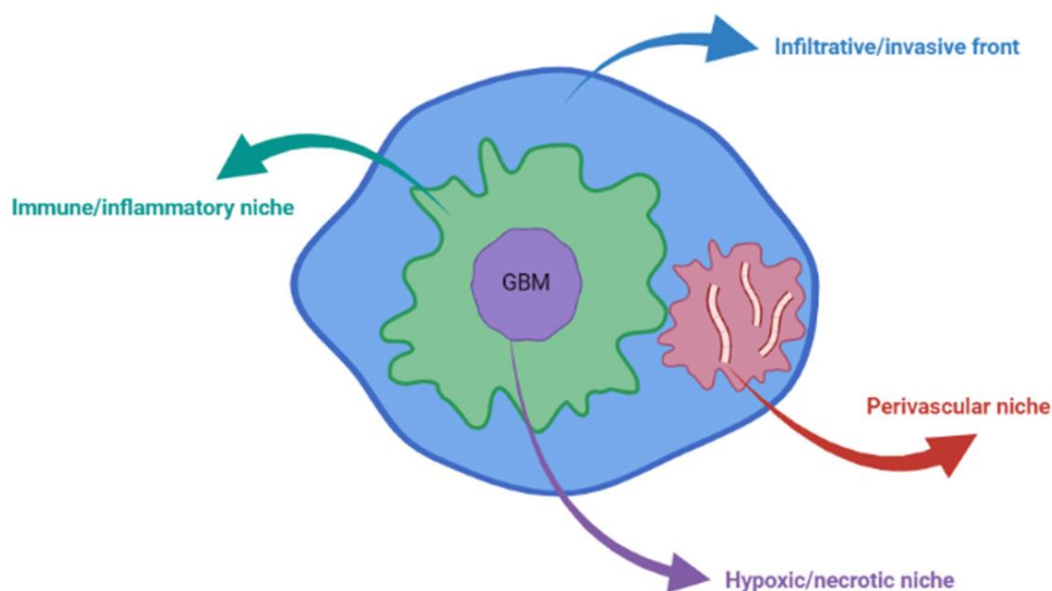


Figura 3. Esquemización de la distribución de los nichos en el TME de glioblastoma. El glioblastoma presenta áreas dentro de su TME con capacidades específicas llamadas nichos, dentro de estos se encuentran el nicho inflamatorio, el nicho perivascular, el nicho hipóxico y el nicho infiltrativo (Şovrea et al., 2022).

Las vesículas extracelulares (EV) son una de las principales herramientas de las que se valen las células de glioblastoma para comunicarse bidireccionalmente con el resto de los elementos del TME. Las EV son vesículas rodeadas por una membrana que se desprenden de las células hacia el TME, transportan en su interior moléculas como proteínas y ácidos nucleicos y los entregan a células receptoras que pueden estar a cortas o largas distancias para modular su comportamiento (Yekula et al., 2020). Al interactuar con células endoteliales, las EV promueven la angiogénesis, cuando lo hacen con los astrocitos promueven la degradación de la ECM, pueden inducir la evasión de la apoptosis de los astrocitos y la expresión de PD-L1 en su superficie como para favorecer un TME inmunosupresor (Dapash et al., 2021).

Por su parte las células de glioblastoma tipo troncales (CGT) son un reservorio de autorrenovación y diferenciación en diferentes linajes celulares que contribuyen a la heterogeneidad del tumor. Está reportado que existe una asociación entre el número de CGT en la masa tumoral con la capacidad de invasión del tumor que son favorecidas por los tumores asociados al tumor (TAMs) (Dapash et al., 2021).

La barrera hematoencefálica (BBB) supone un filtro para el flujo selectivo de células y moléculas hacia y desde el cerebro. Está formada por la interacción de la membrana

basal que rodea los capilares sanguíneos, los podocitos de astrocitos adheridos a la superficie de capilares y por células endoteliales de capilares sanguíneos, entre las cuales se forman uniones estrechas que son las principales responsables de esta barrera selectiva (Snell, 2014). La BBB se ve comprometida bajo la influencia del glioblastoma por el estímulo inflamatorio prolongado y el aumento de la vascularización por la concentración elevada del VEGF, lo que aumenta su permeabilidad y permite el paso de células inmunes contribuyendo al incremento del nicho inflamatorio. Por otra parte, el flujo limitado de sangre a áreas necróticas centrales del tumor habilita regiones hipóxicas que atraen macrófagos y promueven su fenotipo inmunosupresor (Dapash et al., 2021).

Una porción importante del TME de glioblastoma lo conforman las células residentes del SNC como las células gliales. Durante el crecimiento del tumor, los astrocitos normales son desplazados por astrocitos asociados al tumor y sufren astrogliosis reactiva que se caracteriza por cambios morfológicos y funcionales ante estímulos inflamatorios, contribuyendo a la infiltración celular del tumor (Henrik Heiland et al., 2019). Además, se ha reportado que los astrocitos asociados al tumor contribuyen a la evasión inmune en el glioblastoma. Por su parte la microglía es reclutada al TME por señales de las células tumorales, como GM-CSF, SDF-1, GDNF y EV que inducen cambios genotípicos y fenotípicos que disminuyen su actividad anti-tumoral lo que a su vez promueve la secreción de factores como GM-CSF, CXCL3 y SDF1, contribuyendo a un efecto inmunosupresor dentro del TME (Dapash et al., 2021).

En el glioblastoma, la ECM dentro del TME sufre cambios que conllevan al incremento de la rigidez de la ECM por el aumento de la secreción de factores como el ácido hialurónico, la fibronectina, la trombospondina y la tenascina-C por las células de glioblastoma, lo que, en conjunto con el edema presente, son los factores de estrés físico que desencadenan el aumento de rigidez en la ECM y que originan y favorecen la gliomagénesis (mecanismos moleculares y celulares que originan el glioma). Un elemento que resalta en el TME de glioblastoma es su nicho inflamatorio que lo convierte en un tumor “frío” por su alto contenido en células B y T, así como células mieloides, lo que genera un escenario inmunosupresor rico en citocinas, quimiocinas

y células inmunes que complica el desempeño de inmunoterapias dirigidas contra el glioblastoma (Dapash et al., 2021).

Factores inflamatorios en el TME

A diferencia de un tejido saludable, en el que, al presentarse una amenaza, las células inmunes detectan el daño, y responden produciendo citocinas y quimiocinas para reclutar a otras células inmunes, e inician el ataque y, activan a las células estromales, para después de eliminada la amenaza, resolver la inflamación y devolver el tejido a la homeostasis; en un tumor, la resolución de la inflamación no ocurre y así es como se desarrolla el TME inflamatorio (Pitt et al., 2016).

Al TME lo conforman las interacciones entre diferentes factores, como células tumorales, células inmunes, fibroblastos, células estromales, matriz extracelular y factores solubles (p. ej., citocinas y quimiocinas). Dentro de este microambiente, la influencia de las células cancerosas sobre el resto del TME, comienza a crear una atmósfera inmunosupresora que protege al tumor del ataque inmune, promoviendo así el crecimiento y progresión de este. Los factores solubles que favorecen este escenario son factores de crecimiento y citocinas como el EGF, el TGF- β y algunos factores de crecimiento de fibroblastos, por mencionar algunos; además, existen diferentes proteasas secretadas por macrófagos, monocitos y granulocitos, capaces de modificar la matriz extracelular (Figura 4) (Pitt et al., 2016).

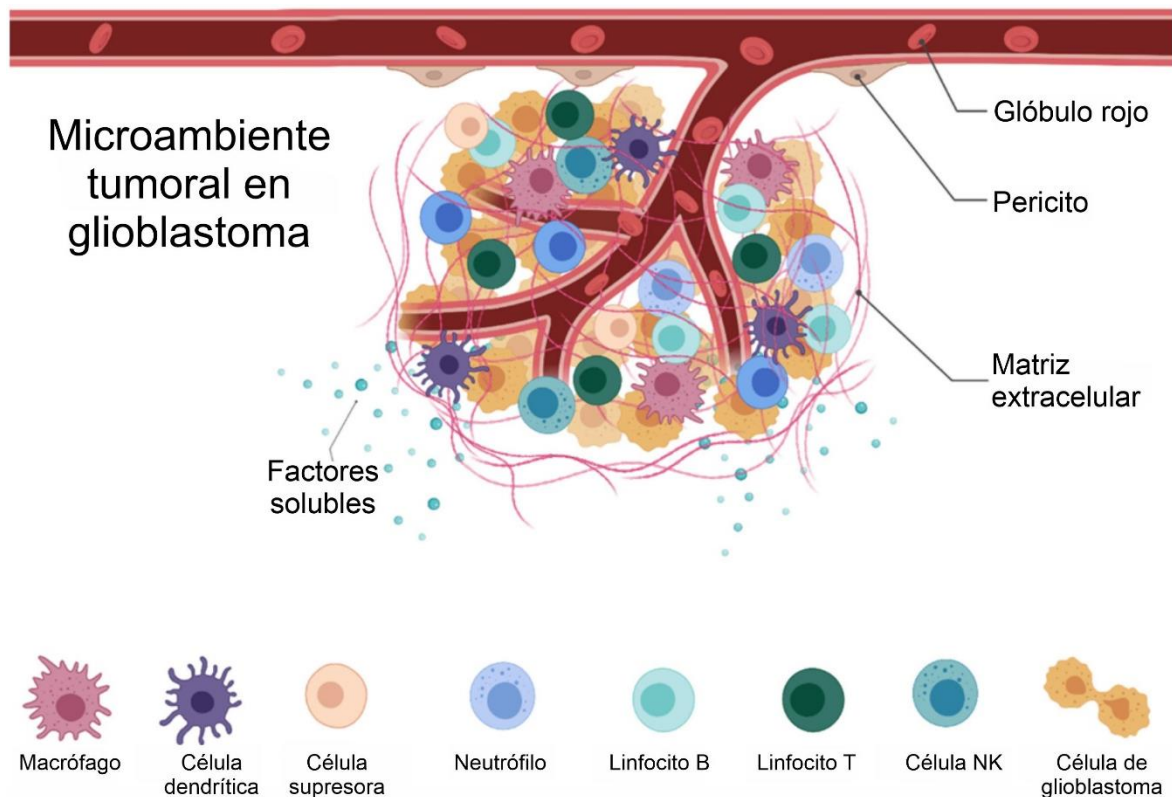


Figura 4. Complejidad del TME de glioblastoma. Dentro del TME se encuentran Macrófagos, células dendríticas, MDSCs, neutrófilos, linfocitos B, linfocitos T, NK, células cancerosas, factores solubles y ECM (Dapash et al., 2021)

En el TME con una composición tan diversa, cada tipo celular tiene su propio papel que en conjunto propician un ambiente inflamatorio. Las MDSCs son células que derivan de células progenitoras mieloides, que en vez de diferenciarse en células dendríticas, granulocitos o macrófagos como se haría en un contexto homeostático, en patologías como el cáncer, son reclutadas al TME por las células cancerosas y son capaces de suprimir a las células NK y a las células T, a través de la secreción de citocinas, así como por una regulación positiva del óxido nítrico, de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y actividad incrementada de la L-arginasa que reduce la concentración en el microambiente de la L-arginina, de la cual depende la activación y proliferación de las células T (Varner & Schmid, 2010). Las células T reguladoras (Treg), por su parte inhiben la inmunidad anti-tumoral por interferir en la inmunidad innata y adaptativa. Esto lo hacen a través de la inhibición de la función de las células NK, de las células presentadoras de antígeno (APC) y de las células T. Las

iTregs se generan en el TME por su migración del sistema linfático o circulatorio, gracias a la supresión de las APCs por moléculas en el TME, por su diferenciación, en respuesta a la estimulación y expansión de las células dendríticas (DC), y por la conversión de células T efectoras a Tregs bajo el estímulo del TGF- β . Los TAMs tienen un fenotipo similar a los macrófagos M2 (inmunosupresores), ya que propician el crecimiento tumoral y la metástasis, previniendo la proliferación y la activación de las células T a través de la secreción de quimioatrayentes como la IL-10, prostaglandinas y TGF- β (Maimela et al., 2019). Las células T efectoras (células Th1, Th2, Th17, de memoria y citotóxicas) funcionan en respuesta a reconocimiento de complejos péptido-complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en presencia de moléculas co-estimuladoras. Un sublinaje de células T efectoras son las células T citotóxicas (T CD8+), que junto con las células NK son muy importantes para la eliminación de las células cancerosas. Estas secretan interleucinas como el IFN- γ en el TME, lo que promueve la función citotóxica de este tipo de células (Alshaker & Matalka, 2011).

En el TME se encuentran las células cancerosas que poseen mecanismos de evasión inmune como la expresión de receptores co-inhibitorios como PD-L1, que se une a PD-1 en las células T CD8+ para volverlas anérgicas. También son capaces de expresar en su superficie CD39 y CD73 que permiten metabolizar el ATP en adenosina, un conocido inmunosupresor que actúa sobre las células T CD8+ (Maimela et al., 2019).

En el TME, se presentan diversos tipos de factores que cooperan en la formación de un microambiente inflamatorio, dentro de estos se encuentran laIDO (indoleamina-2,3-dioxigenasa) que es una enzima que metaboliza el paso de triptófano a kinurenina, un metabolito inhibidor de las células T, que, en altas concentraciones, además de inhibirlas, induce su apoptosis y favorece la formación de Tregs en el TME que contribuyen a mayor secreción deIDO por las DC (Figura 5) (Jung et al., 2022).

En conclusión, el TME está conformado por una combinación aparentemente “caótica” pero funcional (para el tumor) de células y factores solubles que permiten el crecimiento y progresión del tumor.

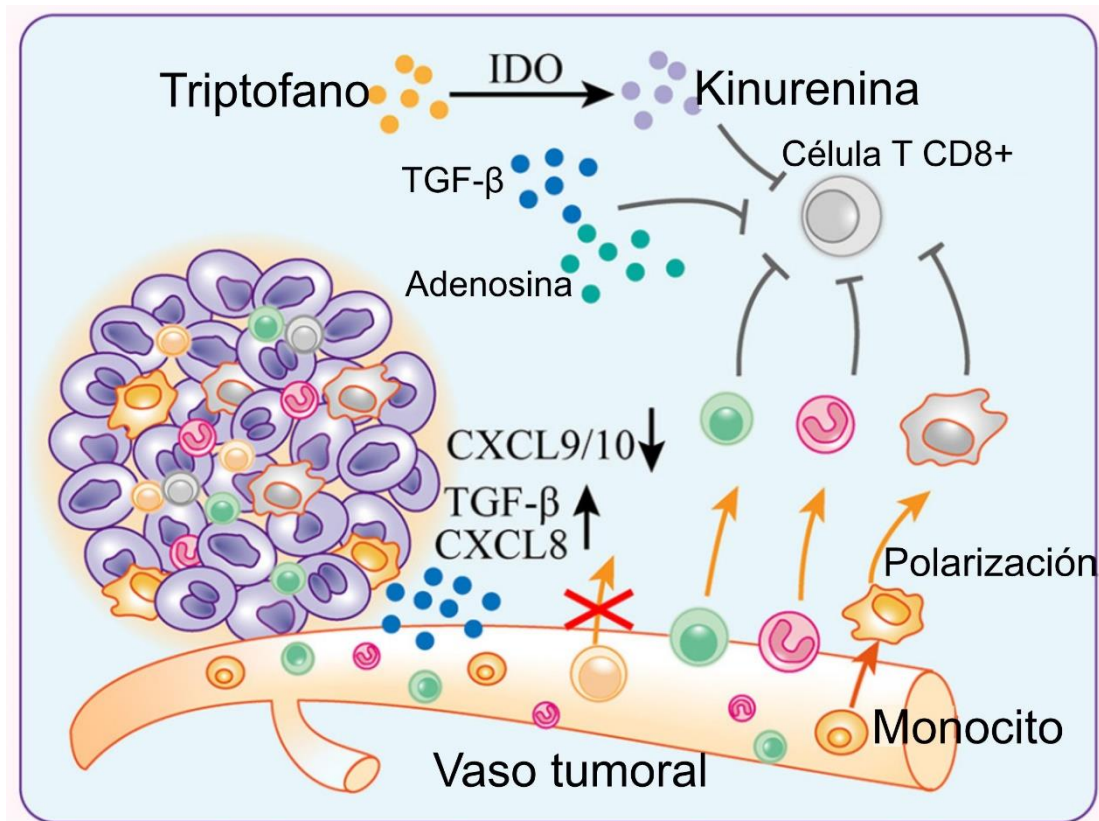


Figura 5. Factores solubles en el TME. Además de la complejidad en la composición celular del TME, también existe una mezcla de factores solubles que funcionan como forma de comunicación en el TME y que favorecen el crecimiento y progresión del tumor. Dentro de esta se encuentran citocinas, quimiocinas y algunos metabolitos inmunosupresores (Lei et al., 2020).

Citocinas importantes en el TME

En el TME, además de la compleja composición celular, coexisten los factores solubles secretados por las células al microambiente como una forma de comunicación y respuesta a las demandas de las células tumorales. Entre los que se encuentran cohabitando en el TME, están los metabolitos mencionados previamente, las quimiocinas encargadas del reclutamiento de células inmunes al TME y las citocinas. Estas últimas son muy importantes en la respuesta inmune y bajo un contexto de cáncer, ya que son capaces de inducir diferentes respuestas pro-tumorales, entre las que se encuentran la proliferación, la invasión, la EMT, la angiogénesis, entre otros.

La citocina TGF- β es producida por la mayoría de las células, por lo que en cáncer es una de las citocinas protagonistas de los eventos pro-tumorales en el TME, aunque está reportado que en etapas tempranas de los tumores induce el arresto del ciclo

celular en la fase G1, a través de la represión de la expresión del gen *MYC* por SMAD3; o también lo hace a través de la expresión de p15INK4, p21CIP1, p27KIP1 y p57KIP2 (Batlle & Massagué, 2019). Además, esta citocina bloquea la expresión de las proteínas Id1, Id2 e Id3, inhibiendo así el crecimiento celular; y promueve la apoptosis a través de TIEG1 que es un supresor de Bcl2. Sin embargo, a medida que el tumor progresa, las funciones del TGF- β se tornan pro-tumorales. Por ejemplo, el TGF- β induce el proceso de EMT al incrementar la expresión de SNAIL, ZEB y TWIST que reprimen la expresión de E-cadherina y así se modifica la adhesión celular, la polarización y la reorganización del citoesqueleto; además de favorecer la actividad de las MMP que remodelan la matriz extracelular (Duivenvoorden, 1999; Ma et al., 2020). El TGF- β es importante en la promoción de la angiogénesis, ya que induce la expresión de VEGF, además, es un inductor importante de la evasión inmune, ya que reduce la diferenciación de células T efectoras y promueve la actividad de las Tregs. Sin embargo, un consenso en cuanto a la función del TGF- β es que las respuestas celulares inducidas dependen en gran medida del estadio y del tipo de tumor (Zhao et al., 2020).

Las células CD8+, los neutrófilos y los eosinófilos secretan IL-17 al TME y, al unirse a su receptor expresado en células epiteliales, endoteliales y fibroblastos, induce la liberación de IL-1, IL-6, IL-8, IL-23, TNF- α , entre otras citocinas proinflamatorias. Para la IL-17 se reportan actividades anti-tumorales como el aumento de la presentación de antígenos en moléculas del MHC I y II y la inducción de la inmunidad antitumoral específica en líneas de fibrosarcoma (Kryczek et al., 2009). En un modelo de ratones *knockout* para IL-17, esta citocina fue esencial para el crecimiento tumoral y la metástasis a pulmón, por otra parte, las células Th17 previnieron el desarrollo del tumor y favorecieron la eficacia de terapias anti-tumorales (Martin-Orozco et al., 2009). Sin embargo, también se ha reportado que la IL-17 induce angiogénesis actuando sobre las células estromales, endoteliales y tumorales; estimula la migración de células endoteliales-vasculares y favorece la formación de vasos sanguíneos *in vitro*, lo que da paso a la vascularización y crecimiento del tumor; en un modelo murino de cáncer cervical, promovió la tumorigenicidad y el crecimiento tumoral (O'Sullivan et al., 2014; Takahashi et al., 2005; Wakita et al., 2010). Mientras que la falta de IL-17 redujo el

crecimiento tumoral en células de cáncer de mama, retrasa el desarrollo de papiloma (Dunn et al., 2006). Estas respuestas son dadas por la vía de señalización de IL-17 que induce la secreción de la IL-6 en las células estromales y las células neoplásicas que como consecuencia induce a la activación de STAT3 (Alshaker & Matalka, 2011).

La IL-6 es secretada por fibroblastos, células tumorales y células inmunes en el TME. Promueve la proliferación celular y la metástasis a través de STAT3 para inhibir a las DCs. IL-6 puede inducir autofagia a través de la unión a su receptor y por la activación de AMPK y Akt, lo que promueve la liberación de IL-6 por la activación de la vía de NF- κ B (Lu et al., 2018); una vía alterna de inducción de autofagia es la regulación positiva de la expresión de NS5ATP9 a través de la señalización de NF- κ B. Por otra parte, IL-6 induce la expresión de HIF-1 α que inicia el proceso de angiogénesis, además de participar en la resistencia a fármacos al regular la expresión de Bax/Bcl-2, P-gp y MRP1, así, la IL-6 protege a las células cancerosas de la citotoxicidad y de la apoptosis inducida por las quimioterapias (Li et al., 2020).

La TNF- α es una citocina secretada por macrófagos, células T CD4+ y células NK. Esta citocina induce una serie de señales que activan 3 cascadas de señalización importantes como la de NF- κ B, las MAPK y la apoptosis (Shen et al., 2018; W. Zhou et al., 2015). A través de la regulación positiva de IL-8 y VEGF, TNF- α induce la angiogénesis en glioma (Nabors et al., 2003); mientras que en células de cáncer ovárico estimula una serie de citocinas, quimiocinas y factores angiogénicos que favorecen la neovascularización e invasión (Kulbe et al., 2007). En un modelo murino de metástasis pulmonar, TNF- α induce la neovascularización a través de la expresión de HGF y favorece la invasión a través de las metaloproteasas MMP2, MMP3, MMP9 y MMP12 (Cheng et al., 2007; Estève et al., 2002; Hagemann, 2004). Por el contrario, TNF- α también tiene actividades en contra del desarrollo del tumor como las respuestas inmunes anti-tumorales por parte de los linfocitos T o macrófagos infiltrados al tumor (X. Wang & Lin, 2009).

Los interferones (IFNs) son una familia de citocinas secretadas por casi todas las células del organismo, se clasifican en tres grandes grupos: IFNs de tipo I conformados por IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ e IFN- ω ; IFNs de tipo II con el IFN- γ como único miembro

y los IFNs de tipo III integrados por los IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3 y IFN- λ 4. Estas citocinas inducen respuestas celulares a través de sus cascadas de señalización entre las que destaca la actividad anti-viral (IFNs tipo I y III); sin embargo, también generan respuestas relevantes en el desarrollo del cáncer (Parker et al., 2016). Los IFNs están completamente involucrados en el ciclo de inmunidad del cáncer, que engloba eventos como: 1) mutación y/o sobreexpresión de oncogenes en cáncer que dan como resultado neoantígenos. 2) muerte de células tumorales y liberación de neoantígenos. 3) activación de células T por los neoantígenos presentados por las APCs, 4) infiltración al TME de las células T activadas en donde reconocen y eliminan a las células cancerosas con los mismos antígenos tumorales y 5) liberación de más antígenos y repetición del ciclo (Kim et al., 2007).

Los IFNs α y β inducen las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis en células tumorales a través de la expresión de *TP53*; inducen la producción de los factores proapoptóticos TRAIL y FAS. De manera similar los IFN- λ 1, IFN- λ 2 e IFN- λ 4 inducen la muerte celular en algunos tipos de tumores (Kearney et al., 2018; Swann et al., 2007). Los antígenos tumorales son presentados principalmente a las células T CD8+ a través del MHC I, y todos los tipos de IFNs promueven la presentación de antígenos por las DCs; con el reconocimiento de estos antígenos, las células T se activan por un proceso en el que la presencia de los IFNs es condicionante. Una vez activas, las células T deben transitar e infiltrarse al TME, para lo cual se requiere de la acción de quimiocinas como CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 y CXCL10; estas son secretadas por DCs, fibroblastos y células tumorales por la influencia de los IFNs. Finalmente, una vez infiltradas al TME, las células T deben reconocer a las células tumorales y ejercer su actividad citotóxica a través del reconocimiento de péptidos en moléculas del MHC I por los TCR, proceso que también está reforzado por la influencia de los IFNs, al incrementar la presentación de antígenos asociados a tumor en la membrana de células tumorales, al promover la expresión de moléculas del MHC I (Propper et al., 2003). Aunado a la regulación del ciclo de inmunidad tumoral, los IFNs también están relacionados con procesos celulares en el TME como la angiogénesis y la regulación de ciclo celular, procesos esenciales para el desarrollo y progresión de los tumores (X. Zhang et al., 2021).

El IFN- γ es el único integrante del grupo II de IFNs, induce diferentes respuestas de forma directa o indirecta a través de su vasta influencia en la expresión génica, como se revisará a continuación.

ANTECEDENTES

Vía de señalización canónica del IFN- γ

Las células NK, las células T, las APCs, las células B, e incluso las células tumorales son las principales productoras de IFN- γ , mientras que las principales células con receptores para esta citocina son los macrófagos, las células T y las células cancerosas, en donde induce diferentes respuestas a través de la modificación de la expresión génica (Burke & Young, 2019). Estas respuestas son llevadas a cabo a través de la vía de señalización canónica que inicia con el receptor heterotetramérico del IFN- γ conformado por dos subunidades IFNGR1 y dos subunidades IFNGR2 (Alspach et al., 2019). Cada una de estas subunidades cuentan con un dominio extracelular y un dominio intracelular con funciones específicas en el receptor. IFNGR1 es la encargada de aumentar la afinidad por el ligando y de asociarse fuertemente a IFNGR2, mientras que esta última es la encargada de transducir la señal hacia sus dominios intracelulares. En la región intracelular de este receptor, se encuentran asociadas las cinasas JAK1 y JAK2 a las subunidades IFNGR1 e IFNGR2, respectivamente (Figura 6A) (Bach et al., 1997; Burke & Young, 2019). Durante la transducción de la señal, ocurre un cambio de reorientación que acerca a las subunidades del receptor y junto con ello, acerca a las cinasas JAK1/2 que se activan por transfosforilación; una vez activas, JAK1/2 fosforilarán a IFNGR1 en el residuo Y440 lo que genera dos sitios de acoplamiento específicos para el complejo homodimérico de la proteína citoplasmática STAT1 (Figura 6B) (Bach et al., 1997; Krause et al., 2006).

Cuando STAT1 se une al receptor del IFN- γ , sufre una fosforilación en el residuo Y701, lo que resulta en la reorientación antiparalela del homodímero de STAT1; así, el homodímero pSTAT1:pSTAT1 se desacopla del receptor y se encuentra en su forma activa para translocarse al núcleo y llevar a cabo su función de factor de transcripción al unirse a las secuencias llamadas GAS (por su significado en inglés, *Gamma*

Activated Sequences) en las regiones promotoras de un gran número de genes que en conjunto reciben el nombre de ISGs (por su significado en inglés, *Interferon Stimulated Factors*). Para que la acción transcripcional de STAT1 sea llevada a cabo satisfactoriamente, requiere de proteínas coactivadoras, como p300, CBP y MCM5, a las que se une a través de su dominio TAD (Figura 6C) (Jorgovanovic et al., 2020; Schindler et al., 2007).

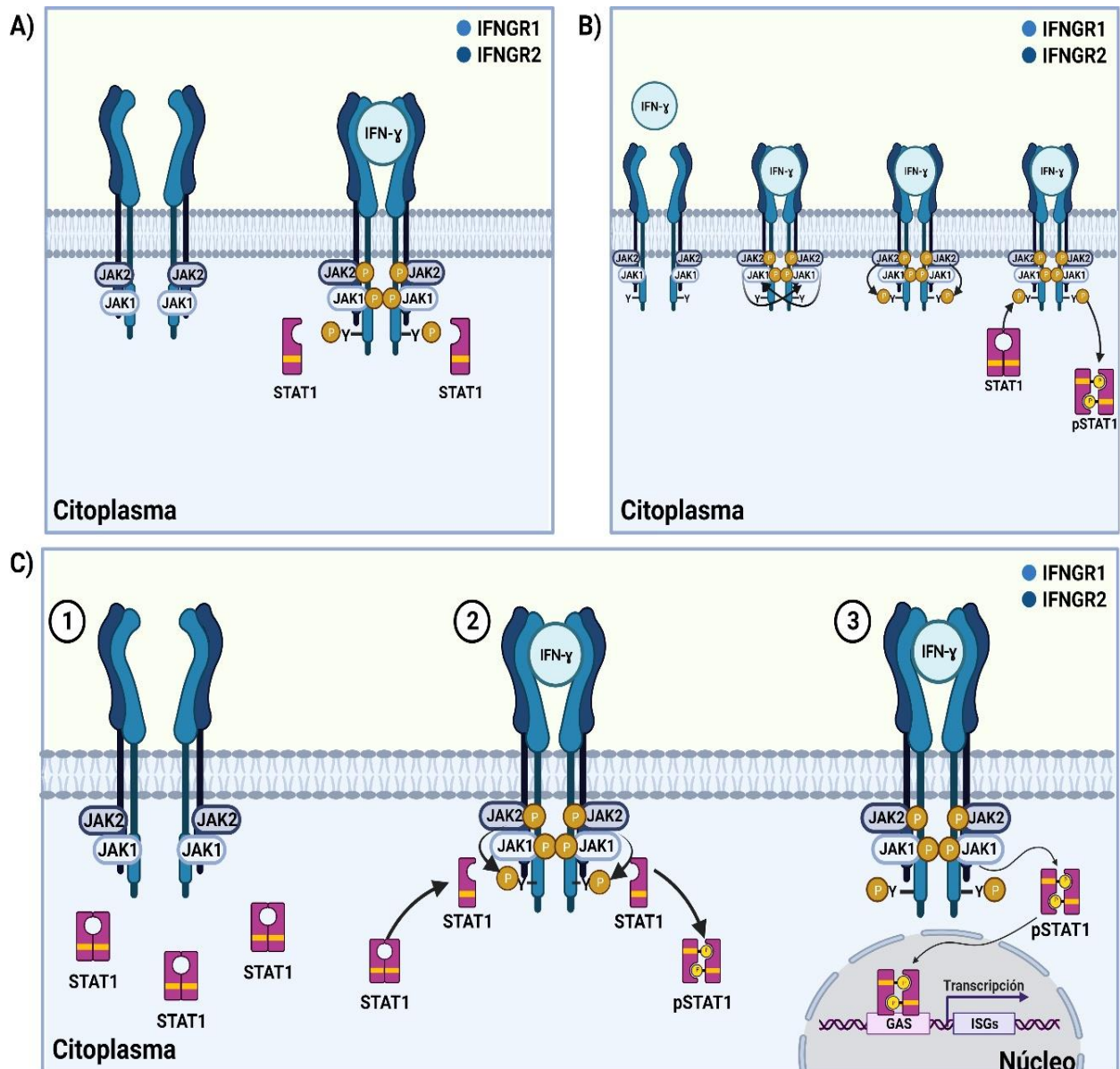


Figura 6. Vía de señalización canónica del IFN- γ . A) El receptor del IFN- γ es heterotetramérico (dos subunidades IFNGR1 y dos subunidades IFNGR2) y en sus dominios intracelulares está asociado constitutivamente a las cinasas JAK1/2. Con la unión del IFN- γ , el receptor se reorienta, las JAKs se acercan, se activan por transfosforilación y se generan sitios de acoplamiento específicos para STAT1. B) STAT1 es fosforilado por las

JAK1/2, se desacopla del receptor y se reorienta anti-paralelamente en su forma activa. C) pSTAT1 se transloca al núcleo y lleva a cabo su actividad de factor de transcripción sobre las secuencias GAS en los promotores de genes llamados ISGs (Zamora-Salas et al., 2023).

Efecto del IFN- γ sobre el transcriptoma y proteoma celular

Una vez que STAT1 es translocado al núcleo, se une a las secuencias consenso GAS: TTTCCNGGAAA, que se encuentran en los ISGs. La peculiaridad de los ISGs es que difieren dependiendo del tipo celular y la condición patológica o inflamatoria, dando como resultado una firma de ISGs específica de cada contexto (Zamora-Salas et al., 2023).

Como la mayoría de las secuencias GAS se encuentran repetidas en tándem en las regiones promotoras de los IGSs, STAT1, en conjunto con sus coactivadores, induce con gran eficiencia la expresión de un gran número de genes como una respuesta primaria al IFN- γ . Dentro de este amplio perfil de expresión génica resaltan genes como *TNF* que codifica para una citocina importante en procesos infecciosos y que favorece el desarrollo del cáncer; *CXCL11* codificante para una quimiocina de gran potencia para atraer células T al TME; *FCGR1A* que codifica para una proteína importante en la respuesta inmune en procesos patológicos y en cáncer (Lei et al., 2020; Shen et al., 2018; van de Vosse & van Dissel, 2017; Xu & Guo, 2020).

En particular, en células de cáncer de mama tratadas con IFN- γ se regula negativamente la expresión del gen *IFNGR1* codificante para el receptor del IFN- γ esto da como resultado la expresión de los genes *HTR7*, *KIF*, *AURKA*, *BIRC3* y *RALA*, que en la mayoría de los casos están asociados con la progresión del cáncer (Tecalco-Cruz et al., 2021). Por otra parte, en la línea celular HeLa se reporta que 194 ISGs son regulados positivamente por STAT1 en respuesta a la señalización del IFN- γ (Satoh & Tabunoki, 2013).

IRF1 es otro gen que se expresa gracias a la acción transcripcional de STAT1. Este, a su vez es un factor de transcripción que induce la expresión génica como parte de la respuesta secundaria ante el IFN- γ . Los genes a los que se dirige IRF1 poseen secuencias ISRE (AGTTTCNNTTTCNC/T) en sus regiones promotoras. Este factor de transcripción induce una amplia gama de productos génicos, ya que además es capaz

de reclutar a la RNA polimerasa II a los promotores de los *ISGs*, y se une a regiones *enhancers* favoreciendo la formación de asas transcripcionales que promueven la actividad de las enzimas involucradas en el proceso de la transcripción (Abou El Hassan et al., 2017).

Uno de los productos de la actividad transcripcional de IRF1 es el gen *CD274* codificante para la proteína PD-L1, que es importante en el proceso de regulación de la actividad de las células T y en la evasión inmune en los tumores. PD-L1 es una proteína transmembranal expresada en la superficie celular de APCs, células B, células parenquimatosas y células cancerosas. PD-L1 se une a su receptor PD-1 expresado en la superficie de las células T, inhibiendo así su actividad citotóxica e induciendo su apoptosis (Shi, 2018). Este mecanismo es utilizado de forma fisiológica para evitar la hiperactividad de las células T en un proceso inmunitario, devolviendo la homeostasis al tejido. Sin embargo, este mecanismo ha sido adoptado por las células tumorales en favor de la progresión del tumor, favoreciendo la evasión inmune (Jung et al., 2022; Litak et al., 2019; Shao et al., 2019). En materia de evasión inmune, otro factor inducido por el IFN- γ a través de IRF1, es IDO1, una enzima secretada por fibroblastos, células inmunes y células cancerosas; la cual cataboliza la transformación de triptófano a N-formil-quinurenina, un metabolito que imposibilita la activación de las células T e induce su apoptosis (Jung et al., 2022; Mondal et al., 2016).

En la vía canónica de señalización del IFN- γ , STAT1 e IRF1 son proteínas importantes ya que conforman el centro transcripcional regulador de la expresión génica inducida de forma primaria y secundaria por el IFN- γ , además vale la pena resaltar que estos factores de transcripción tienen la capacidad de inducir la expresión de genes de forma individual o también lo hacen de forma cooperativa (Sato & Tabunoki, 2013; K. Yan et al., 2021). Por otra parte, es bien sabido que el gen *IRF1* en su región promotora porta secuencias GAS que son blanco de la actividad de STAT1; adicionalmente, se ha reportado que el gen de *STAT1* en su región promotora posee elementos ISRE que son blancos de la actividad transcripcional de IRF1, esto nos indica que además de formar una dupla esencial para la expresión génica, estos dos factores de transcripción también forman un asa de autorregulación transcripcional en respuesta al estímulo del IFN- γ (Yuasa & Hijikata, 2016).

De manera interesante, la vía de señalización del IFN- γ también puede tener un impacto directo sobre el proteoma celular. Se ha demostrado que el IFN- γ incrementa los niveles de la proteína ISG15 e induce una novedosa modificación postraduccional de proteínas conocida como ISGilación. Esta modificación consiste en la unión covalente de la proteína ISG15, mediante un proceso catalítico parecido a la ubiquitinación, a residuos de lisina de sus proteínas blanco para aumentar o reducir su estabilidad y/o cambiar su patrón de interacción con otras moléculas. En glioblastoma, esta regulación es importante dado que la expresión de ISG15 está incrementada en comparación con el tejido no tumoral. Además, los pacientes con glioblastoma que tienen una expresión incrementada de *ISG15*, tienen una menor supervivencia (Tecalco-Cruz et al., 2022). Por lo tanto, la vía de señalización del IFN- γ no solo puede tener un impacto sobre el transcriptoma mediante la inducción de *ISGs*, sino también sobre el proteoma, promoviendo la modificación postraduccional ISGilación en las células cancerosas.

Actividades anti-tumorales y pro-tumorales del IFN- γ

Como se ha mencionado hasta el momento, la vía del IFN- γ tiene gran influencia en la expresión génica de diferentes procesos celulares que están relacionados con migración, invasión, viabilidad celular, evasión inmune, entre otras respuestas, que han resultado ser muy controversiales ya que pueden ser tanto anti-tumorales como pro-tumorales dependiendo del contexto (Figura 7) (Zamora-Salas et al., 2023).

En algunos reportes iniciales se establecía que el IFN- γ presenta una actividad anti-tumoral (Ikeda et al., 2002). La principal respuesta orquestada del IFN- γ es con relación al sistema inmune, en donde induce la expresión de genes importantes para la producción de NO en PMN. La producción de NO responde al gradiente de IFN- γ en neutrófilos, y estas células despliegan una actividad anti-tumoral dependiente de NO, así que existe una relación directa entre la concentración de IFN- γ y la capacidad inmunitaria de los neutrófilos (Yamashita et al., 1997). Las células T se activan a la presentación antigénica por las moléculas del MHC II, y por la coestimulación dependiente de la expresión de CD80 y CD86 en las APC que previamente han sido

estimuladas por IFN- γ (Ellis & Beaman, 2004). En relación a esto, el IFN- γ induce la expresión de moléculas del MHC I, la presentación y el procesamiento de antígenos en el TME del cáncer de próstata metastásico resistente a la castración, lo que favorece el correcto reconocimiento y función citotóxica de las células T (Korentzelos et al., 2022). En melanoma, el IFN- γ es capaz de inducir a las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11 que reclutan a las células T efectoras al TME (Mauldin et al., 2016). Los macrófagos son otro blanco del IFN- γ que, al recibir el estímulo de esta citocina, los macrófagos tumorales (TAM) sufren un proceso de polarización hacia el tipo M1, fase en la cual secretan quimiocinas reclutadoras de células T al TME (Jorgovanovic et al., 2020).

Dentro del TME se produce una gran concentración de ROS que induce daño oxidativo capaz de afectar a diferentes estructuras celulares, incluyendo el DNA y generando inestabilidad genómica, lo que favorece la progresión tumoral, la capacidad de invasión y la migración del tumor. Sin embargo, en cáncer de pulmón se ha observado que el IFN- γ protege al DNA del daño causado por el peróxido de hidrógeno e induce la actividad de las PARP encargadas de la reparación del DNA (Alhawamdeh et al., 2021; Torrisi et al., 2022).

Una de las características antitumorales más notables del IFN- γ que se han reportado es la regulación de la apoptosis y la proliferación en células tumorales a través del IRF1. Este factor de transcripción induce la expresión de una firma de genes implicada en la señalización de muerte celular en el cáncer de mama, lo que previene el crecimiento del tumor (Rettino & Nicole, 2013). Adicionalmente, en células de leucemia este factor de transcripción regula negativamente la expresión de Bcl2 y positivamente la expresión de Bak, de esta manera se libera el citocromo C de la mitocondria y se activa el movimiento de la caspasa 3, así como de PARP, que es su sustrato (Y. Zhou et al., 2008). Un resultado similar fue reportado en una línea de NSCLC y en el cáncer de próstata metastásico resistente a la castración, en donde el estímulo del IFN- γ induce la activación de las caspasas 3 y 7 (Korentzelos et al., 2022; Song et al., 2019). Además, el IFN- γ tiene una actividad antiproliferativa induciendo a través de STAT1 a p21, que inhibe a las CDKs, de esta manera se regula la progresión del ciclo celular (Chin et al., 1996).

También, se ha reportado la actividad antimetastásica del IFN- γ en el cáncer de pulmón, en monocitos que son tratados a corto plazo en los que se indujo la producción de IL-17 y, en consecuencia, se expandieron los monocitos y las células NK, lo que da como resultado el bloqueo de la metástasis (R. Wang et al., 2022). Un resultado similar se pudo observar en cáncer de próstata metastásico resistente a la castración, en el que, el uso de IFN- γ en conjunto con el quimioterapéutico Paclitaxel impidió el desarrollo de los eventos metastásicos (Korentzelos et al., 2022). En otro tipo de terapias, como la radioterapia, el IFN- γ puede potenciar sus efectos antitumorales ya que las células T CD8+ pueden producir una gran cantidad de IFN- γ que estimula la actividad citotóxica de las células T y la reducción del tumor (Gerber et al., 2013).

Sin embargo, a pesar de la amplia gama de efectos anti-tumorales en diferentes tipos celulares y de tejidos, el IFN- γ también promueve con actividades pro-tumorales como la angiogénesis, que es el proceso a través del cual se generan nuevos vasos de irrigación sanguínea para proveer de nutrientes a la masa tumoral y como vehículo para el proceso de metástasis. En este rubro, la enzima IDO1 que es inducida por el IFN- γ , se acumula en el TME donde es capaz de inducir la neovascularización y metástasis en el pulmón (Balandeh et al., 2021; Mondal et al., 2016). Por otro lado, en la vía canónica del IFN- γ pueden existir alteraciones en la expresión de sus componentes, lo que induce la insensibilidad al estímulo de este interferón, de esta manera, se evaden señales apoptóticas y antiproliferativas, permitiendo la activación de proteínas inhibitorias como SOCS1 y SHP2. Abordando nuevamente el papel de la IDO, esta enzima también tiene injerencia sobre la proliferación celular y evasión de apoptosis, ya que puede activar la vía de supervivencia PI3K-AKT (Benci et al., 2016; Du et al., 2022).

Otro proceso en el cual también es importante IDO1 es en la evasión inmune, ya que como se abordó previamente, esta enzima cataboliza el triptófano en N-formil-quinurenina, que al acumularse en el TME induce la apoptosis de las células T, lo cual está relacionado con un mal pronóstico en el cáncer colorrectal, ya que favorece un microambiente inmunotolerante (Du et al., 2022). En glioblastoma también se observa la inducción de IDO1 en conjunto con PD-L1 en respuesta al IFN- γ generando un TME con gran capacidad inmunosupresora (Jung et al., 2022). PD-L1 por su parte, es una

proteína transmembranal inducida por IRF1 con actividad inmunosupresora, ya que como se mencionó previamente, forma parte del checkpoint inmunitario PD-1/PD-L1 que limita la actividad citotóxica de las células T en contra de las células que porten a esta proteína, como las células tumorales (Jiang et al., 2019).

En tumores sólidos como el glioblastoma la regulación positiva de la expresión de PD-L1 se utiliza como mecanismo de evasión inmune (Lei et al., 2020). En el cáncer gástrico, el uso de anticuerpos anti-PD-L1 permite recuperar la actividad citotóxica de las células T después del tratamiento con IFN- γ , corroborándose que el IFN- γ induce la expresión de PD-L1 y así favorece la reducción de la actividad antitumoral de las células T y un TME inmunotolerante (Mimura et al., 2018). Otra molécula que favorece la inmunosupresión y es inducida por el IFN- γ es la arginasa, esta enzima hidroliza la arginina en urea y ornitina, afectando la activación de las células T CD8+ por acción de la actividad inmunosupresora de los macrófagos, DCs y MDSCs (Du et al., 2022).

La invasión y metástasis del tumor es un signo de progresión tumoral que indica un pronóstico grave del paciente portador, en este contexto la sobreexpresión de PD-L1 en respuesta al IFN- γ está relacionado con un evento de EMT (Alshaker & Matalka, 2011; Mimura et al., 2018). Además, esta citocina induce la transformación de células troncales cancerosas por la inducción del receptor CSC4 que les provee de la capacidad de migrar e invadir (H. C. Chen et al., 2011).

El resultado de inmunoterapias contra el cáncer se ve afectado en respuesta al IFN- γ , ya que la interacción de JAK1 con APLNR, induce la pérdida de función del receptor de apelina y junto con ello se reduce la eficacia de las terapias anticáncer (Patel et al., 2017).

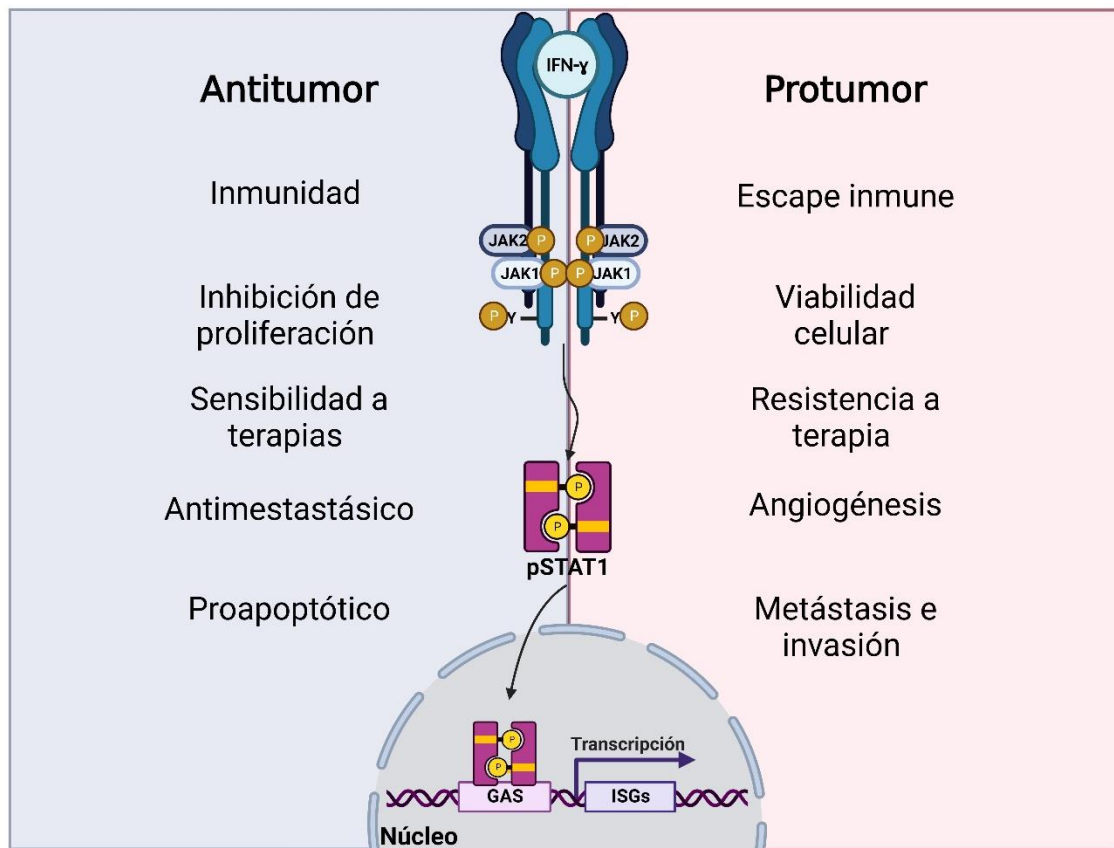


Figura 7. Actividad dual del IFN- γ en cáncer. En cáncer se han reportado tanto actividades anti-tumor como actividades pro-tumor que están inducidas por los componentes de la vía canónica de señalización del IFN- γ (Zamora-Salas et al., 2023).

Como se puede apreciar, existe una marcada dualidad en la actividad del IFN- γ , lo cual ha despertado una gran curiosidad sobre estos efectos. Las posibles razones pueden ser varias, como que el IFN- γ pueda inducir la expresión de genes a través de vías no canónica o canónica, teniendo resultados diferentes en cada uno de los casos; la dosis del IFN- γ , el tiempo de exposición a este estímulo y el tipo de célula / tejido / cáncer son algunos de los factores en discusión acerca del origen de la dualidad de los efectos de esta citocina; sin embargo, aún queda mucho por explorar en este campo (Zamora-Salas et al., 2023). Adicionalmente, el impacto de la señalización del IFN- γ sobre el transcriptoma en diferentes tipos de cáncer no es completamente conocido, siendo necesaria la identificación no solamente de genes codificantes, sino también RNAs no codificantes, como los miRNAs que son modulados por la señalización del IFN- γ .

Generalidades sobre los miRNAs y su importancia en el cáncer

Dentro de todas las especies de RNA que existen, las no codificantes para proteínas conforman cerca del 96%. En este grupo se encuentran los micro-RNAs (miRNAs), que son especies pequeñas de RNA, de una longitud de 22 nucleótidos en promedio y capaces de reprimir la traducción de mRNA a proteína en más del 60% de los genes humanos (Vishnoi & Rani, 2017).

Gran parte de los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II, que genera una horquilla larga de RNA llamada pri-miRNA con un *5'cap* y una *cola* de poliadenilación en el extremo 3'. Aún en el núcleo, el complejo de microprocesamiento compuesto por la RNasa Drosha y la proteína de unión a la cadena doble de RNA DGCR8 generan una escisión sobre el pri-miRNA, resultando en una estructura de tallo y asa de 70 nucleótidos de longitud que recibe el nombre de pre-miRNA (S. Lin & Gregory, 2015). Una vez conformada esta estructura, los miRNAs se transportan al citoplasma por SPO5 y RAN por el impulso de GTP; una vez en el citoplasma, la RNasa DICER escinde al pre-miRNA removiendo la estructura de asa en asociación con la proteína TRBP que se une a la cadena doble de RNA. Esto da como resultado un dúplex de miRNA en el cual, una cadena es la guía y la otra es la cadena pasajera; este dúplex es cargado a la proteína AGO (familia de proteínas AGO 1-4) asistido por proteínas chaperonas dependientes de ATP. Cuando el dúplex de miRNA se carga a AGO, la cadena pasajera es degradada y la cadena guía es conservada como el miRNA maduro. De esta manera se conforma el complejo RISC con la capacidad de reconocer a los mRNAs blanco y regularlos negativamente a través de un mecanismo de complementariedad de bases con la región “semilla”, compuesta por 8 nucleótidos en el extremo 5' del miRNA sobre la región 3' UTR de los mRNA (Figura 8) (Ahmed et al., 2021; Mazurek et al., 2020; Peng & Croce, 2016; Saliminejad et al., 2019).

El mecanismo de biogénesis de miRNAs descrito previamente es conocido como la vía canónica de biogénesis de los miRNAs; sin embargo, también existen vías no canónicas que son independientes de Drosha o de Dicer. En la vía independiente de Drosha y DGCR8 los intrones son procesados por el *spliceosome* y se pliegan en la

estructura de horquilla del pre-miRNA y continúan con la vía de maduración de un miRNA; este tipo de miRNAs son llamados *mirtrones* (Saliminejad et al., 2019).

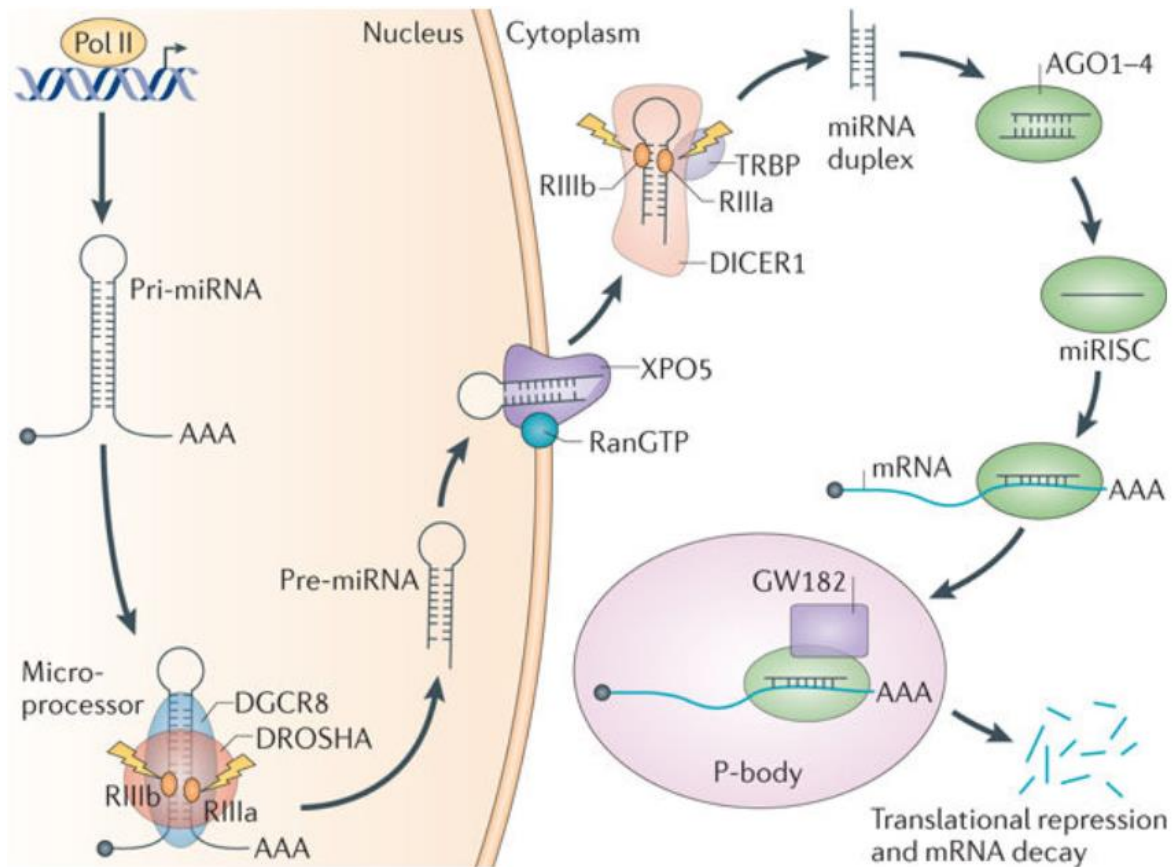


Figura 8. Biogénesis de los miRNAs. Los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II que genera un producto llamado pri-miRNA al cual, la maquinaria de micro-procesamiento escinde y genera un segundo producto llamado pre-miRNA. El pre-miRNA es exportado al citoplasma y aquí es procesado por DICER1 en conjunto con TRBP generando un dúplex de miRNA que se cargará a las proteínas AGO para conservar la cadena líder, degradar la complementaria y formar el complejo RISC activo para regular los mRNAs y secuestrarlos en P-body's o degradarlos (S. Lin & Gregory, 2015).

Los miRNAs, con su región semilla conformada por 8 nucleótidos y localizada en su extremo 5', son capaces de regular a sus mRNAs blanco por complementariedad de bases con la región 3' UTR. La región semilla, al ser una secuencia tan pequeña, le da la facultad a los miRNAs de regular promiscuamente a los mensajeros, ya que un mismo miRNA puede regular a diferentes mRNAs y un solo mRNA puede ser regulado por diferentes miRNAs. Adicionalmente, en algunos casos los miRNAs pueden regular de formas alternativas a los mRNAs, como por ejemplo con una complementariedad débil de la región 3' del mRNA con la 3' del miRNA, o utilizando la secuencia de poliadenilación del mRNA; aunque estos casos son raros y menos efectivos

(Saliminejad et al., 2019). Este mecanismo es utilizado por los miRNAs para regular a más del 60% de los genes humanos, lo que destaca la importancia de los miRNAs en diferentes patologías como el cáncer, en el que se ven desregulados miRNAs importantes en el desarrollo de los tumores y que dependiendo del gen al que se dirijan, adquieren capacidades de inducir efectos pro-tumorales (onco-miRNAs) o efectos anti-tumorales (miRNAs supresores de tumor).

Los *hallmarks* o sellos distintivos del cáncer son capacidades biológicas adquiridas que le permiten al tumor desarrollarse y progresar. Algunos de ellos son: la autosuficiencia en señales de crecimiento, la evasión de apoptosis, el crecimiento celular, la angiogénesis, el potencial replicativo ilimitado, la invasión y la metástasis; y se ha reportado que los miRNAs se encuentran implicados en estos procesos (Hanahan & Weinberg, 2000). Por ejemplo, se sabe que el *cluster* de miRNAs miR-17-92 regula negativamente a E2F1, un vigilante de la progresión del ciclo celular a través de la transcripción de genes en la transición G1-S; de esta manera, el *cluster* miR-17-92 favorece la evasión de la regulación del ciclo celular y la proliferación de las células tumorales. Por otra parte, en una gran variedad de tumores se ha observado que los miR-221/222, miR-663 y miR302 están sobreexpresados y regulan directamente a p27, p21 y p16, respectivamente, las cuales son proteínas reguladoras de la progresión del ciclo celular, favoreciendo así la proliferación celular. En mieloma, los miR-192, miR-194 y miR-215 suprimen a Mdm2 y previenen la degradación de p53, favoreciendo su actividad de supresor tumoral; por otro lado, si se desregula el *cluster* miR-17-92 permite que las células tumorales bajo hipoxia, evadan la apoptosis. El miR-155 se sobreexpresa en cáncer y promueve la EMT a través de la GTPasa RhoA. En angiogénesis, uno de los miRNAs más reconocidos es miR-210 ya que induce la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de VEGF (Peng & Croce, 2016). Como podemos observar, existe una gran variedad de blancos génicos sobre los cuales los miRNAs actúan directamente e inducen una respuesta específica en diferentes tipos de cáncer.

miRNAs desregulados en glioblastoma

El glioblastoma es uno de los tumores más agresivos y recurrentes del SNC que reduce la esperanza de vida en los pacientes a cerca de 14 meses. Por lo cual el estudio de los miRNAs implicados en la progresión del glioblastoma es un área importante para conocer el comportamiento de este tumor e identificar posibles biomarcadores y / o blancos terapéuticos. En este sentido, los estudios conducidos sobre glioblastoma han identificado un gran número de miRNAs que favorecen su malignidad y la regulación positiva de onco-miRNAs. Dentro de los miRNAs sobreexpresados en glioblastoma, se encuentra el *cluster* miR-17-92 que incluye a miR-17-3p, miR-17-5p, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a y miR-92a; y está relacionado con procesos como la proliferación celular, la angiogénesis, la reparación del DNA y la evasión de apoptosis. El miR-21 se encuentra sobreexpresado en diferentes tipos de cáncer incluyendo el glioblastoma, donde está relacionado con actividades como proliferación a través de la regulación negativa de genes como PTEN, ANP32A y SPRY2 entre otros; también en vías de proliferación a través de NF- κ B y Ras. Además, en el glioblastoma también se regulan negativamente miRNAs que en lo general son miRNAs supresores de tumores, como el miR-7 que tiene como blanco directo a FAK, haciendo que su regulación negativa tenga repercusiones en la migración e invasión de las células cancerosas. El miR-34a se regula negativamente en el glioblastoma y al sobreexpresarse, se inhiben procesos como la proliferación, y la invasión, y se induce la apoptosis de las células de glioblastoma (Mazurek et al., 2020; Møller et al., 2013).

Los procesos celulares que permiten que los miRNAs se regulen positiva o negativamente en cáncer son principalmente cuatro:

- I. La amplificación o delección de los genes codificantes para miRNAs: esto puede ser por la amplificación, delección o translocación del número de copias de genes codificantes para miRNAs, ya que muchos de estos genes se encuentran en regiones del DNA codificantes para onco-genes o áreas con pérdida de heterocigosidad de genes supresores de tumores.

- II. El control transcripcional de miRNAs: la expresión de estos RNAs no codificantes está controlada por diferentes factores de transcripción, que si se encuentran alterados en cáncer, también podría alterarse el resultado de la expresión de los miRNAs.
- III. Cambios epigenéticos desregulados: uno de los principales procesos alterados en cáncer son las modificaciones epigenéticas como la metilación en genes supresores de tumores y a estos mismos cambios podrían estar sujetos los genes codificantes para miRNAs.
- IV. Defectos en la maquinaria de biogénesis de los miRNAs: como se mencionó previamente, la biogénesis de los miRNAs depende de la acción de diferentes enzimas que están desreguladas en cáncer, lo que impacta también la expresión de estos RNAs.

Con base en lo anterior, se infiere que la desregulación de los miRNAs en el glioblastoma podría estar sujeta a cualquiera de estos mecanismos de regulación o a una combinación de ellos (Peng & Croce, 2016).

Además, se han identificado, como potenciales biomarcadores del glioblastoma algunos miRNAs cuyos niveles se mantienen consistentes en sangre periférica de pacientes con glioblastoma. Ejemplo de esto son los miR-497 y miR-125b que mantienen niveles bajos en pacientes de glioblastoma en comparación con otros tipos de cáncer. En otro caso, el miR18d está relacionado directamente con un mal pronóstico de supervivencia del paciente que utiliza el quimioterapéutico TMZ. A pesar de que existen pruebas sobre estos y otros miRNAs como potenciales biomarcadores, se requieren más estudios en glioblastoma para lograr obtener un biomarcador válido (Rezaei et al., 2020).

El IFN- γ es una citocina de gran importancia en cáncer ya que puede inducir respuestas pro-tumorales o anti-tumorales. Sin embargo, en el glioblastoma las acciones de la señalización del IFN- γ no son completamente claras, dado que, a la fecha, solo se conoce que los genes que codifican para IDO-1 y PD-L1 son regulados inducidos por IFN- γ , sugiriendo que la señalización desencadenada por el IFN- γ tiene principalmente una función pro-tumoral en el glioblastoma. Por otro lado, los miRNAs

son actores centrales en la progresión del glioblastoma, pero se desconoce si pueden ser modulados en respuesta a la activación de la señalización del IFN- γ . Considerando los antecedentes, en este trabajo nos enfocamos en una sola pregunta de investigación: ¿Cuáles son los miRNAs modulados por la vía del IFN- γ en células de glioblastoma que se asocian con la progresión del glioblastoma?

JUSTIFICACIÓN

La vía canónica de IFN- γ tiene actividad anti-tumorales como pro-tumorales en diferentes tipos de cáncer y algunos miRNAs podrían estar involucrados en este proceso. Sin embargo, aún no se conocen qué miRNAs se encuentran modulados por la vía de señalización del IFN- γ , y si estos pudieran ser importantes en la fisiología de las células LN-18 derivadas de glioblastoma. Por lo tanto, la identificación de los miRNAs modulados por IFN- γ podría contribuir a entender algunos de sus efectos en las células de glioblastoma y generar una base de conocimientos para estudios posteriores sobre la identificación de potenciales biomarcadores y blancos terapéuticos.

HIPÓTESIS

El IFN- γ inducirá la expresión de una firma de miRNAs asociados con la progresión de los glioblastomas.

OBJETIVOS

Objetivo General

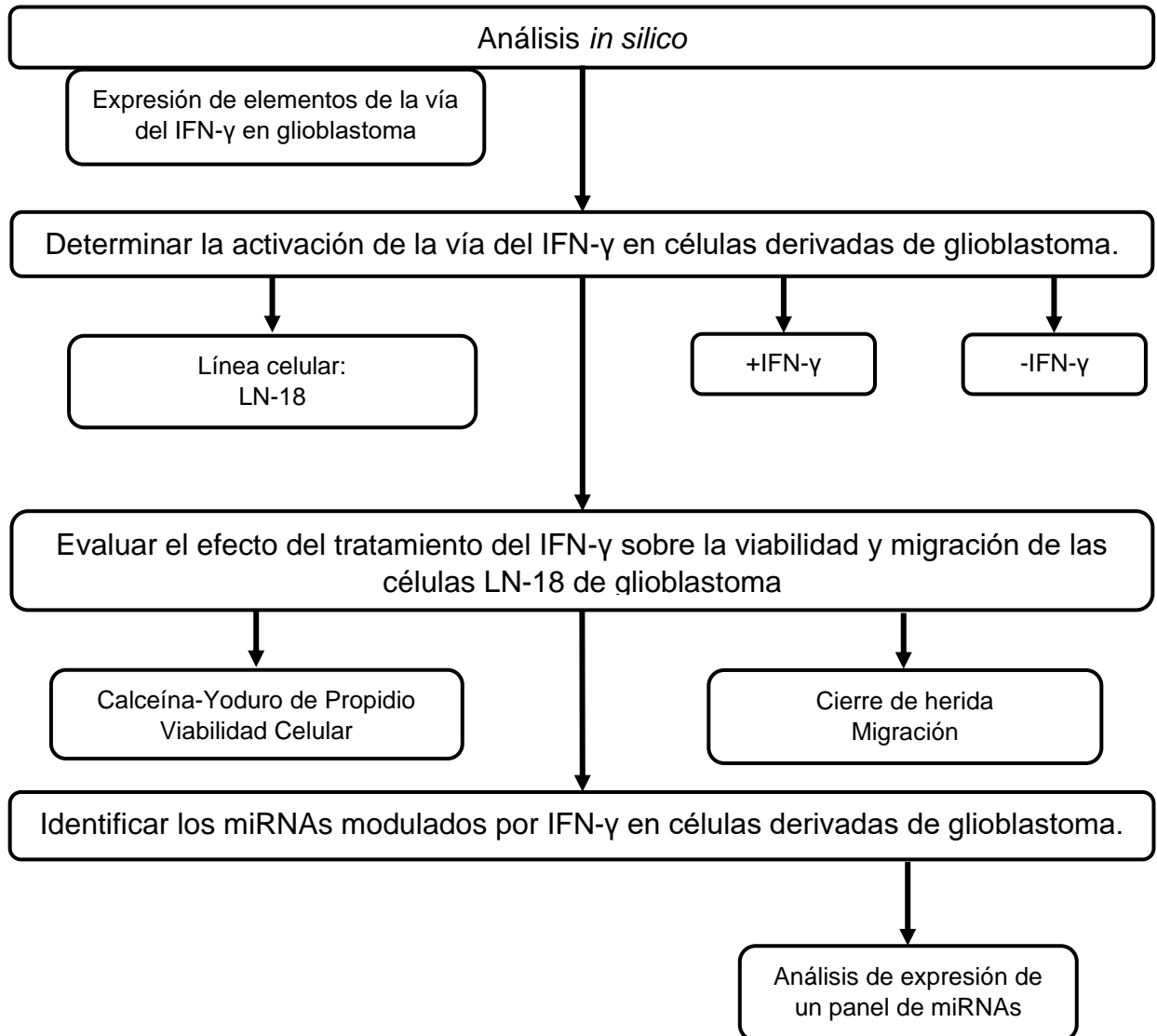
Identificar los miRNAs asociados con un efecto pro-tumorigénico que son modulados por la vía de señalización del IFN- γ en las células de glioblastoma.

Objetivos Particulares

1. Analizar *in silico* la expresión de los elementos de la vía canónica del IFN- γ (IFNGR1/2, JAK1/2, STAT1, IRF1, CD274) en células de glioblastoma.
2. Determinar si existe una activación de la vía de señalización del IFN- γ en células de glioblastoma.

3. Evaluar el efecto del IFN- γ sobre la viabilidad y migración de las células de glioblastoma.
4. Identificar los miRNAs modulados por IFN- γ en células de glioblastoma.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis *in silico*

Se obtuvo información sobre la expresión de los elementos de la vía de señalización del IFN- γ (*IFNGR1*, *IFNGR2*, *JAK1*, *JAK2*, *STAT1*, *IRF1* y *CD274* codificante para PD-L1) a partir de bases de datos de microarreglos y RNAseq de pacientes con glioblastoma. Las plataformas que se utilizaron fueron UALCAN y GEPIA, que almacenan información del Atlas del genoma del cáncer (TCGA) y del proyecto de Expresión Genotípica de Tejido (GTEx), lo que permitió realizar un análisis de expresión diferencial, un análisis de correlación y un análisis de supervivencia del paciente (Chandrashekar et al., 2017; Tang et al., 2017).

Cultivo celular y tratamiento con IFN- γ

Se utilizó la línea celular humana LN-18 (tabla 1) derivada de glioblastoma que ha sido ampliamente utilizada y ha permitido dilucidar los mecanismos moleculares del glioblastoma. Esta línea celular fue cultivada en el medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y a una temperatura de 37°C. Una vez alcanzada una densidad celular cercana al 80%, se generaron dos grupos experimentales: control y +IFN- γ . Bajo condiciones de ayuno (ausencia de suero), un grupo de células se estimularon con 100 ng/mL de IFN- γ durante diferentes tiempos para evaluar la activación de la vía de señalización.

Línea celular	LN-18	Referencia
Alteraciones genéticas	P53 mutado PTEN mutado Deleción en cromosoma 16 IDHwt	(Vázquez Cervantes et al., 2021)

Tabla 1. Línea células LN-18 de glioblastoma utilizada en este proyecto y las principales alteraciones genéticas que porta.

Obtención de extractos proteicos totales.

Posterior a la estimulación con IFN- γ se retiró el medio del cultivo y se lavó con PBS 1X frío. Una vez realizado el lavado, se aspiró el PBS y se adicionó buffer de lisis TNTE

al 0.5%, e inhibidores de proteasas y fosfatasa, para posteriormente colectar a las células en microtubos de 1.5 mL. Los microtubos se llevaron a agitación a 4°C por 15 min, seguido de un proceso de centrifugación a 13000 rpm a 4°C durante 5 min. El sobrenadante, que contenía al extracto proteico total se transfirió a un nuevo microtubo.

Electroforesis SDS-PAGE y Western blot

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de acrilamida SDS-PAGE. Una vez transcurrido el tiempo de la electroforesis, se llevó a cabo la transferencia de proteínas a una membrana de PVDF. La transferencia se realizó a 100 V durante 80 min. Posteriormente, la membrana se bloqueó por 1 h usando una solución de leche descremada en polvo al 5% en TBS-T, para después incubarse con los anticuerpos primarios durante una noche a 4°C. Después se lavó la membrana con TBS-T y se incubó con los anticuerpos secundarios durante 1 h, seguido de lavados nuevamente. Por último, se llevó a cabo la inmunodetección de las proteínas STAT1, pSTAT1, IRF1, PD-L1 y Tubulina como control de carga, usando las condiciones previamente estandarizadas para cada anticuerpo primario y usando el sustrato quimioluminiscente del kit SuperSignal West Pico Stable Peroxidase Solution y Luminol/Enhancer Solution.

Ensayo calceína-yoduro de propidio

Para evaluar la viabilidad celular, se realizó el ensayo de calceína – yoduro de propidio. El metabolismo activo de las células viables permite a las esterasas intracelulares transformar la calceína-AM (un compuesto no fluorescente) en calceína, un compuesto verde fluorescente. Mientras que, en las células no viables, el yoduro de propidio se une con facilidad al DNA indicando que la viabilidad de la membrana se ha perdido, resultando en una tinción roja en un análisis de fluorescencia. Las células con o sin tratamiento de IFN- γ fueron incubadas con calceína a una concentración de 1 μ M y con yoduro de propidio a una concentración de 5 mM a 37°C durante 30 min. Finalmente fueron analizadas con microscopía de fluorescencia para determinar la viabilidad celular (Tecalco-Cruz, A. et al., 2019).

Prueba de cierre de herida

Para analizar la capacidad de migración de las células de glioblastoma con y sin tratamiento con IFN- γ , se realizó una herida a la monocapa celular después de 12 h de cultivo, utilizando una punta de plástico de 1mm. Se tomaron fotografías a las 0, 24 y 48 h después de realizar la herida (Tecalco-Cruz et al., 2012).

Obtención de RNA y microarreglo para miRNAs

Se utilizaron las células LN-18 sin y con estímulo de 100 ng/mL de IFN- γ durante 24h y a partir de 1×10^6 células se realizó la extracción de RNA con el kit miRNeasy Mini Kit. Con el kit miRCURY LNA RT se realizó la síntesis de cDNA. Finalmente se utilizó el kit miRCURY LNA SYBR Green PCR kit y dos placas miRCURY LNA miRNA Focus PCR Panel Human Brain Cancer Focus para realizar el tamizaje de miRNAs a través de una qPCR. Todos los kits fueron obtenidos de Qiagen y los ensayos fueron llevados a cabo según las instrucciones del fabricante. Los datos obtenidos del qPCR fueron analizados por el método $2\Delta\Delta CT$ para identificar a los miRNAs regulados positiva y negativamente en respuesta al tratamiento con IFN- γ en las células derivadas de glioblastoma. El análisis de enriquecimiento funcional se llevó a cabo mediante la plataforma Mienturnet que reúne información de bases de datos como Kegg, Reactome, TargetScan, entre otras.

RESULTADOS

1. Análisis *in silico* de la expresión de los componentes de la vía del IFN- γ en glioblastoma.

Expresión de los elementos de la vía del IFN- γ en glioblastoma

La vía de señalización canónica del IFN- γ inicia con la activación de su receptor heterotetramérico compuesto por dos subunidades IFNGR-1 y dos subunidades IFNGR-2. La subunidad IFNGR-1 interacciona con IFN- γ y la IFNGR-2 se encarga de transducir la señal hacia sus dominios intracelulares, en donde se encuentran asociadas constitutivamente con las cinasas JAK1 y JAK2, respectivamente. Por tal motivo, el primer análisis realizado consistió en hacer un análisis *in silico* para

comparar la expresión de estos elementos de la vía de señalización del IFN- γ en muestras de glioblastoma respecto a un tejido de cerebro saludable.

Los resultados obtenidos muestran que ambas subunidades del receptor del IFN- γ se encuentran sobreexpresadas de manera estadísticamente significativa en tejido de pacientes con glioblastoma en comparación con tejido sano (Figura 9).

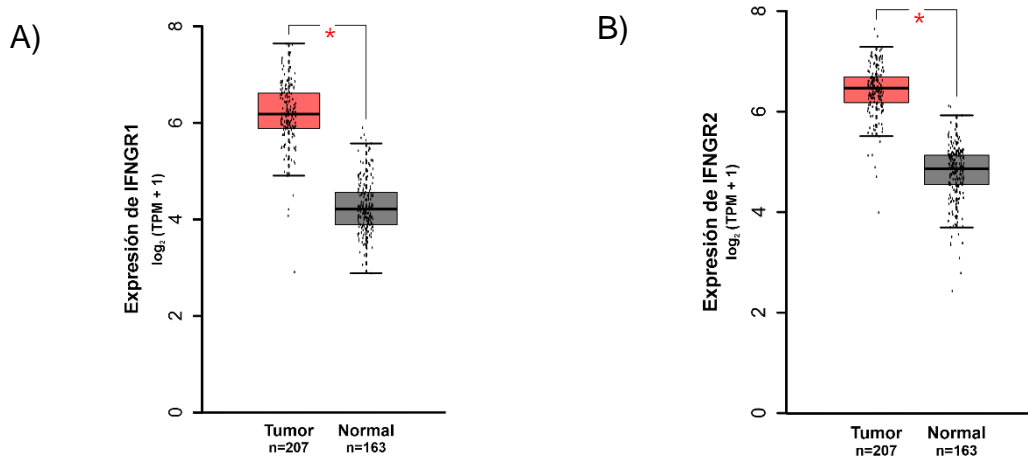


Figura 9. Expresión del receptor del IFN- γ en glioblastoma. A) Niveles de expresión de la subunidad IFNGR1 del receptor del IFN- γ en glioblastoma en comparación con tejido sano. B) Niveles de expresión de la subunidad IFNGR2 del receptor del IFN- γ en glioblastoma en comparación con tejido sano. ANOVA de una vía, $p < 0.01$.

Seguido de la interacción del IFN- γ con su receptor heterotetramérico, las cinasas: JAK1 y JAK2 que fosforilan a los dominios intracelulares IFNGR1 e IFNGR2, de manera que se forman sitios de acoplamiento específicos para la proteína STAT1. Es por ello que también se analizó la expresión de estas cinasas, mostrando una tendencia a la sobreexpresión en muestras de pacientes con glioblastoma en comparación con tejido sano. Se corroboraron estos resultados con la base de datos UALCAN que posee información del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) con un número de muestras diferente a GEPIA (n normal= 5 n tumoral= 156 y n normal= 207, n tumoral= 163, respectivamente) y con información obtenida de microarreglos. El resultado del segundo análisis comprueba que en el tejido de glioblastoma se presenta una tendencia a la sobreexpresión de las cinasas JAK1 y JAK2 en comparación con muestras de pacientes saludables (Figura 10).

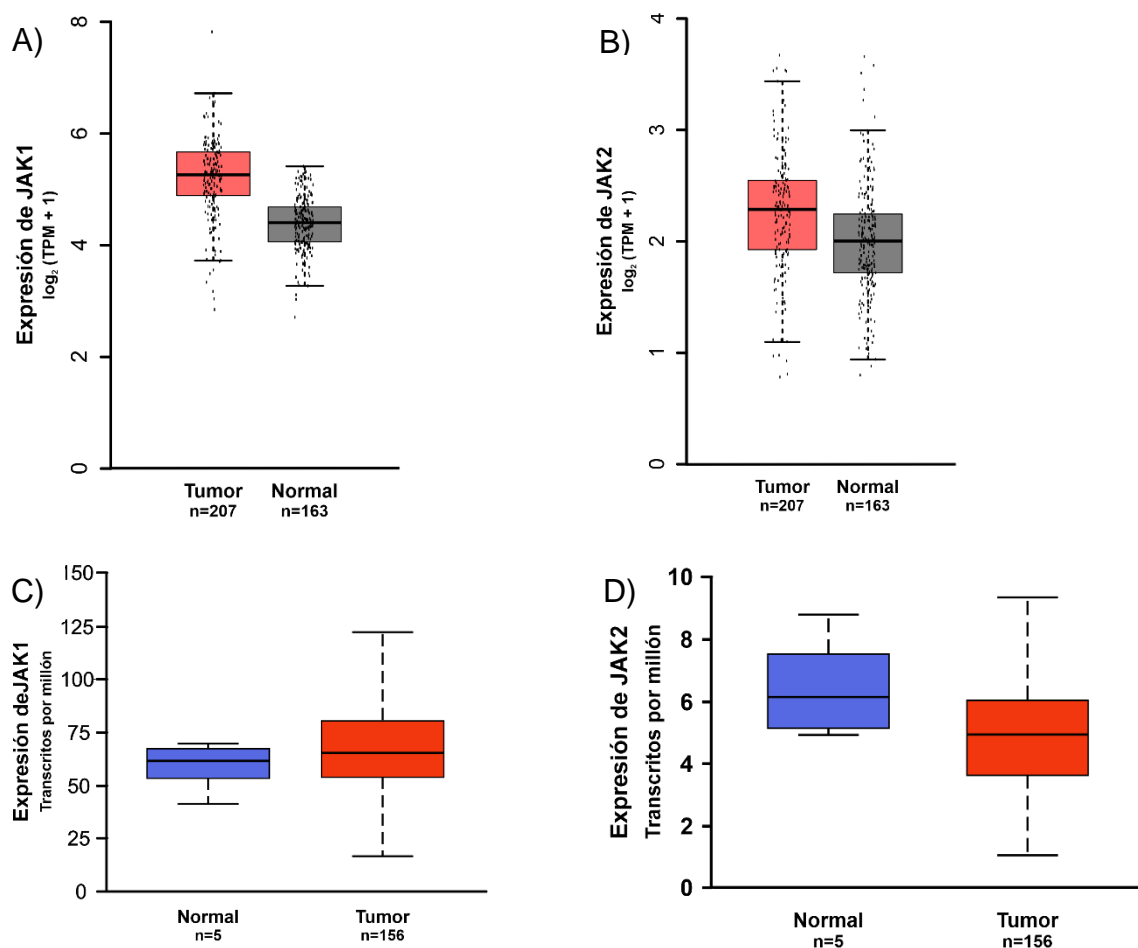


Figura 10. Expresión de JAK1 y JAK2 en glioblastoma. Niveles de expresión de la cinasa JAK1 en tejido canceroso en comparación con tejido sano, resultados obtenidos de la base de datos GEPIA (A) y corroborados con UALCAN (C). Niveles de expresión de la cinasa JAK2 en glioblastoma en comparación con tejido sano analizado con la base de datos GEPIA (B) y corroborado con UALCAN (D). Gepia: ANOVA de 1 vía, $p < 0.01$. UACAN: t student $p < 0.05$.

En la vía de señalización del IFN- γ las cinasas JAK1 y JAK2 fosforilan a la proteína STAT1. Luego de ser fosforilada, STAT1 se homodimeriza y se transloca al núcleo de la célula en donde desempeñará el papel de factor de transcripción, regulando la expresión de genes inducidos por el IFN- γ . El análisis *in silico* de la expresión de STAT1 muestra que se encuentra sobreexpresado de forma estadísticamente significativa en el tejido de glioblastoma en comparación con el tejido normal (Figura 11).

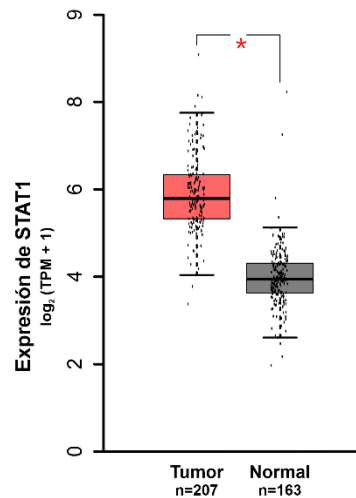


Figura 11. Expresión de STAT1 en glioblastoma. Los niveles de expresión de STAT1 en tejido canceroso en comparación con tejido sano muestran una diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de una vía, $p < 0.01$.

La acción que ejerce STAT1 como factor de transcripción en el núcleo favorece la transcripción de genes como el factor regulador de interferón IRF1, que a su vez es un factor de transcripción que actúa induciendo la expresión de múltiples genes entre los que se encuentra *CD274*, un gen de gran relevancia en un escenario del glioblastoma ya que codifica para el ligando de muerte celular programada PD-L1.

Los resultados obtenidos del análisis de expresión muestran que IRF-1 se encuentra sobreexpresado de forma estadísticamente significativa en glioblastoma en comparación con el tejido saludable. De la misma manera *CD274*, gen que codifica para PD-L1 presenta una tendencia a la sobreexpresión en el tejido tumoral en comparación con el tejido normal (Figura 12).

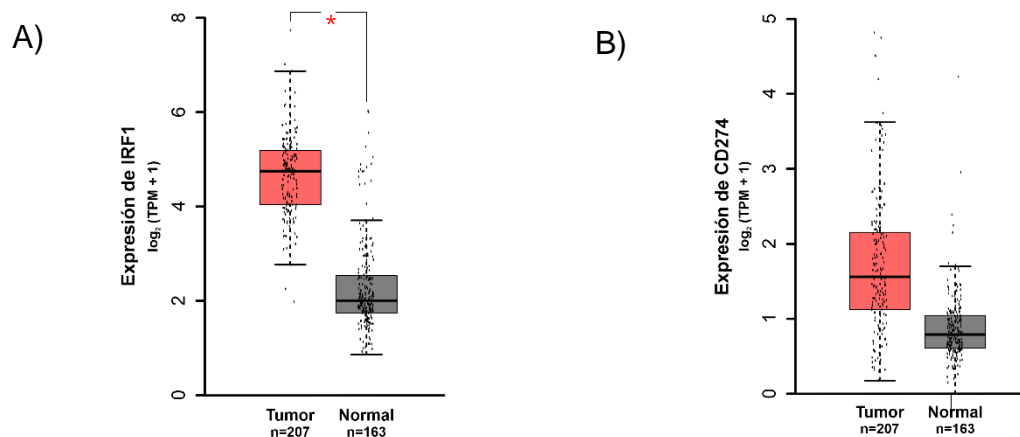


Figura 12. Expresión de IRF1 y CD274 en glioblastoma. A) Niveles de expresión de IRF1 en tejido canceroso en comparación con tejido sano. B) Niveles de expresión de CD274 en tejido canceroso en comparación con tejido sano. ANOVA de una vía, $p < 0.01$.

Con los resultados del análisis *in silico* de la expresión de los componentes de la vía del IFN- γ es posible concluir que presentan una marcada sobreexpresión en un escenario de glioblastoma. Esta sobreexpresión se acentúa en puntos clave de la vía de transducción de señales como el receptor conformado por IFNGR1 e IFNGR2, y los factores de transcripción inducidos por el IFN- γ como STAT1 e IRF1. El mapa de calor presentado en la figura 6 fue elaborado con datos provenientes de RNA-seq y contenidos en GEPIA; se puede observar de manera global la notoria sobreexpresión de los genes que conforman la vía de señalización del IFN- γ en condiciones tumorales en comparación con las condiciones normales.

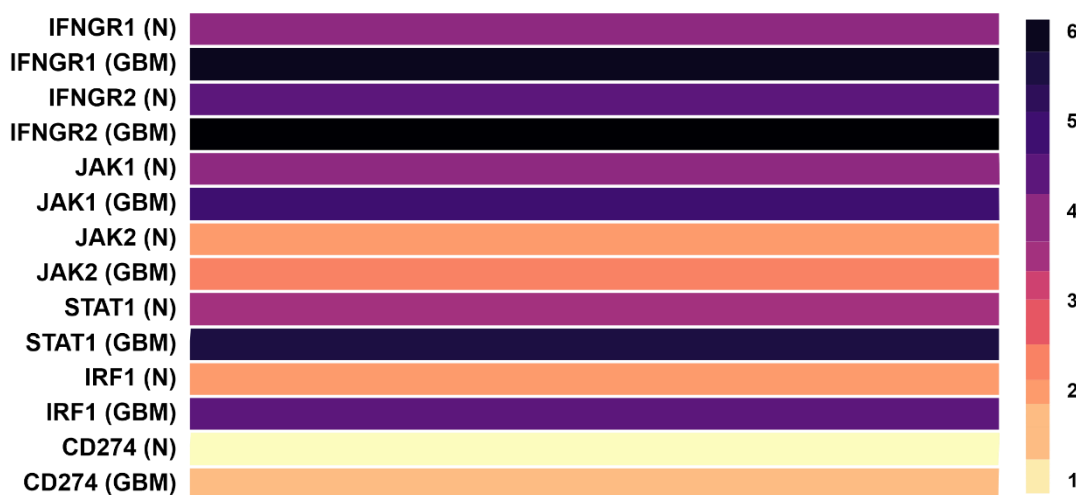


Figura 13. Mapa de calor con la expresión diferencial de los participantes de la vía de señalización del IFN- γ en pacientes con glioblastoma en comparación con pacientes en condiciones normales. Datos obtenidos de la base de datos GEPIA. Muestras de tejido normal (n= 163) y de tumor de glioblastoma (n= 207).

Se realizó un análisis global de los componentes de la vía de señalización del IFN- γ con la finalidad de corroborar la información presentada en la figura 13. En este segundo análisis se tomaron en cuenta datos provenientes de microarreglos y contenidos en la base de datos UALCAN (Figura 14). En este segundo análisis podemos corroborar que en los tumores hay una tendencia a la sobreexpresión de los componentes de la vía del IFN- γ acentuada en participantes importantes como su receptor y los factores de transcripción STAT1 e IRF1.

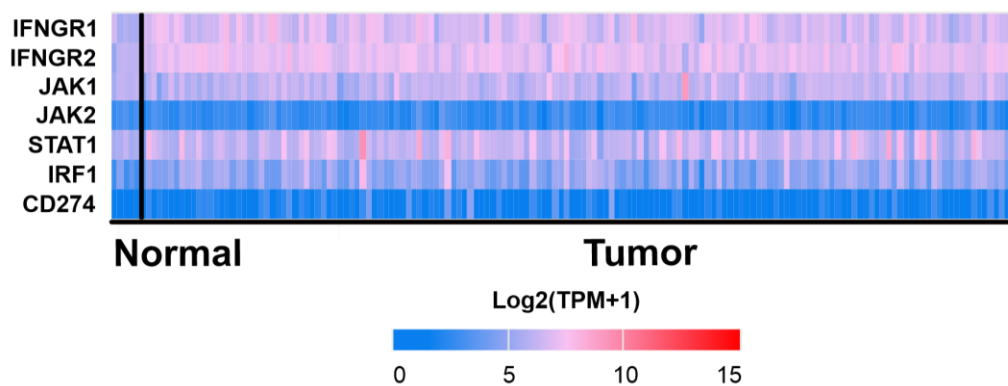


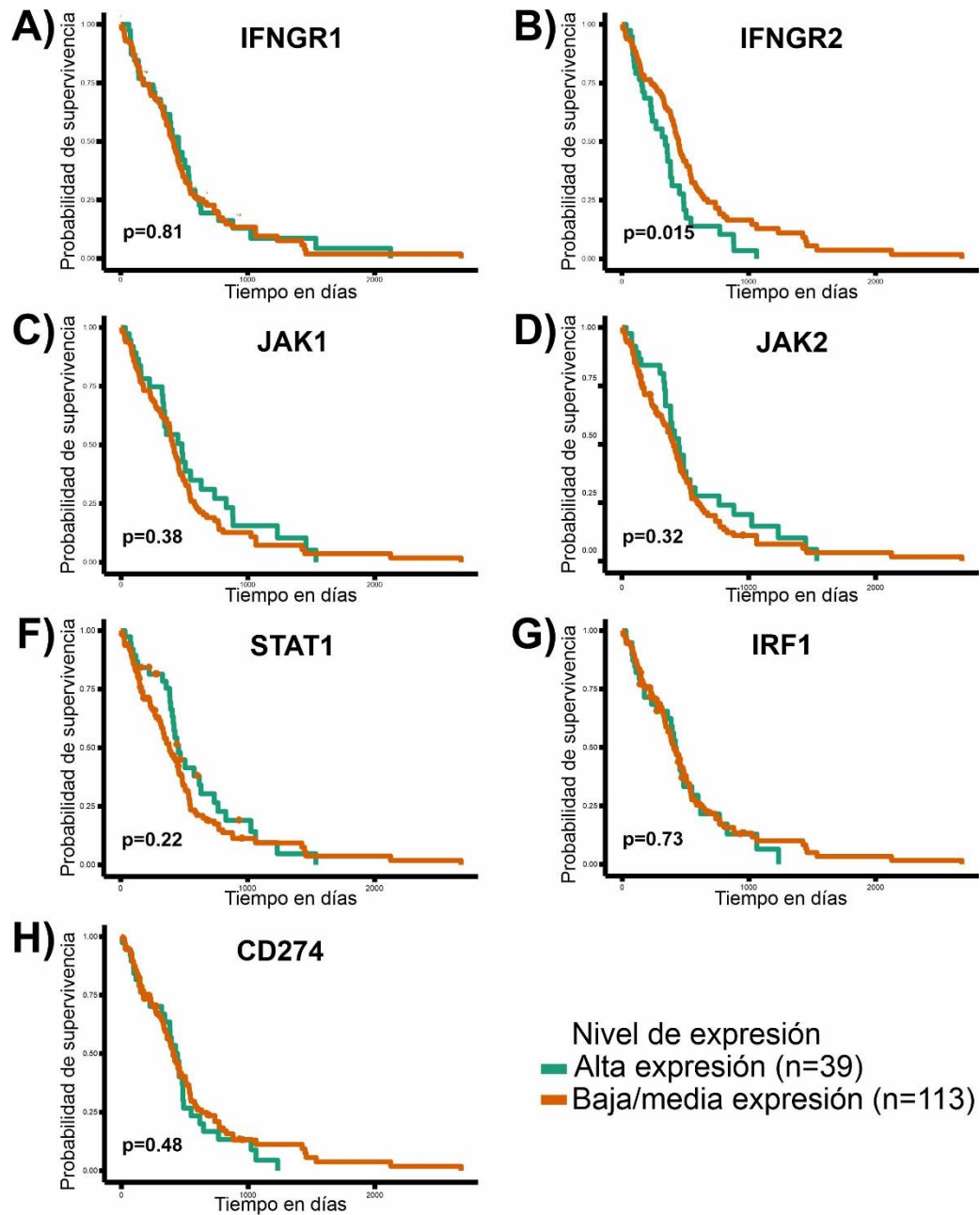
Figura 14. Mapa de calor con la expresión diferencial de los participantes de la vía de señalización del IFN- γ en pacientes con glioblastoma en comparación con pacientes en condiciones normales. Datos obtenidos de la base de datos UALCAN. Muestras de tejido normal (n= 5) y de tumor (n= 156).

Con la información obtenida tanto de datos provenientes de microarreglos, así como de RNAseq es posible confirmar que la vía de señalización del IFN- γ se encuentra alterada en un contexto de glioblastoma en comparación con tejido cerebral sano. La alteración de la vía se enfoca en puntos clave para la respuesta celular al IFN- γ como las subunidades de su receptor IFNGR1 e IFNGR2 y los factores de transcripción inducidos río abajo de la vía como STAT1 e IRF1.

Relación de la sobreexpresión de la vía de señalización del IFN- γ con la supervivencia de los pacientes con glioblastoma.

Tomando en cuenta la sobreexpresión de los participantes en la vía del IFN- γ en glioblastoma se analizó la relación de estos niveles de expresión con la supervivencia de los pacientes. Los resultados obtenidos del análisis muestran que el nivel de expresión de los genes de los elementos de la vía del IFN- γ no tiene un efecto en la supervivencia de pacientes con glioblastoma en comparación con pacientes saludables (Figura 15), con la excepción de la subunidad IFNGR2 del receptor del IFN- γ (Figura 15B). La sobreexpresión de IFNGR2 impacta de forma estadísticamente significativa el tiempo de supervivencia en pacientes con glioblastoma. En la figura 14 es posible observar que los pacientes que sobreexpresan a IFNGR2 tienen una menor probabilidad de sobrevivir mayor tiempo, en contraste con aquellos pacientes que cuentan con niveles bajos o medios de expresión de IFNGR2, quienes tienen una mayor probabilidad de sobrevivir por más tiempo. Estos datos sugieren que la expresión de IFNGR2 podría

afectar la supervivencia de los pacientes con glioblastoma, a través de la modulación de la vía de señalización del IFN- γ .



2. Determinación de la activación de la vía del IFN- γ en células derivadas de glioblastoma.

Previamente, se mostró que los genes que codifican para la mayoría de los componentes de la vía de señalización canónica del IFN- γ se encuentran sobreexpresados en muestras humanas de pacientes con glioblastoma. Por lo tanto, se decidió analizar la activación de la vía del IFN- γ en células de glioblastoma en cultivos celulares de una línea celular de glioblastoma. Como se mencionó anteriormente, la vía canónica de señalización del IFN- γ lleva a la activación de un factor de transcripción primario STAT1 que, por acción de las cinasas JAK1/2, es fosforilado y activado para translocarse al núcleo e inducir la transcripción de genes llamados ISGs (Alspach et al., 2019). Con la finalidad de reproducir datos del laboratorio previamente estandarizados sobre el estudio del papel del IFN- γ en las células LN-18 de glioblastoma, se realizó un ensayo empleando dos dosis y tiempos de tratamiento con IFN- γ , para evaluar la presencia de la forma inactiva del factor de transcripción (STAT1) y su forma activa (pSTAT1) mediante Western blot (Figura 16).

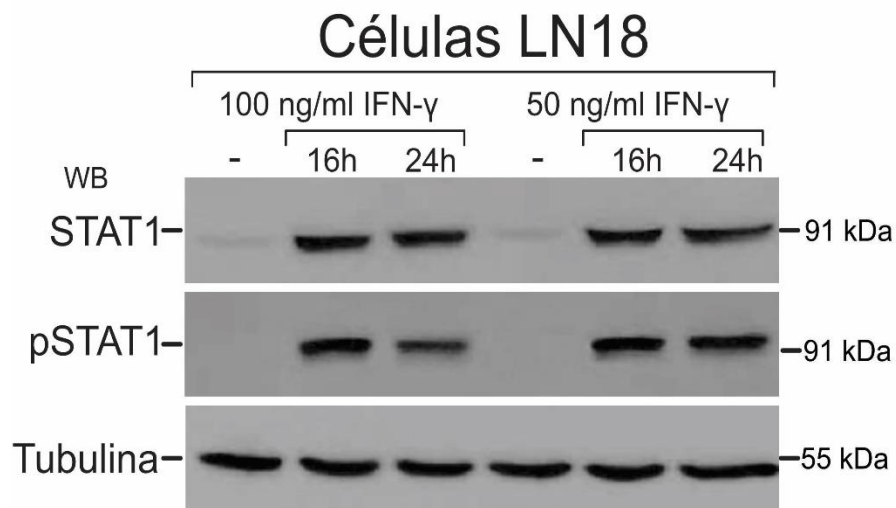


Figura 16. Niveles de STAT1 y pSTAT1 en la línea celular LN-18 sin estímulo y con estímulo de IFN- γ (100 ng/mL y 50 ng/mL) a diferentes tiempos (16h y 24h).

Con este análisis, se pudo observar que bajo el estímulo de IFN- γ a las 16 y 24 h, la vía del IFN- γ se activa al detectar un aumento en los niveles de la proteína pSTAT1 (factor de transcripción en su forma activa, fosforilada). Notablemente, los niveles de

la proteína STAT1 (en su forma inactiva) también se incrementan ante el estímulo del IFN- γ , lo que sugiere un proceso de autorregulación positiva de la vía.

Una vez que se corroboró que pSTAT1 se activa en las células de glioblastoma estimuladas con IFN- γ , analizamos los elementos río abajo de la vía del IFN- γ . En la vía de señalización canónica del IFN- γ , pSTAT1 es capaz de inducir la expresión de IRF1, un factor de transcripción activado por el IFN- γ que es clave para la expresión de genes de importancia en cáncer, entre los que se encuentra PD-L1, un elemento clave de la evasión inmune en diferentes tipos de tumores sólidos, como el glioblastoma (Litak et al., 2019; Sun et al., 2018). Por lo anterior, se evaluaron los niveles de IRF1 y PD-L1 en los mismos extractos de proteínas obtenidos de células de glioblastoma LN-18 estimuladas con IFN- γ . En esta línea celular, el estímulo con ambas dosis de IFN- γ incrementa los niveles de IRF1 y PD-L1; sin embargo, fue posible observar que el estímulo de 100 ng/mL de IFN- γ es capaz de inducir un aumento notable en los niveles de la proteína pro-tumoral PD-L1 (Figura 17).

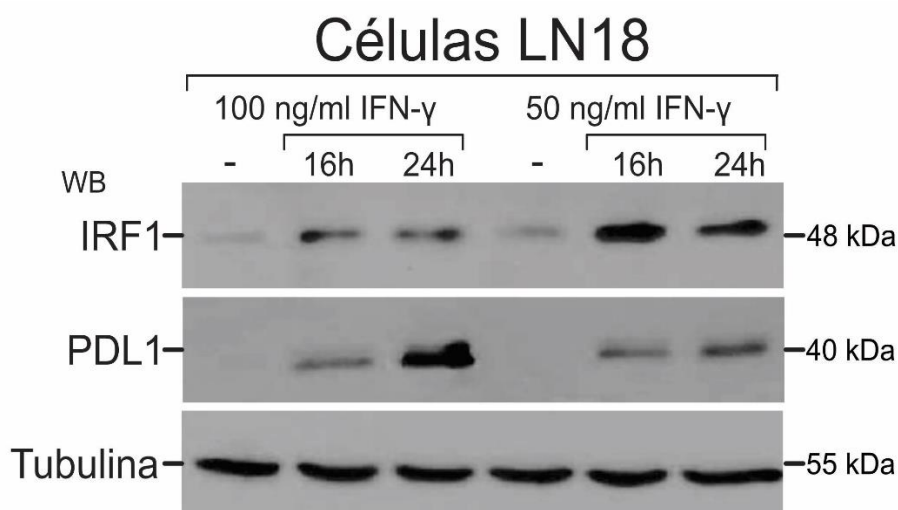


Figura 17. Niveles de IRF1 y PD-L1 en la línea celular LN-18 sin estímulo y con estímulo de IFN- γ (100 ng/mL y 50 ng/mL) a diferentes tiempos (16h y 24h).

En resumen, los niveles de los productos proteicos (IRF1 y PD-L1) de genes inducidos por la vía de señalización canónica del IFN- γ , se incrementan en respuesta al estímulo de este interferón en las células de glioblastoma.

Basados en los resultados anteriores, se eligió la dosis de 100 ng/mL de IFN- γ para proceder con los siguientes experimentos y evaluar el efecto pro-tumoral del IFN- γ sobre células de glioblastoma. Se corroboraron los niveles de las proteínas participantes de la vía canónica del IFN- γ en células de glioblastoma LN-18 estimuladas con 100 ng/mL de IFN- γ durante 24 h (Figura 18A), reafirmando que aumentan los niveles de las proteínas participantes de la vía canónica del IFN- γ y se presentan aumentos significativos en los niveles de las proteínas pSTAT1, IRF1 y PD-L1 en las células que recibieron el tratamiento con esta citocina (Figura 18B).

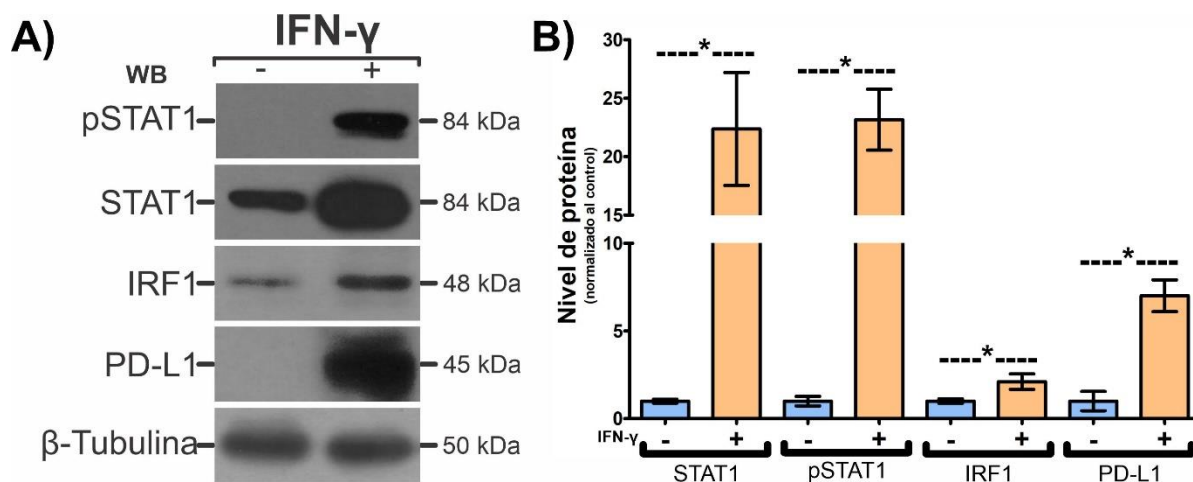


Figura 18. Niveles proteicos de los participantes de la vía canónica del IFN- γ en células de glioblastoma estimuladas con IFN- γ . A) Niveles de las proteínas STAT1, pSTAT1, IRF1 y PD-L1 en células LN-18 sin y con el estímulo de IFN- γ . B) Densitometría de la figura A, las proteínas pSTAT1, IRF1 y PD-L1 presentaron diferencias estadísticamente significativas en sus niveles proteicos bajo la influencia del IFN- γ . T-student, $p < 0.05$.

Estos datos indican que las células de glioblastoma son sensibles a la señal del IFN- γ , activando su vía de señalización canónica mediada por pSTAT1. Consecuentemente, el IFN- γ es capaz de inducir la expresión de IRF1, y secundariamente, incrementar los niveles de PD-L1, un factor que promueve la evasión inmune del tumor. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que a 24 h del tratamiento con IFN- γ , algunos genes pro-tumorigénicos podrían activarse para promover la progresión del glioblastoma.

3. Efecto del tratamiento con IFN- γ sobre la viabilidad y migración de las células de glioblastoma.

Para analizar el efecto que tiene el IFN- γ en células de glioblastoma sobre la viabilidad celular y la migración, se llevó a cabo el ensayo de calceína-yoduro de propidio en células sin tratamiento (panel superior) y tratadas con 100 ng/mL de IFN- γ (panel inferior), esta prueba nos permite observar a las células viables (verde) debido a la calceína y a las células no viables (rojo) por el yoduro de propidio. Como se puede observar en la figura 19, tanto las células no tratadas como las células que recibieron el estímulo con IFN- γ , no se presentan diferencias en cantidad y viabilidad, lo que nos permitió comprobar que la dosis de 100 ng/mL de IFN- γ no afecta la viabilidad de las células LN-18 de glioblastoma

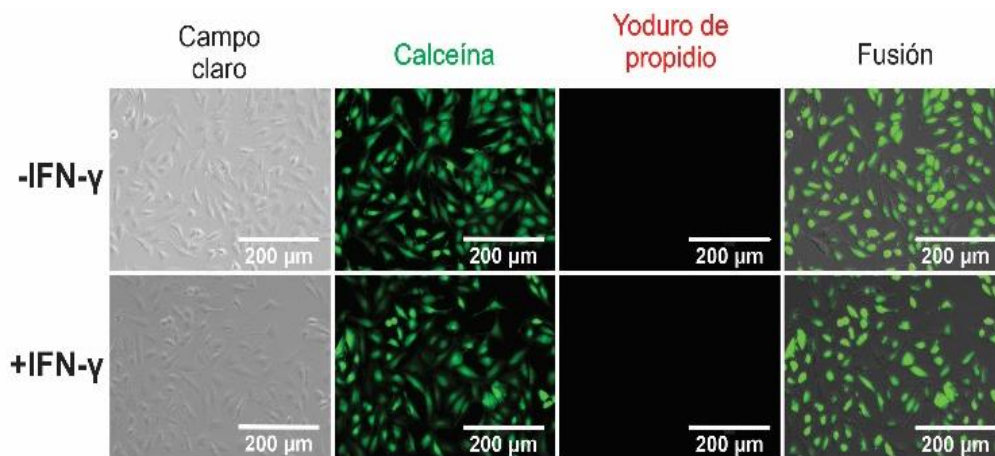


Figura 19. Prueba de calceína (verde)-yoduro de propidio (rojo) para determinar si el estímulo con 100 ng/mL de IFN- γ afecta la viabilidad celular de la línea LN-18 de glioblastoma. Al comparar el panel superior (con IFN- γ) con el panel inferior (100 ng/mL de IFN- γ) se pudo determinar que el IFN- γ no impacta sobre la viabilidad en células de glioblastoma.

Una vez determinado que el IFN- γ no afecta la viabilidad celular en la línea celular LN-18, nos interesó conocer si existía un cambio en la capacidad de migración de las células de glioblastoma en respuesta al estímulo con interferón. En este experimento se trataron a células de glioblastoma con 100 ng/mL de IFN- γ , se realizó un raspado en la monocapa celular simulando una herida y se tomaron registros fotográficos a las 0, 24 y 48 h posteriores. De esta manera pudimos observar que el IFN- γ es capaz de regular la capacidad de migración celular, como se puede observar en la figura 20, ya

que disminuyó el área de la herida en las células tratadas con esta citocina en comparación con aquellas que no recibieron el tratamiento (Figura 20A), además fue notable que, a las 24h, la diferencia es estadísticamente significativa en las células LN-18 que recibieron el estímulo de esta citocina (Figura 20B).

De esta manera determinamos que el IFN- γ favorece la capacidad de migración de las células de glioblastoma LN-18.

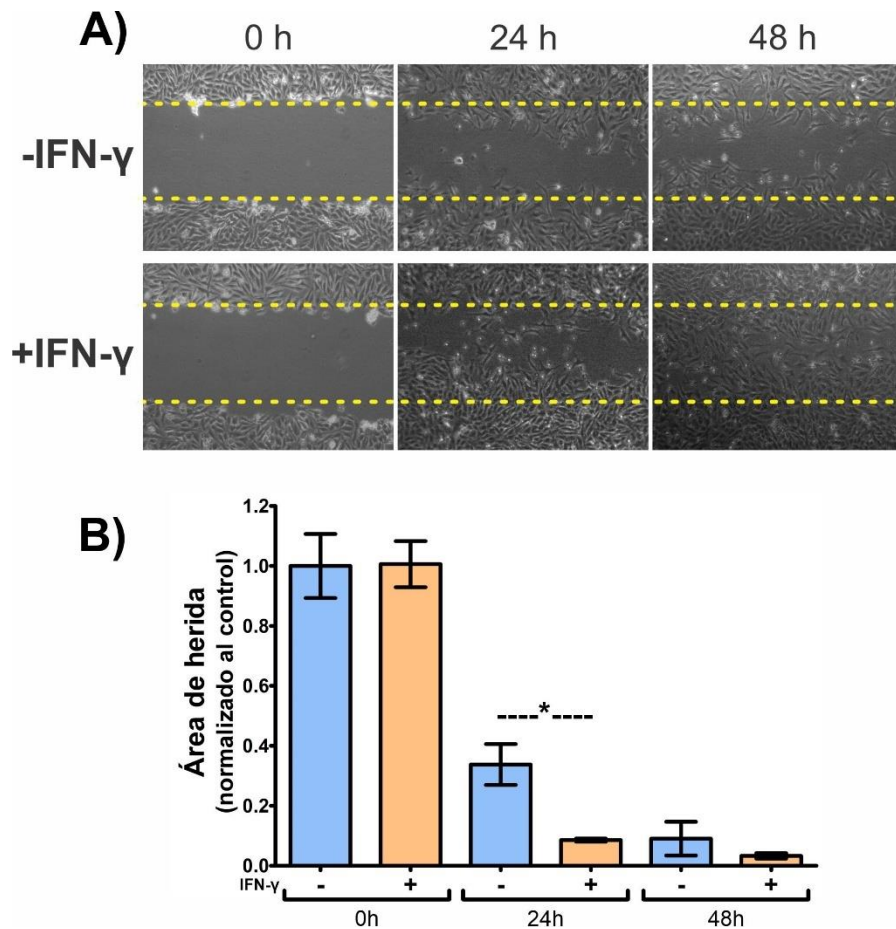


Figura 20. Prueba de cierre de herida para determinar la capacidad de migración de las células LN-18 estimuladas sin y con IFN- γ (100 ng/mL). A) Registro fotográfico tomado a las 0, 24 y 48h posterior a la adición del IFN- γ . B) Gráfico con el área de cierre de herida en sin y con IFN- γ , se muestra una diferencia significativa en el área de la herida a las 24 h de recibido el estímulo. T-student, $p < 0.05$.

Con los resultados anteriores concluimos que a pesar de que el IFN- γ no afecta en la viabilidad celular, sí favorece la migración de las células LN-18. Por consiguiente, la señalización inducida por el IFN- γ podría activar una vía molecular pro-tumorigénica en el contexto de glioblastoma.

4. miRNAs modulados por el IFN- γ en células de glioblastoma

En los apartados anteriores pudimos observar que en las células LN-18 de glioblastoma, la vía canónica del IFN- γ se activa en respuesta al estímulo con 100 ng/mL de IFN- γ , lo que favorece la expresión de PD-L1 que en este contexto actúa como pro-tumorigénica; además, pudimos comprobar que la activación de esta vía aumenta la capacidad de migración de las células LN-18 de forma significativa. Englobando los resultados anteriores, es posible inferir que, en un contexto de glioblastoma, el IFN- γ tiene un efecto pro-tumoral, por lo que fue de nuestro interés saber si este interferón ejercía su actividad pro-tumoral a través de la modulación de miRNAs importantes en el desarrollo del glioblastoma.

Se realizó el tamizaje de un panel de 84 miRNAs relevantes en diferentes tipos de cáncer del SNC y como resultado, se identificaron dos grupos de miRNAs regulados por el IFN- γ . Se encontró que los resultados mostraron un aumento en la expresión de los miRNAs miR-132-3p, miR-153-3p, miR182-5p, miR-27a-3p, miR-29a-3p, miR-29b-3p, miR-335-5p, y miR-451a en las células LN-18 de glioblastoma. Por otra parte, la expresión de los miRNAs miR-106b-5p, miR-127-5p, miR-130b-3p, miR-137-3p, miR-141-3p, miR-296-5p, miR-320a-3p y miR-486-5p fue disminuída por esta citocina (Figura 21).

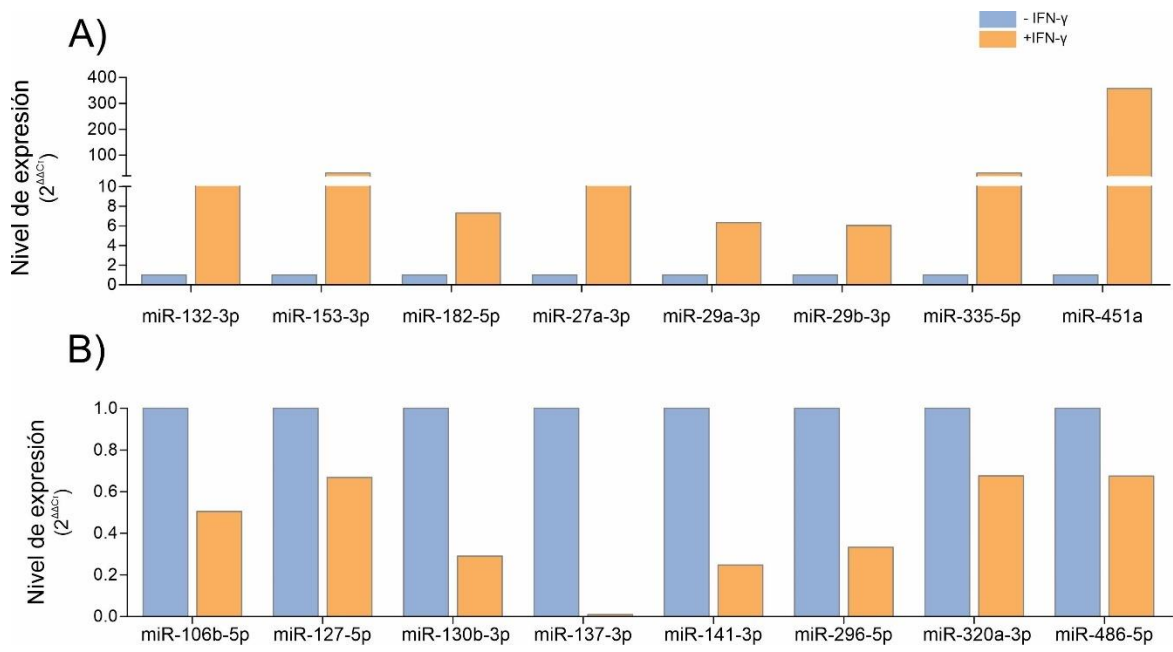


Figura 21. Nivel de expresión de los miRNAs regulados positivamente (A) y negativamente (B) por el estímulo de 100 ng/mL de IFN-γ durante 24 h sobre células LN-18 de glioblastoma.

En seguida se realizó un análisis de enriquecimiento funcional de los miRNAs regulados positivamente por el IFN-γ. Estos miRNAs se filtraron con la base de datos Mienturnet (<http://userver.bio.uniroma1.it/apps/mienturnet/>), seleccionando sólo a aquellos miRNAs que tuvieran al menos dos mRNAs blanco, a partir de lo cual, se seleccionaron 6 miRNAs: miR-132-3p, miR-153-3p, miR-182-5p, miR-27a-3p, miR-29a-3p y miR-29b-3p. Estos miRNAs seleccionados se analizaron con las bases de datos KEGG y Reactome (Figura 22). El análisis de estos miRNAs con la base de datos KEGG, nos permitió observar que se encuentran involucrados en vías importantes en el desarrollo y progresión distintos tipos del cáncer como la vía PI3K-AKT, la vía MAPK y en la apoptosis; por otra parte, con la ayuda de la base de datos Reactome se pudo observar que estos miRNAs están relacionados con la vía del VEGF y se corroboró su implicación en la vía PI3K-AKT en el cáncer.

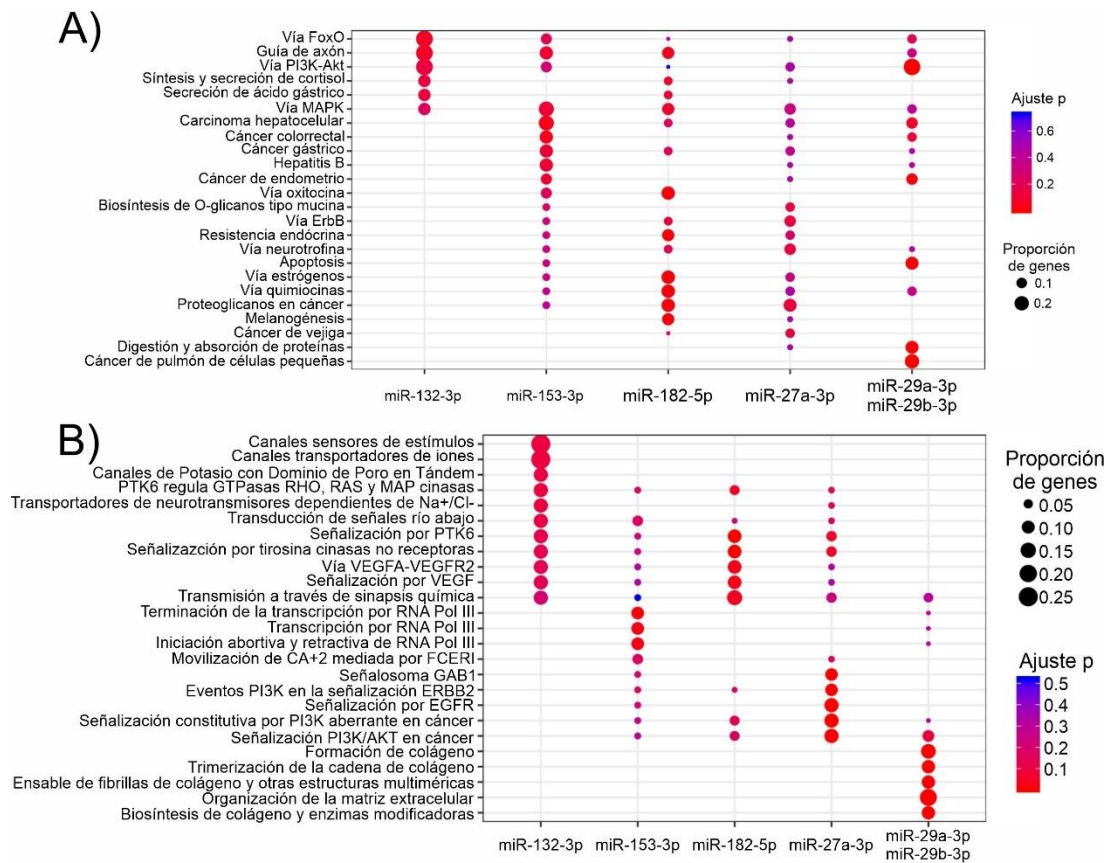


Figura 22. Análisis de enriquecimiento funcional de los miRNAs regulados a la alta por acción del IFN- γ en células LN-18 de glioblastoma con las bases de datos KEGG (A) y Reactome (B).

Así mismo, se realizaron análisis de enriquecimiento funcional con los miRNAs que fueron regulados negativamente por el estímulo con 100 ng/mL de IFN- γ en células de glioblastoma. Con la plataforma Mienturnet se realizó el filtrado y selección de miRNAs, eligiendo a aquellos que tuvieran al menos dos mRNAs blanco y obteniendo como resultado la identificación de miR-106b-5p, miR-130b-3p y miR-141-3p (Figura 23). Con el análisis a través de KEGG es posible observar que estos miRNAs, al ser regulados negativamente repercuten en vías de señalización como la de HIF-1, la de mTOR y en distintos procesos presentes en diferentes tipos de cáncer. Además, Reactome nos permitió conocer que estos miRNAs también son relevantes en vías de señalización importantes en el cáncer como la vía del TGF- β y en la regulación de PTEN.

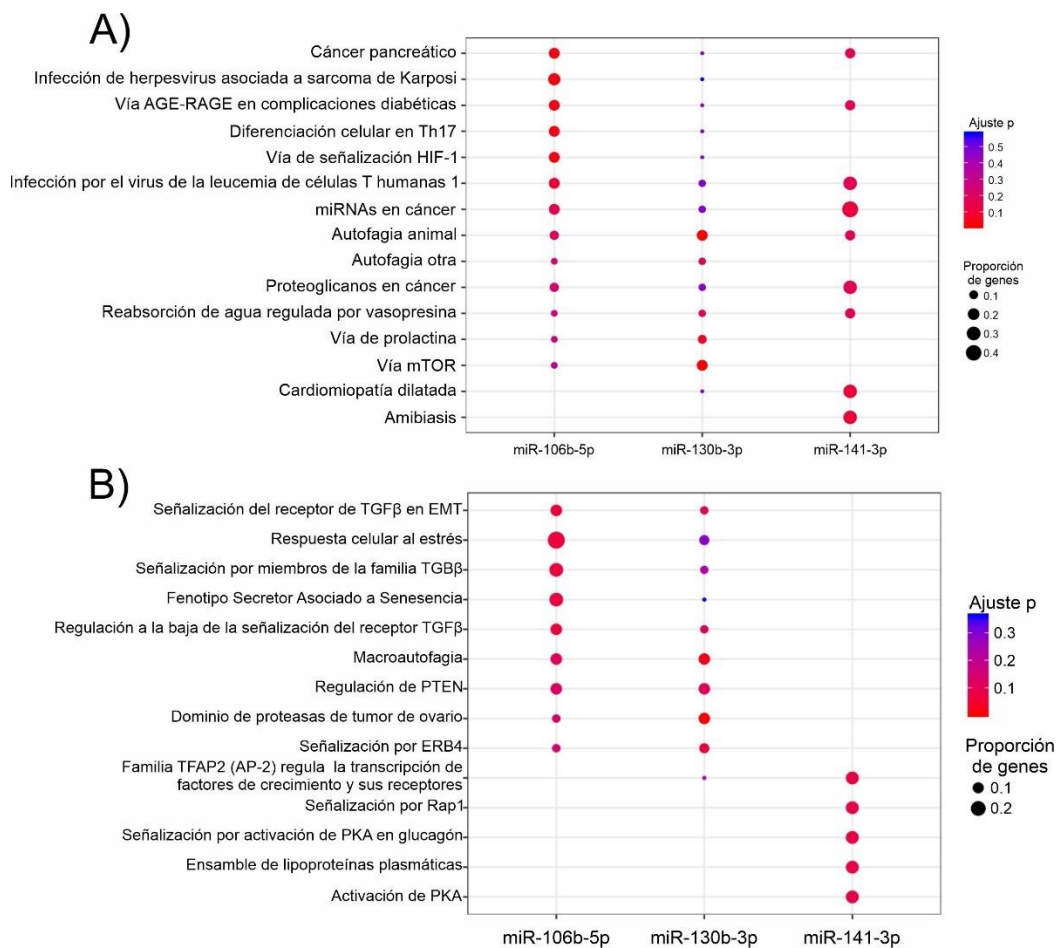


Figura 23. Análisis de enriquecimiento funcional de los miRNAs regulados a la baja por acción del IFN- γ en células LN-18 de glioblastoma con las bases de datos KEGG (A) y Reactome (B).

Con estos resultados, podemos concluir que el IFN- γ modula diferencialmente el perfil de expresión de distintos miRNAs, lo cual es relevante al afectar diferentes vías de señalización y procesos importantes en el desarrollo y progresión del cáncer. La información obtenida a partir del análisis de miRNAs apoya los resultados previos de este trabajo: el IFN- γ posee una actividad pro-tumoral en células de glioblastoma.

DISCUSIÓN

En las últimas décadas se han incrementado los estudios sobre el IFN- γ en el contexto del cáncer, mostrando que es una citocina que juega papeles duales en el desarrollo y la progresión de esta enfermedad. Esta dualidad se muestra en diferentes aspectos, como son la expresión de los genes que codifican para los componentes de la vía del

IFN- γ , los cambios en los niveles de las proteínas que conforman esta vía, en la función de vías de señalización importantes y sus efectos celulares, lo que en conjunto contribuye a determinar los perfiles característicos de cada tipo de cáncer (Zamora-Salas et al., 2023). A pesar de que, con el paso de los años, se ha incrementado el conocimiento sobre las acciones de este interferón en diferentes tipos de cáncer, en el caso del glioblastoma aún hay mucho por conocer. Particularmente, es importante determinar el impacto que tiene la activación de la vía de señalización del IFN- γ sobre el transcriptoma y el perfil pro-tumorigénico de las células cancerosas, lo cual es un área de estudio que demanda mayor atención.

Por esta razón en este trabajo nos enfocamos en analizar la participación del IFN- γ como un posible factor con actividad pro-tumoral en el glioblastoma. Para ello se efectuó un análisis de los niveles de los transcritos codificantes y de las proteínas de los componentes de su vía, así como su efecto en la viabilidad y la migración celular, y finalmente, identificamos a los miRNAs modulados por la acción de esta citocina en las células de glioblastoma.

Uno de los puntos fundamentales es conocer cuál es el perfil de expresión de los componentes de la vía canónica del IFN- γ que dan como resultado eventos posteriores como la inducción de la expresión de genes blanco y la regulación de distintas respuestas celulares. En este sentido, primer aspecto a conocer en este trabajo fue el determinar los niveles de expresión de los elementos de la vía de señalización canónica del IFN- γ en glioblastoma. Para esto se utilizó información proveniente de las bases de datos GEPIA y UALCAN que son repositorios de datos de RNA-seq de muestras de pacientes con glioblastoma y otras patologías, con las cuales se analizó el nivel de expresión de los componentes del receptor del IFN- γ (IFNGR1 e IFNGR2), las cinasas JAK1 y JAK2, los efectores STAT1, IRF1 y CD274 y el gen codificante para la proteína pro-tumoral PD-L1.

Con este análisis observó que, en general, existe una sobreexpresión de los elementos de la vía del IFN- γ en glioblastoma; siendo significativa la sobreexpresión en dos puntos clave de esta vía de señalización: el primero es el receptor del IFN- γ , ya que

tanto la subunidad IFNGR1 como la subunidad IFNGR2, que presentan una sobreexpresión con significancia estadística en glioblastoma en comparación con tejido normal. Esto es relevante, ya que la subunidad IFNGR1, es la encargada de la afinidad con el ligando, mientras que la subunidad IFNGR2 se encarga de fortalecer la unión de todas las subunidades del receptor y de transducir la señal al interior de la célula, dando paso al inicio de la cascada de señalización (Bach et al., 1997; Marsters et al., 1995).

Se ha observado que la falta de la subunidad IFNGR1 priva de la capacidad de unión del IFN- γ a su receptor y, en consecuencia se reduce la señalización en la célula (Christie et al., 2020). Por otra parte, la falta de IFNGR2 no afecta la unión del ligando al receptor, pero imposibilita la iniciación de la cascada de señalización, ya que no se transduce la señal de la unión ligando-receptor hacia el interior de la célula (Okada et al., 2007). Además, está reportado que el nivel de expresión de IFNGR2 es el factor limitante que define el número de receptores de IFN- γ funcionales y por lo tanto también es crítico en la modulación de señales celulares inducidas por esta citocina (Bernabei et al., 2001).

En cáncer, la unión del IFN- γ a su receptor ha sido estudiado por ser determinante para la inducción de ISGs que generan una respuesta celular de importancia en esta patología. En cáncer de mama, por ejemplo, se reporta la reducción en la expresión de IFNGR1, lo que indica que la vía de señalización del IFN- γ se ve afectada y se relaciona con la expresión de genes específicos asociados con la progresión del cáncer de mama (Tecalco-Cruz et al., 2021). En glioblastoma, por otro lado, la relación de la expresión del receptor con el perfil de expresión génico y sus efectos anti o pro-tumorales aún no se encuentran elucidados. Sin embargo, en este trabajo observamos un incremento en los niveles de los receptores para IFN- γ en glioblastoma respecto al tejido de cerebro normal, es decir, lo opuesto a lo observado en cáncer de mama. Además, de acuerdo con nuestro análisis, la sobreexpresión de IFNGR2 se correlaciona significativamente con una sobrevida reducida en pacientes con glioblastoma.

Como se mencionó previamente, la vía de señalización canónica del IFN- γ activa a STAT1 que a su vez induce a IRF1 y, en conjunto, estos dos factores de transcripción son los encargados de favorecer la expresión de un gran número de genes relacionados con la proliferación celular, la apoptosis, el control del ciclo celular, el crecimiento celular y la expresión de genes supresores de tumor (Jorgovanovic et al., 2020). Es aquí, en donde se encuentra el segundo punto de sobreexpresión significativa de esta vía, en este estudio se encontró la sobreexpresión tanto de STAT1 como IRF1 en tejido con glioblastoma en comparación con tejido normal. Existe la evidencia de que la expresión de STAT1 e IRF1 son de gran importancia para la expresión robusta de ISGs, ya que se ha descubierto que estos factores de transcripción inducen la expresión génica individualmente, pero en mayor medida lo hacen de forma cooperativa (Abou El Hassan et al., 2017). De esta manera, al tener un aumento de ambos factores de transcripción, podemos suponer que se induce la expresión de genes relacionados a las respuestas inmunes innata y adaptativa, así como genes codificantes de reguladores del ciclo y crecimiento celular como p21, de inductores de apoptosis como las caspasas 7 y 3, de receptores implicados en la invasión y la migración como CSCR4, y de genes inmunosupresores como PD-L1, entre otros (R. Q. Chen et al., 2019; Chin et al., 1996; Imai et al., 2020; Song et al., 2019; Tolomeo et al., 2022) .

En general, el análisis *in silico* de datos de pacientes muestran que los elementos de esta vía están sobreexpresados, principalmente el receptor del IFN- γ y en los factores de transcripción STAT1 e IRF1, lo que sugiere que en el contexto de glioblastoma existe una mayor sensibilidad a esta citocina.

La activación de la vía de señalización canónica requiere de la fosforilación de STAT1 por acción de JAK1/2 lo que conduce a su homodimerización, a su translocación al núcleo para comenzar su actividad transcripcional (Zamora-Salas et al., 2023). Existen diferentes factores que podrían afectar la correcta activación de esta vía de señalización, uno de ellos es la expresión de IFNGR2 que determina la pronta o tardía activación de STAT1 y la óptima inducción de IRF1, lo que permite las respuestas en células sensibles al IFN- γ (Bernabei et al., 2001). Por otro lado, debido a que también pueden existir mutaciones en las cinasas JAK1/2 que impidan la fosforilación de

STAT1 e interrumpan la cascada de señalización (Lei et al., 2020). Por esta razón, fue nuestra prioridad corroborar si es que la vía de señalización canónica del IFN- γ se activa en células de glioblastoma LN-18, mediante la detección de la forma fosforilada de STAT1 (pSTAT1). Como resultado, pSTAT1 se detectó incrementada tras la estimulación con IFN- γ , y además se detectó IRF1 y PD-L1, una proteína de respuesta secundaria que actúa como pro-tumorigénica al inhibir la activación de los linfocitos T. Estos resultados son concordantes con lo reportado por Jung y sus colaboradores, quienes observaron una *superinducción* de PD-L1 en células de glioblastoma tras 24 h de estimulación con una dosis de 100 ng/mL de IFN- γ (Jung et al., 2022). De este modo, se comprobó que el IFN- γ activa de la vía canónica debido al incremento en los niveles de la proteína pSTAT1, responsable de inducir a los ISGs como IRF1, quien a su vez cuenta con una actividad transcripcional sobre diferentes genes, muchos de los cuales, aún se desconocen en el glioblastoma, pero hay algunas excepciones como PD-L1 que es un gen secundario con actividad pro-tumoral relacionado a la evasión inmune (Jung et al., 2022).

Un aspecto que llamó nuestra atención fue el aumento en los niveles de la proteína STAT1 en células de glioblastoma tras el estímulo con IFN- γ . Hasta antes de la elaboración de este trabajo, no se encontraron reportes similares en glioblastoma. Sin embargo, en fibroblastos está reportado que existe un asa de regulación positiva entre STAT1 e IRF1 a través de un dominio distal en la región regulatoria de STAT1, fenómeno que pudiera estar replicándose en glioblastoma, pero se requieren más estudios para determinarlo (Yuasa & Hijikata, 2016).

En este trabajo se pudo comprobar que la vía de señalización canónica del IFN- γ se activa en células de glioblastoma y que también se presenta un incremento en los niveles de IRF1 y PD-L1, lo que sugiere fuertemente que el IFN- γ ejerce un efecto pro-tumoral en el glioblastoma. Adicionalmente, los resultados obtenidos sobre el aumento en los niveles de la proteína STAT1 sugieren la presencia de un asa de regulación positiva.

El perfil de expresión génica en una célula es determinante para la activación de diferentes respuestas, que en el mismo tipo celular pueden variar bajo diferentes

estímulos y contextos. Como se mencionó previamente, el estímulo con IFN- γ no induce las mismas respuestas en todas las células, ya que estas respuestas varían dependiendo del tipo celular, el estado patológico, la dosis y el tiempo de exposición al estímulo, etc. Por ejemplo, en NSCLC el tratamiento con dosis bajas de IFN- γ induce la troncalidad de las células por la vía ICAM1-PI3K-Akt-Notch1 y favorece la EMT; pero las dosis altas promueven la apoptosis por la activación de caspasas, gracias a la vía canónica del IFN- γ (Song et al., 2019). Por lo que, una vez comprobada la activación de la vía canónica del IFN- γ en las células de glioblastoma, fue pertinente conocer la manera en que influye este estímulo en dos efectos de importancia en las células tumorales: la viabilidad y la migración.

Los resultados de este trabajo demuestran que el IFN- γ no afecta en la viabilidad celular de la línea LN-18, pero sí favorece su migración de una forma significativa, como lo observamos a las 24 h de estimulación. Este mismo efecto puede ser observado en una línea celular metastásica de ganglios linfáticos en las que el IFN- γ favorece un fenotipo de células troncales cancerosas a través de la expresión del receptor CSCR4 que incrementa el potencial de migración celular (H. C. Chen et al., 2011). Además, en células de cáncer de próstata se aumenta la capacidad de migración celular con el estímulo de IFN- γ , y un factor determinante para este efecto es la presencia de STAT1 (Lo et al., 2018). Lo anterior, nos sugiere que STAT1 podría estar induciendo una serie de ISGs que favorezcan la capacidad de migración de las células LN-18 de glioblastoma bajo el estímulo con IFN- γ ; sin embargo, los mecanismos de regulación subyacentes a esta respuesta aún se necesitan explorarse.

En materia de regulación génica, los miRNAs cobran especial relevancia, ya que son capaces de modular la expresión de cerca del 60% del total de genes, y en el cáncer se han identificado onco-miRNAs con actividades pro-tumorales y miRNAs supresores de tumores. En glioblastoma se tienen identificados un gran número de miRNAs desregulados que impactan en los *hallmarks* o sellos característicos del cáncer como la proliferación celular, la respuesta a supresores de crecimiento, la apoptosis, la migración, la invasión y la angiogénesis, siendo los onco-miRNAs los que se encuentran con mayor frecuencia sobreexpresados en este tumor (Peng & Croce, 2016; Rezaei et al., 2020).

En cáncer, la modificación del perfil de expresión de miRNAs es muy característico y se debe a factores como la amplificación o delección de los genes codificantes para miRNAs, el control transcripcional de los genes codificantes para miRNAs, cambios epigenéticos desregulados, defectos en la maquinaria de biogénesis de los miRNAs y adicionalmente a las redes de regulación de los ncRNAs (Peng & Croce, 2016). Estos mecanismos pueden ocurrir en diferentes combinaciones y temporalidades, y en el estudio del IFN- γ en glioblastoma aún están por elucidarse.

En este contexto, nos interesamos en identificar a los miRNAs modulados por el IFN- γ en las células LN-18 de glioblastoma, un campo inexplorado hasta el momento. A través de un tamizaje de 83 miRNAs importantes en el cáncer del SNC identificamos una firma de ocho miRNAs modulados positivamente de los cuales se seleccionaron aquellos con al menos dos mRNAs blanco, identificando a los miRNAs miR-132-3p, miR-153-3p, miR-182-5p, miR-27a-3p, miR-29a-3p y miR-29b-3p. Con el análisis de enriquecimiento funcional se observó que estos miRNAs están implicados en mecanismos de relevancia como la vía PI3K-AKT primordial en procesos de crecimiento, proliferación, apoptosis, metabolismo celular, entre otros (Du et al., 2022); y en la vía de las MAPK reguladora de procesos como proliferación, diferenciación, mitosis, supervivencia celular y apoptosis, entre otras (Alspach et al., 2019; Kursunel & Esendagli, 2016).

El miR-132 recurrentemente está relacionado con la progresión de diferentes tipos de cáncer por su implicación en la regulación de vías como PI3K / AKT, TGF β , mTOR, Rb1, p53, vías de apoptosis, la glucólisis y por ejercer efectos directos sobre el crecimiento celular, la proliferación, la invasión, la migración, entre otras; específicamente en el glioblastoma, el miR-132 promueve la quimiorresistencia al tratamiento con TMZ (Florian et al., 2020; Rafat et al., 2021).

El miR-153 induce efectos tanto anti-tumorales como pro-tumorales dependiendo del tipo celular, con diferentes perfiles de expresión génica. Este miRNA es de gran importancia en la carcinogénesis, ya que su sobreexpresión está implicada en la represión de PTEN y en la consecuente activación de PI3K/AKT lo que resulta en la progresión del ciclo celular y el aumento de la proliferación. Contrario a lo encontrado

en el presente trabajo, en glioblastoma se ha reportado la reducción de la expresión de este miRNA, lo que resulta en la represión de la vía AKT y en la inhibición de la proliferación celular (Yousefnia, 2022). Estos resultados contradictorios podrían deberse a la dosis del IFN- γ , al tiempo de exposición y la línea celular de estudio, lo cual abre una ventana de estudio sobre el tema. Por su parte, el miR-182-5p se ha reportado en diferentes líneas celulares de glioblastoma, incluyendo la líneas LN-18, en donde presenta una sobreexpresión, que influye en la sobreexpresión de VEGFR y promoviendo la angiogénesis, por otro lado está implicado en la reducción de los niveles de proteínas como ocludina, ZO-1 y claudina-5, lo que da como resultado la EMT y la permeabilidad vascular, así como el favorecimiento de la proliferación celular (Balandeh et al., 2021).

El miR-27a también es un onco-miRNA regulador de vías como la vías como de AKT con blancos como Bcl-2, PI3K y prohibitina, lo que induce el aumento en la proliferación y crecimiento celular; también regula a la vía Wnt/ β -catenina favoreciendo la EMT; a la vía Ras/MEK/ERK favoreciendo la proliferación celular y finalmente a la vía del TGF- β con la que promueve la proliferación e invasión (J. Zhang et al., 2019). Por otro lado, el miR-29 también tiene actividades duales en el cáncer, influyendo en la proliferación, la apoptosis, la metástasis, la EMT, entre otros; sin embargo, existen reportes individuales en donde el estímulo con IFN- γ induce una actividad de reducción de apoptosis por la regulación negativa de CDK6, lo que coincide con un reporte en glioblastoma, en el que funge como gen supresor de tumores por inhibir al gen SREBP-1 y regular el metabolismo de lípidos (Kwon et al., 2019).

De los ocho miRNAs regulados negativamente se seleccionaron a miR-106b-5p, miR-130b-3p y miR-141-3p y, con el análisis de enriquecimiento funcional se pudo observar que influyen en vías como la de HIF-1, factor determinante para la inducción de angiogénesis en respuesta a la hipoxia, y la vía de mTOR que en glioblastoma está relacionada con el aumento de la capacidad de migración y resistencia a tratamientos de las células tumorales y autofagia (Antunes et al., 2020; Schiffer et al., 2019).

El miR106b también es un miRNA con un papel dual que parece depender del tipo celular y del tipo de cáncer, está relacionado con procesos de senescencia, ciclo

celular, proliferación, apoptosis, migración, invasión, troncalidad celular y quimio-sensibilidad. En glioblastoma, se ha reportado la sobreexpresión de este onco-miR lo que reduce la expresión de RBL1, RBL2 y CASP8, lo que favorece la proliferación celular, la evasión de apoptosis y la migración celular (Rezaei et al., 2020; Yang et al., 2019). El miR-141 por su parte influye sobre actividades como la EMT a través de la vía TGF- β / HIPK2; la proliferación celular por regular a TAZ y ZEB2; el arresto del ciclo celular a través de p21/Kip1 y CDK6; la apoptosis a través de la vía PI3K/AKT en donde AKT es esencial en la regulación de la senescencia, la supervivencia y la apoptosis; la invasión y la metástasis tumoral a través de la regulación de ZEB1 y ZEB2, Rb/E2F, AKT, EGF; y finalmente en el proceso de angiogénesis por la reducción de los niveles de la proteína KLF6 y el incremento de la secreción de VEGFA que da como resultado un proceso de neoangiogénesis (Gao et al., 2016).

Es de gran relevancia para este trabajo la modulación del miR-130b por el IFN- γ en glioblastoma. Este es un miRNA que, además de estar involucrado en la regulación de respuestas inflamatorias, quimiorresistencia y proliferación por tener como blanco a PTEN, se ha encontrado que en diferentes patologías y tipos celulares, ejerce una regulación negativa sobre la región 3'UTR de IRF1, en donde se presentan dos sitios de unión para este miR-130b a través de los cuajes reprime a este factor transcripcional (Y. H. Lin et al., 2015). En macrófagos se ha visto que el miR-130b favorece su polarización a M1 por la regulación negativa de IRF1 (Guo et al., 2021). En un modelo de isquemia y reperusión cerebral, se determinó que el IRF1 favorece la apoptosis en las células tratadas, lo que se relaciona con un proceso de muerte neuronal por embolia; sin embargo, la sobreexpresión inducida del miR-130b reduce este efecto, favoreciendo la viabilidad celular (Liu et al., 2020). En células de hepatoma la presencia del miR-130b reduce en un 40-50% la expresión de IRF1, con lo que se puede observar una reducción marcada en la fosforilación y actividad de mTOR, STAT3, AKT, ERK1/2, pero no en sus niveles proteicos totales. En consecuencia, se presenta una reducción notable en la inhibición de la migración y de la invasión celular (Y. H. Lin et al., 2015). Por otra parte, en un escenario de calcinosis renal, el miR-130b está bajo la regulación negativa del lncRNA NEAT1, lo que reduce su actividad inhibitoria sobre IRF1, evento que favorece la señalización de este factor de

transcripción (Q. Yan et al., 2022). En el presente trabajo, este miRNA se encuentra regulado negativamente en células de glioblastoma tratadas con IFN- γ , lo que podría estar sugiriendo que el miR-130b podría estar sujeto a un eje de regulación similar, favoreciendo la actividad transcripcional de IRF1 y en consecuencia las respuestas celulares pro-tumorales.

Con estos resultados podemos sugerir que el IFN- γ es capaz de modular la expresión de miRNAs tanto positiva como negativamente. Una firma de miRNAs que en su mayoría coinciden con los reportes previos de nivel de expresión e inducción de actividades pro-tumorales (Figura 25). Por otra parte, el miR-130b es de gran relevancia en el contexto de la vía canónica de señalización del IFN- γ , ya que tiene como blanco directo a IRF1 y, como los antecedentes indican, su expresión reducida favorece una actividad pro-tumoral. Así, nuestros resultados sugieren que la vía canónica de señalización del IFN- γ tiene una actividad pro-tumoral en el glioblastoma y que uno de sus mecanismos moleculares es la modulación a nivel transcripcional de la expresión de una firma de miRNAs específicos.

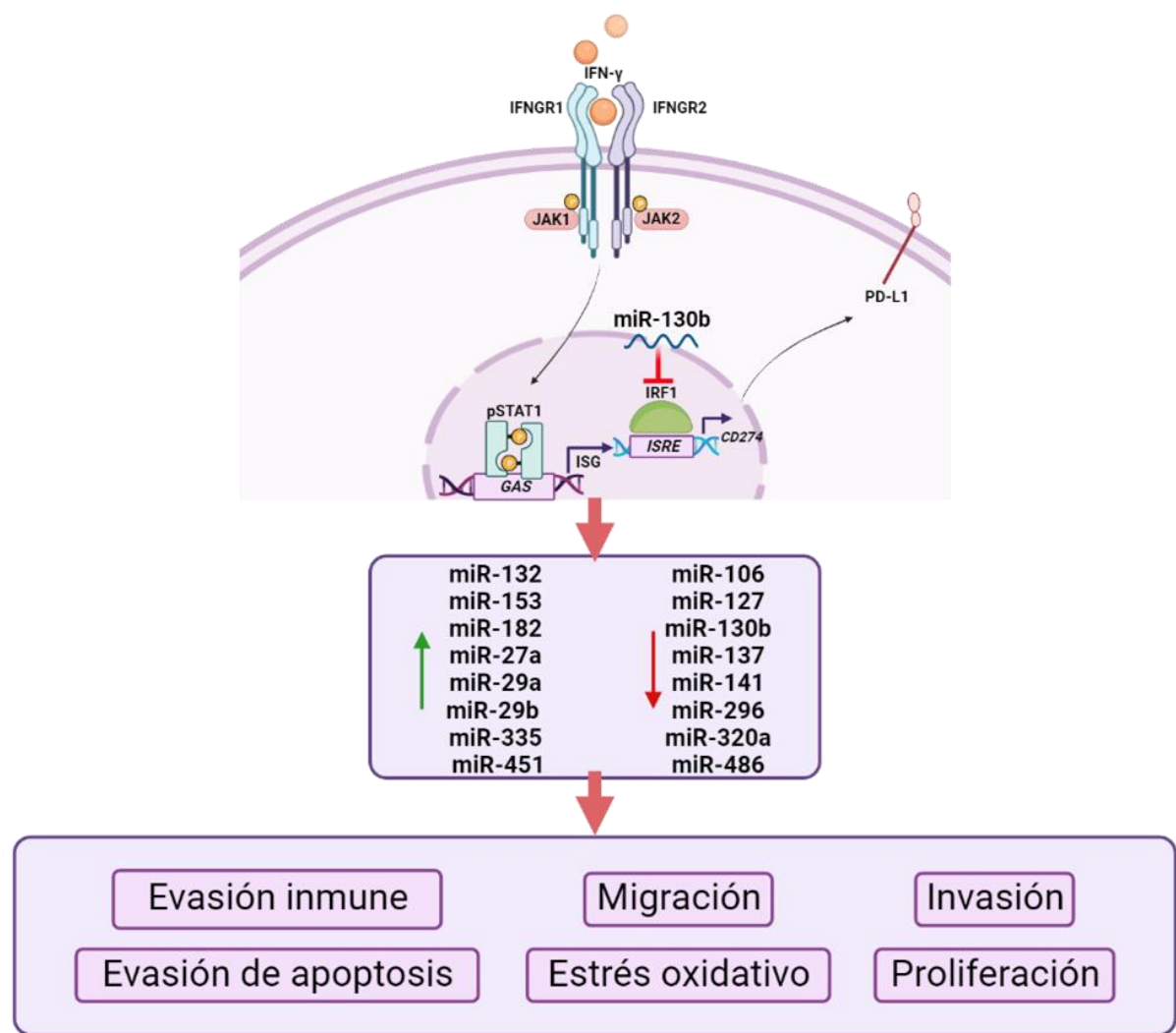


Figura 25. Modelo propuesto sobre los miRNAs modulados por la vía de señalización canónica del IFN-γ a la alza y a la baja, así como de las respuestas celulares con las que se encuentran relacionados. Creado con Biorender.com

CONCLUSIONES

En muestras de pacientes con glioblastoma, el receptor del IFN- γ y STAT1 e IRF1 están sobreexpresados.

En las células de glioblastoma LN-18, la activación de la vía de señalización del IFN- γ incrementa los niveles de STAT1, pSTAT1, IRF1 y de uno de sus productos génicos pro-tumorales (PD-L1), además de que, aumentando la capacidad de migración celular.

La activación de la vía de señalización del IFN- γ modula diferencialmente la expresión de una firma de miRNAs asociada con un efecto pro-tumorigénico en las células de glioblastoma. Uno de los miRNAs modulado negativamente por el IFN- γ es el miR-130b que tiene como blanco directo a IRF1, y a través de esta regulación, podría incrementar los niveles de IRF1 para inducir un efecto pro-tumoral.

PERSPECTIVAS

Con base en los resultados de este estudio, se proponen las siguientes perspectivas:

- Corroborar que la expresión del miR-130b esté reducida en células de glioblastoma LN-18 tratadas con IFN- γ y que esto se relacione con efectos pro-tumorales.
- Probar diferentes tiempos largos de exposición al tratamiento del IFN- γ y analizar su efecto en la expresión de miRNAs.
- Analizar si la vía no canónica del IFN- γ se implica en la señalización del IFN- γ sobre células LN-18 de glioblastoma y si esta modula una firma de miRNAs asociados al efecto pro-tumoral.

BIBLIOGRAFÍA

- Abou El Hassan, M., Huang, K., Eswara, M. B. K., Xu, Z., Yu, T., Aubry, A., Ni, Z., Livne-bar, I., Sangwan, M., Ahmad, M., & Bremner, R. (2017). Properties of STAT1 and IRF1 enhancers and the influence of SNPs. *BMC Molecular Biology*, *18*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12867-017-0084-1>
- Aguirre-Cruz, L., Rodríguez-Pérez, C. E., de la Cruz-Aguilera, D. L., Acosta-Castillo, G. I., Ruano-Calderón, L., Martínez-Moreno, M., & Sotelo, J. (2020). Descriptive epidemiology and frequency variations of astrocytic tumors in the National Institute of Neurology and Neurosurgery of Mexico. *Salud Publica de Mexico*, *62*(3), 255–261. <https://doi.org/10.21149/10680>
- Ahmed, S. P., Castresana, J. S., & Shahi, M. H. (2021). Glioblastoma and miRNAs. *Cancers*, *13*(7). <https://doi.org/10.3390/cancers13071581>
- Alexander, B. M., & Cloughesy, T. F. (2017). Adult glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, *35*(21), 2402–2409. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.73.0119>
- Alhawamdeh, M., Isreb, M., Aziz, A., Jacob, B. K., Anderson, D., & Najafzadeh, M. (2021). Interferon- γ liposome: A new system to improve drug delivery in the treatment of lung cancer. *ERJ Open Research*, *7*(3). <https://doi.org/10.1183/23120541.00555-2020>
- Alshaker, H. A., & Matalka, K. Z. (2011). IFN- γ , IL-17 and TGF- β involvement in shaping the tumor microenvironment: The significance of modulating such cytokines in treating malignant solid tumors. *Cancer Cell International*, *11*(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-11-33>
- Alspach, E., Lussier, D. M., & 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.
- Antunes, A. R. P., Scheyltjens, I., Duerinck, J., Neyns, B., Movahedi, K., & Van Ginderachter, J. A. (2020). Understanding the glioblastoma immune microenvironment as basis for the development of new immunotherapeutic strategies. *ELife*, *9*, 1–16. <https://doi.org/10.7554/eLife.52176>
- Bach, E. A., Aguet, M., & Schreiber, R. D. (1997). The IFN γ receptor: A paradigm for cytokine receptor signaling. *Annual Review of Immunology*, *15*, 563–591. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.563>
- Balandeh, E., Mohammadshafie, K., Mahmoudi, Y., Hossein Pourhanifeh, M., Rajabi, A., Bahabadi, Z. R., Mohammadi, A. H., Rahimian, N., Hamblin, M. R., & Mirzaei, H. (2021). Roles of Non-coding RNAs and Angiogenesis in Glioblastoma. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*(September), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.716462>

- Batlle, E., & Massagué, J. (2019). Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity*, *50*(4), 924–940. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.024>
- Benci, J. L., Xu, B., Qiu, Y., Wu, T. J., Dada, H., Twyman-Saint Victor, C., Cucolo, L., Lee, D. S. M., Pauken, K. E., Huang, A. C., Gangadhar, T. C., Amaravadi, R. K., Schuchter, L. M., Feldman, M. D., Ishwaran, H., Vonderheide, R. H., Maity, A., Wherry, E. J., & Minn, A. J. (2016). Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade. *Cell*, *167*(6), 1540-1554.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.022>
- Berger, T. R., Wen, P. Y., Lang-Orsini, M., & Chukwueke, U. N. (2022). World Health Organization 2021 Classification of Central Nervous System Tumors and Implications for Therapy for Adult-Type Gliomas: A Review. In *JAMA Oncology*. American Medical Association. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2022.2844>
- Bernabei, P., Coccia, E. M., Rigamonti, L., Bosticardo, M., Forni, G., Pestka, S., Krause, C. D., Battistini, A., & Novelli, F. (2001). Interferon-gamma receptor 2 expression as the deciding factor in human T, B, and myeloid cell proliferation or death. *Journal of Leukocyte Biology*, *70*(6), 950–960. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739558>
- Burke, J. D., & Young, H. A. (2019). IFN- γ : A cytokine at the right time, is in the right place. *Seminars in Immunology*, *43*(12), 101280. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.05.002>
- Chandrashekar, D. S., Bashel, B., Balasubramanya, S. A. H., Creighton, C. J., Ponce-Rodriguez, I., Chakravarthi, B. V. S. K., & Varambally, S. (2017). UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia (United States)*, *19*(8), 649–658. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.05.002>
- Chen, H. C., Chou, A. S. Bin, Liu, Y. C., Hsieh, C. H., Kang, C. C., Pang, S. T., Yeh, C. T., Liu, H. P., & Liao, S. K. (2011). Induction of metastatic cancer stem cells from the NK/LAK-resistant floating, but not adherent, subset of the UP-LN1 carcinoma cell line by IFN- γ . *Laboratory Investigation*, *91*(10), 1502–1513. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.91>
- Chen, R. Q., Liu, F., Qiu, X. Y., & Chen, X. Q. (2019). The prognostic and therapeutic value of PD-L1 in glioma. *Frontiers in Pharmacology*, *9*(JAN). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01503>
- Chen, Z., & Hambardzumyan, D. (2018). Immune microenvironment in glioblastoma subtypes. *Frontiers in Immunology*, *9*(MAY), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01004>
- Cheng, S. M., Xing, B., Li, J. C. B., Cheung, B. K. W., & Lau, A. S. Y. (2007). Interferon- γ regulation of TNF α -induced matrix metalloproteinase 3 expression

- and migration of human glioma T98G cells. *International Journal of Cancer*, 121(6), 1190–1196. <https://doi.org/10.1002/ijc.22729>
- Chin, Y. E., Kitagawa, M., Su, W.-C. S., You, Z.-H., Iwamoto, Y., & Fu, X.-Y. (1996). Cell Growth Arrest and Induction of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21 WAF1/CIP1 Mediated by STAT1. *Science*, 272(5262), 719–722. <https://doi.org/10.1126/science.272.5262.719>
- Christie, S. M., Ham, T. R., Gilmore, G. T., Toth, P. D., Leipzig, N. D., Leipzig, N. D., & Smith, A. W. (2020). Covalently Immobilizing Interferon- γ Drives Filopodia Production through Specific Receptor-Ligand Interactions Independently of Canonical Downstream Signaling. *Bioconjugate Chemistry*, 31(5), 1362–1369. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00105>
- Dapash, M., Hou, D., Castro, B., Lee-Chang, C., & Lesniak, M. S. (2021). The interplay between glioblastoma and its microenvironment. In *Cells* (Vol. 10, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells10092257>
- Du, W., Frankel, T. L., Green, M., & Zou, W. (2022). IFN γ signaling integrity in colorectal cancer immunity and immunotherapy. *Cellular and Molecular Immunology*, 19(1), 23–32. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00735-3>
- Duivenvoorden, W. C. M. (1999). Transforming growth factor beta1 acts as an inducer of matrix metalloproteinase expression and activity in human bone-metastasizing cancer cells. *Clinical & Experimental Metastasis*, 17(1), 33–42. <https://doi.org/10.1023/A:1026404227624>
- Dunn, G. P., Koebel, C. M., & Schreiber, R. D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology*, 6(11), 836–848. <https://doi.org/10.1038/nri1961>
- Ellis, T. N., & Beaman, B. L. (2004). Interferon-gamma activation of polymorphonuclear neutrophil function. *Immunology*, 112(1), 2–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01849.x>
- Estève, P. O., Chicoine, É., Robledo, O., Aoudjit, F., Descoteaux, A., Potworowski, E. F., & St-Pierre, Y. (2002). Protein Kinase C- ζ Regulates Transcription of the Matrix Metalloproteinase-9 Gene Induced by IL-1 and TNF- α in Glioma Cells via NF- κ B. *Journal of Biological Chemistry*, 277(38), 35150–35155. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108600200>
- Florian, A. I., Timis, T., Buruian, A., Florian, I., Hrap, I., Miha, C. M., Micl, M., & Sergiu, S. (2020). The Roles of miRNA in Glioblastoma Tumor Cell Communication : Diplomatic and Aggressive Negotiations. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1–35.
- Gao, Y., Feng, B., Han, S., Zhang, K., Chen, J., Li, C., Wang, R., & Chen, L. (2016). The roles of MicroRNA-141 in human cancers: From diagnosis to treatment. In

Cellular Physiology and Biochemistry (Vol. 38, Issue 2, pp. 427–448). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000438641>

- Gerber, S. A., Sedlacek, A. L., Cron, K. R., Murphy, S. P., Frelinger, J. G., & Lord, E. M. (2013). IFN- γ mediates the antitumor effects of radiation therapy in a murine colon tumor. *American Journal of Pathology*, 182(6), 2345–2354. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.02.041>
- Guo, Q., Zhu, X., Wei, R., Zhao, L., Zhang, Z., Yin, X., Zhang, Y., Chu, C., Wang, B., & Li, X. (2021). miR-130b-3p regulates M1 macrophage polarization via targeting IRF1. *Journal of Cellular Physiology*, 236(3), 2008–2022. <https://doi.org/10.1002/jcp.29987>
- Hagemann, T. (2004). Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF- dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis*, 25(8), 1543–1549. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh146>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. In *Cell* (Vol. 100).
- Henrik Heiland, D., Ravi, V. M., Behringer, S. P., Frenking, J. H., Wurm, J., Joseph, K., Garrelfs, N. W. C., Strähle, J., Heynckes, S., Grauvogel, J., Franco, P., Mader, I., Schneider, M., Potthoff, A.-L., Delev, D., Hofmann, U. G., Fung, C., Beck, J., Sankowski, R., ... Schnell, O. (2019). Tumor-associated reactive astrocytes aid the evolution of immunosuppressive environment in glioblastoma. *Nature Communications*, 10(1), 2541. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10493-6>
- Iacob, G., & Dinca, E. B. (2009). Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *Journal of Medicine and Life*, 2(4), 386–393.
- Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). The roles of IFN γ in protection against tumor development and cancer immunoeediting. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 13(2), 95–109. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(01\)00038-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(01)00038-7)
- Imai, Y., Chiba, T., Kondo, T., Kanzaki, H., Kanayama, K., Ao, J., Kojima, R., Kusakabe, Y., Nakamura, M., Saito, T., Nakagawa, R., Suzuki, E., Nakamoto, S., Muroyama, R., Tawada, A., Matsumura, T., Nakagawa, T., Kato, J., Kotani, A., ... Kato, N. (2020). Interferon- γ induced PD-L1 expression and soluble PD-L1 production in gastric cancer. *Oncology Letters*, 20(3), 2161–2168. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11757>
- Jiang, X., Wang, J., Deng, X., Xiong, F., Ge, J., Xiang, B., Wu, X., Ma, J., Zhou, M., Li, X., Li, Y., Li, G., Xiong, W., Guo, C., & Zeng, Z. (2019). Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape. *Molecular Cancer*, 18(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0928-4>

- Jorgovanovic, D., Song, M., Wang, L., & Zhang, Y. (2020). Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomarker Research*, 8(1), 49.
- Jovčevska, I. (2019). Genetic secrets of long-term glioblastoma survivors. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 19(2), 116–124.
<https://doi.org/10.17305/bjbms.2018.3717>
- Jung, M.-Y., Aibaidula, A., Brown, D. A., Himes, B. T., Cumba Garcia, L. M., & Parney, I. F. (2022). Superinduction of immunosuppressive glioblastoma extracellular vesicles by IFN- γ through PD-L1 and IDO1. *Neuro-Oncology Advances*, c, 1–10. <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdac017>
- Kearney, C. J., Vervoort, S. J., Hogg, S. J., Ramsbottom, K. M., Freeman, A. J., Lalaoui, N., Pijpers, L., Michie, J., Brown, K. K., Knight, D. A., Sutton, V., Beavis, P. A., Voskoboinik, I., Darcy, P. K., Silke, J., Trapani, J. A., Johnstone, R. W., & Oliaro, J. (2018). Tumor immune evasion arises through loss of TNF sensitivity. *Science Immunology*, 3(23). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aar3451>
- Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121(1), 1–14.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x>
- Korentzelos, D., Wells, A., & Clark, A. M. (2022). Interferon- γ increases sensitivity to chemotherapy and provides immunotherapy targets in models of metastatic castration-resistant prostate cancer. *Scientific Reports*, 12(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-10724-9>
- Krause, C. D., Lavnikova, N., Xie, J., Mei, E., Mirochnitchenko, O. V., Jia, Y., Hochstrasser, R. M., & Pestka, S. (2006). Preassembly and ligand-induced restructuring of the chains of the IFN- γ receptor complex: The roles of Jak kinases, Stat1 and the receptor chains. *Cell Research*, 16(1), 55–69.
<https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310008>
- Kryczek, I., Wei, S., Szeliga, W., Vatan, L., & Zou, W. (2009). Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood*, 114(2), 357–359.
<https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-177360>
- Kulbe, H., Thompson, R., Wilson, J. L., Robinson, S., Hagemann, T., Fatah, R., Gould, D., Ayhan, A., & Balkwill, F. (2007). The Inflammatory Cytokine Tumor Necrosis Factor- α Generates an Autocrine Tumor-Promoting Network in Epithelial Ovarian Cancer Cells. *Cancer Research*, 67(2), 585–592.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2941>
- Kursunel, M. A., & Esendagli, G. (2016). The untold story of IFN- γ in cancer biology. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 31, 73–81.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.07.005>

- Kwon, J. J., Factora, T. D., Dey, S., & Kota, J. (2019). A Systematic Review of miR-29 in Cancer. In *Molecular Therapy - Oncolytics* (Vol. 12, pp. 173–194). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2018.12.011>
- Lei, Q., Wang, D., Sun, K., Wang, L., & Zhang, Y. (2020). Resistance Mechanisms of Anti-PD1/PDL1 Therapy in Solid Tumors. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(July). <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00672>
- Li, L., Yu, R., Cai, T., Chen, Z., Lan, M., Zou, T., Wang, B., Wang, Q., Zhao, Y., & Cai, Y. (2020). Effects of immune cells and cytokines on inflammation and immunosuppression in the tumor microenvironment. In *International Immunopharmacology* (Vol. 88). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106939>
- Lim, S.-K., Llaguno, S. R. A., McKay, R. M., & Parada, L. F. (2011). Glioblastoma multiforme: a perspective on recent findings in human cancer and mouse models. *BMB Reports*, 44(3), 158–164. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2011.44.3.158>
- Lin, S., & Gregory, R. I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 15(6), 321–333. <https://doi.org/10.1038/nrc3932>
- Lin, Y. H., Wu, M. H., Liao, C. J., Huang, Y. H., Chi, H. C., Wu, S. M., Chen, C. Y., Tseng, Y. H., Tsai, C. Y., Chung, I. H., Tsai, M. M., Chen, C. Y., Lin, T. P., Yeh, Y. H., Chen, W. J., & Lin, K. H. (2015). Repression of microRNA-130b by thyroid hormone enhances cell motility. *Journal of Hepatology*, 62(6), 1328–1340. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.12.035>
- Litak, J., Mazurek, M., Grochowski, C., Kamieniak, P., & 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>
- Liu, Z. D., Wang, Q., Pan, D. Q., Meng, F. Q., Li, J. T., & Wang, Y. H. (2020). MicroRNA-130b inhibits cerebral ischemia/reperfusion induced cell apoptosis via regulation of IRF1. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 24, 12334–12341. https://doi.org/10.26355/eurev_202012_24027
- Lo, U.-G., Pong, R.-C., Yang, D., Gandee, L., Hernandez, E., Dang, A., Lin, C.-J., Santoyo, J., Ma, S.-H., Sonavane, R., Huang, J., Tseng, S.-F., Moro, L., Arbin, A. A., Kapur, P., Raj, G., He, D., Lai, C., Lin, H., & Hsieh, J.-T. (2018). IFN- γ induces epithelial-to-mesenchymal transition of cancer cells via an unique microRNA processing. *BioRxiv*, 355263. <https://doi.org/10.1101/355263>
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., Scheithauer, B. W., & Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, 114(2), 97–109. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>

- 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., & 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>
- Lu, H., Han, M., Yuan, X., Tursun, K., Zhang, Y., Li, Y., Li, Z., Feng, S., Zhou, L., Pan, Z., Wang, Q., Han, K., Liu, S., & Cheng, J. (2018). Role of IL-6-mediated expression of NS5ATP9 in autophagy of liver cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, *233*(12), 9312–9319. <https://doi.org/10.1002/jcp.26343>
- Ma, J., Sanchez-Duffhues, G., Goumans, M.-J., & ten Dijke, P. (2020). TGF- β -Induced Endothelial to Mesenchymal Transition in Disease and Tissue Engineering. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00260>
- Maimela, N. R., Liu, S., & Zhang, Y. (2019). Fates of CD8+ T cells in Tumor Microenvironment. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *17*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.11.004>
- Marsters, S. A., Pennica, D., Bach, E., Schreiber, R. D., & Ashkenazi, A. (1995). Interferon γ signals via a high-affinity multisubunit receptor complex that contains two types of polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(12), 5401–5405. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5401>
- Martin-Orozco, N., Muranski, P., Chung, Y., Yang, X. O., Yamazaki, T., Lu, S., Hwu, P., Restifo, N. P., Overwijk, W. W., & Dong, C. (2009). T Helper 17 Cells Promote Cytotoxic T Cell Activation in Tumor Immunity. *Immunity*, *31*(5), 787–798. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.014>
- Mauldin, I. S., Wages, N. A., Stowman, A. M., Wang, E., Smolkin, M. E., Olson, W. C., Deacon, D. H., Smith, K. T., Galeassi, N. V., Chianese-Bullock, K. A., Dengel, L. T., Marincola, F. M., Petroni, G. R., Mullins, D. W., & Slingluff, C. L. (2016). Intratumoral interferon-gamma increases chemokine production but fails to increase T cell infiltration of human melanoma metastases. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *65*(10), 1189–1199. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1881-y>
- Mazurek, M., Litak, J., Kamieniak, P., Osuchowska, I., Maciejewski, R., Roliński, J., Grajkowska, W., & Grochowski, C. (2020). Micro RNA molecules as modulators of treatment resistance, immune checkpoints controllers and sensitive biomarkers in glioblastoma multiforme. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(4). <https://doi.org/10.3390/ijms21041507>
- Mimura, K., Teh, J. L., Okayama, H., Shiraishi, K., Kua, L. F., Koh, V., Smoot, D. T., Ashktorab, H., Oike, T., Suzuki, Y., Fazreen, Z., Asuncion, B. R., Shabbir, A., Yong, W. P., So, J., Soong, R., & Kono, K. (2018). PD-L1 expression is mainly

- regulated by interferon gamma associated with JAK-STAT pathway in gastric cancer. *Cancer Science*, 109(1), 43–53. <https://doi.org/10.1111/cas.13424>
- Møller, H. G., Rasmussen, A. P., Andersen, H. H., Johnsen, K. B., Henriksen, M., & Duroux, M. (2013). A systematic review of MicroRNA in glioblastoma multiforme: Micro-modulators in the mesenchymal mode of migration and invasion. In *Molecular Neurobiology* (Vol. 47, Issue 1, pp. 131–144). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8349-7>
- Mondal, A., Smith, C., DuHadaway, J. B., Sutanto-Ward, E., Prendergast, G. C., Bravo-Nuevo, A., & Muller, A. J. (2016). IDO1 is an Integral Mediator of Inflammatory Neovascularization. *EBioMedicine*, 14, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.11.013>
- Nabors, L. B., Suswam, E., Huang, Y., Yang, X., Johnson, M. J., & King, P. H. (2003). Tumor necrosis factor alpha induces angiogenic factor up-regulation in malignant glioma cells: a role for RNA stabilization and HuR. *Cancer Research*, 63(14), 4181–4187.
- Okada, S., Ishikawa, N., Shirao, K., Kawaguchi, H., Tsumura, M., Ohno, Y., Yasunaga, S., Ohtsubo, M., Takihara, Y., & Kobayashi, M. (2007). The novel IFNGR1 mutation 774del4 produces a truncated form of interferon- γ receptor 1 and has a dominant-negative effect on interferon- γ signal transduction. *Journal of Medical Genetics*, 44(8), 485–491. <https://doi.org/10.1136/jmg.2007.049635>
- Ostrom, Q. T., Price, M., Neff, C., Cioffi, G., Waite, K. A., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2022). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2015–2019. *Neuro-Oncology*, 24(Supplement_5), v1–v95. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noac202>
- O’Sullivan, T., Saddawi-Konefka, R., Gross, E., Tran, M., Mayfield, S. P., Ikeda, H., & Bui, J. D. (2014). Interleukin-17D Mediates Tumor Rejection through Recruitment of Natural Killer Cells. *Cell Reports*, 7(4), 989–998. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.073>
- Parker, B. S., Rautela, J., & Hertzog, P. J. (2016). Antitumour actions of interferons: Implications for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 16(3), 131–144. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.14>
- Patel, S. J., Sanjana, N. E., Kishton, R. J., Eidizadeh, A., Vodnala, S. K., Cam, M., Gartner, J. J., Jia, L., Steinberg, S. M., Yamamoto, T. N., Merchant, A. S., Mehta, G. U., Chichura, A., Shalem, O., Tran, E., Eil, R., Sukumar, M., Guijarro, E. P., Day, C. P., ... Restifo, N. P. (2017). Identification of essential genes for cancer immunotherapy. *Nature*, 548(7669), 537–542. <https://doi.org/10.1038/nature23477>

- Peng, Y., & Croce, C. M. (2016). The role of microRNAs in human cancer. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 1). Springer Nature.
<https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>
- Pitt, J. M., Marabelle, A., Eggermont, A., Soria, J. C., Kroemer, G., & Zitvogel, L. (2016). Targeting the tumor microenvironment: Removing obstruction to anticancer immune responses and immunotherapy. *Annals of Oncology*, 27(8), 1482–1492. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw168>
- Propper, D. J., Chao, D., Braybrooke, J. P., Bahl, P., Thavasu, P., Balkwill, F., Turley, H., Dobbs, N., Gatter, K., Talbot, D. C., Harris, A. L., & Ganesan, T. S. (2003). Low-dose IFN-gamma induces tumor MHC expression in metastatic malignant melanoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 9(1), 84–92.
- Quinones, A., & Le, A. (2018). The multifaceted metabolism of glioblastoma. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1063, 59–72.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-77736-8_4
- Rafat, M., Moraghebi, M., Afsa, M., & Malekzadeh, K. (2021). The outstanding role of miR-132-3p in carcinogenesis of solid tumors. In *Human Cell* (Vol. 34, Issue 4, pp. 1051–1065). Springer Japan. <https://doi.org/10.1007/s13577-021-00544-w>
- Rettino, A., & Nicole, M. C. (2013). Genome-wide Identification of IRF1 Binding Sites Reveals Extensive Occupancy at Cell Death Associated Genes. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*, 44(0). <https://doi.org/10.4172/2157-2518.S6-009>
- Rezaei, O., Honarmand, K., Nateghinia, S., Taheri, M., & Ghafouri-Fard, S. (2020). miRNA signature in glioblastoma: Potential biomarkers and therapeutic targets. *Experimental and Molecular Pathology*, 117, 104550.
<https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2020.104550>
- Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., & Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 234, Issue 5, pp. 5451–5465). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>
- Sasmitha, A. O., Wong, Y. P., & Ling, A. P. K. (2018). Biomarkers and therapeutic advances in glioblastoma multiforme. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, 14(1), 40–51. <https://doi.org/10.1111/ajco.12756>
- Satoh, J. I., & Tabunoki, H. (2013). A comprehensive profile of ChIP-Seq-based STAT1 target genes suggests the complexity of STAT1-mediated gene regulatory mechanisms. *Gene Regulation and Systems Biology*, 2013(7), 41–56.
<https://doi.org/10.4137/GRSB.S11433>

- Schiffer, D., Annovazzi, L., Casalone, C., Corona, C., & Mellai, M. (2019). Glioblastoma: Microenvironment and niche concept. In *Cancers* (Vol. 11, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers11010005>
- Schindler, C., Levy, D. E., & Decker, T. (2007). JAK-STAT signaling: From interferons to cytokines. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(28), 20059–20063. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700016200>
- Shao, L., Hou, W., Scharping, N. E., Vendetti, F. P., Srivastava, R., Roy, C. N., Menk, A. V, Wang, Y., Chauvin, J., Karukonda, P., Thorne, S. H., Hornung, V., Zarour, H. M., Bakkenist, C. J., Delgoffe, G. M., & Sarkar, S. N. (2019). IRF1 Inhibits Antitumor Immunity through the Upregulation of PD-L1 in the Tumor Cell. *Cancer Immunology Research*, *7*(8), 1258–1266. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0711>
- Shen, J., Xiao, Z., Zhao, Q., Li, M., Wu, X., Zhang, L., Hu, W., & Cho, C. H. (2018). Anti-cancer therapy with TNF α and IFN γ : A comprehensive review. *Cell Proliferation*, *51*(4), 1–11. <https://doi.org/10.1111/cpr.12441>
- Shi, Y. (2018). Regulatory mechanisms of PD-L1 expression in cancer cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *67*(10), 1481–1489. <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2226-9>
- Snell, Richard. (2014). *Neuroanatomia Clinica*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Song, M., Ping, Y., Zhang, K., Yang, L., Li, F., Zhang, C., Cheng, S., Yue, D., Maimela, N. R., Qu, J., Liu, S., Sun, T., Li, Z., Xia, J., Zhang, B., Wang, L., & Zhang, Y. (2019). Low-dose IFN γ induces tumor cell stemness in tumor microenvironment of non–small cell lung cancer. *Cancer Research*, *79*(14), 3737–3748. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0596>
- Soomro, S. H., Ting, L. R., Qing, Y. Y., & Ren, M. (2017). Molecular biology of glioblastoma: Classification and mutational locations. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, *67*(9), 1410–1414.
- Șovrea, A. S., Boșca, B., Melincovici, C. S., Constantin, A. M., Crintea, A., Mărginean, M., Dronca, E., Jianu, M. E., Suflețel, R., Gonciar, D., Bungărdean, M., & Crivii, C. B. (2022). Multiple Faces of the Glioblastoma Microenvironment. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23020595>
- Sun, C., Mezzadra, R., & 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.Regulation>
- Swann, J. B., Hayakawa, Y., Zerafa, N., Sheehan, K. C. F., Scott, B., Schreiber, R. D., Hertzog, P., & Smyth, M. J. (2007). Type I IFN Contributes to NK Cell

- Homeostasis, Activation, and Antitumor Function. *The Journal of Immunology*, 178(12), 7540–7549. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.7540>
- Takahashi, H., Numasaki, M., Lotze, M. T., & Sasaki, H. (2005). Interleukin-17 enhances bFGF-, HGF- and VEGF-induced growth of vascular endothelial cells. *Immunology Letters*, 98(2), 189–193. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2004.11.012>
- Tang, Z., Li, C., Kang, B., Gao, G., Li, C., & Zhang, Z. (2017). GEPIA: A web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W98–W102. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx247>
- Tecalco-Cruz, A. C., Macías-Silva, M., Ramírez-Jarquín, J. O., & Méndez-Ambrosio, B. (2021). Identification of genes modulated by interferon gamma in breast cancer cells. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 27. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.101053>
- Tecalco-Cruz, A. C., Sosa-Garrocho, M., Vázquez-Victorio, G., Ortiz-García, L., Domínguez-Hüttinger, E., & Macías-Silva, M. (2012). Transforming growth factor- β /SMAD target gene SKIL is negatively regulated by the transcriptional cofactor complex SNON-SMAD4. *Journal of Biological Chemistry*, 287(32), 26764–26776. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.386599>
- Tecalco-Cruz, A. C., Velasco-Loyden, G., Robles-Villarruel, L., Cortes-González, C. C., Zepeda-Cervantes, J., Pineda, B., & 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>
- Tolomeo, M., Cavalli, A., & Cascio, A. (2022). STAT1 and Its Crucial Role in the Control of Viral Infections. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23084095>
- Torrisi, F., Alberghina, C., D'Aprile, S., Pavone, A. M., Longhitano, L., Giallongo, S., Tibullo, D., Di Rosa, M., Zappalà, A., Cammarata, F. P., Russo, G., Ippolito, M., Cuttone, G., Li Volti, G., Vicario, N., & Parenti, R. (2022). The Hallmarks of Glioblastoma: Heterogeneity, Intercellular Crosstalk and Molecular Signature of Invasiveness and Progression. *Biomedicines*, 10(4), 806. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040806>
- van de Vosse, E., & van Dissel, J. T. (2017). IFN- γ R1 defects: Mutation update and description of the IFNGR1 variation database. *Human Mutation*, 38(10), 1286–1296. <https://doi.org/10.1002/humu.23302>
- Varner, J. A., & Schmid, M. C. (2010). Myeloid cells in the tumor microenvironment: Modulation of tumor angiogenesis and tumor inflammation. *Journal of Oncology*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/201026>

- Vázquez Cervantes, G. I., Pineda, B., Ramírez Ortega, D., Salazar, A., González Esquivel, D. F., Rembao, D., Zavala Vega, S., Gómez-Manzo, S., Pérez de la Cruz, G., & Pérez de la Cruz, V. (2021). Kynurenine monooxygenase expression and activity in human astrocytomas. *Cells*, *10*(8). <https://doi.org/10.3390/cells10082028>
- Vishnoi, A., & Rani, S. (2017). MiRNA biogenesis and regulation of diseases: An overview. *Methods in Molecular Biology*, *1509*, 1–10. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6524-3_1
- Wakita, D., Sumida, K., Iwakura, Y., Nishikawa, H., Ohkuri, T., Chamoto, K., Kitamura, H., & Nishimura, T. (2010). Tumor-infiltrating IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells support the progression of tumor by promoting angiogenesis. *European Journal of Immunology*, *40*(7), 1927–1937. <https://doi.org/10.1002/eji.200940157>
- Wang, R., Bao, W., Pal, M., Liu, Y., Yazdanbakhsh, K., & 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), 1–12. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-003539>
- Wang, S., Yao, F., Lu, X., Li, Q., Su, Z., Lee, J.-H., Wang, C., & Du, L. (2019). Temozolomide promotes immune escape of GBM cells via upregulating PD-L1. *American Journal of Cancer Research*, *9*(6), 1161–1171.
- Wang, X., & Lin, Y. (2009). Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *. *Acta Pharmacol Sin.*, *29*(11), 1275–1288.
- Wirsching, H. G., Galanis, E., & Weller, M. (2016). Glioblastoma. *Handbook of Clinical Neurology*, *134*, 381–397. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802997-8.00023-2>
- Xu, J. L., & Guo, Y. (2020). FCGR1A Serves as a Novel Biomarker and Correlates With Immune Infiltration in Four Cancer Types. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.581615>
- Yamashita, T., Uchida, T., Araki, A., & Sendo, F. (1997). Nitric oxide is an effector molecule in inhibition of tumor cell growth by rIFN- γ -activated rat neutrophils. *International Journal of Cancer*, *71*(2), 223–230. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19970410\)71:2<223::AID-IJC17>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19970410)71:2<223::AID-IJC17>3.0.CO;2-I)
- Yan, K., Lu, Y., Yan, Z., & Wang, Y. (2021). 9-Gene Signature Correlated With CD8+ T Cell Infiltration Activated by IFN- γ : A Biomarker of Immune Checkpoint Therapy Response in Melanoma. *Frontiers in Immunology*, *12*(June), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.622563>
- Yan, Q., Hu, Q., Li, G., Qiao, Q., Ziyang, S., Jie, S., liang, hu, Haoran, L., & Zongyao, H. (2022). NEAT1 regulates CaOx crystal-induced renal tubular oxidative injury

via miR-130/IRF1. *Antioxidants & Redox Signaling*.
<https://doi.org/10.1089/ars.2022.0008>

- Yang, Y., Sui, Y., Xie, B., Qu, H., & Fang, X. (2019). GliomaDB: A Web Server for Integrating Glioma Omics Data and Interactive Analysis. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 17(4), 465–471. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2018.03.008>
- Yekula, A., Yekula, A., Muralidharan, K., Kang, K., Carter, B. S., & Balaj, L. (2020). Extracellular Vesicles in Glioblastoma Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 10(January), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03137>
- Yousefnia, S. (2022). A comprehensive review on miR-153: Mechanistic and controversial roles of miR-153 in tumorigenicity of cancer cells. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.985897>
- Yuasa, K., & Hijikata, T. (2016). Distal regulatory element of the STAT1 gene potentially mediates positive feedback control of STAT1 expression. *Genes to Cells*, 21(1), 25–40. <https://doi.org/10.1111/gtc.12316>
- Yuile, P., Dent, O., Cook, R., Biggs, M., & Little, N. (2006). Survival of glioblastoma patients related to presenting symptoms, brain site and treatment variables. *Journal of Clinical Neuroscience*, 13(7), 747–751. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2005.10.011>
- Zamora-Salas, S. X., Robles-Villarruel, M. L., Macías-Silva, M., Álvarez-Sánchez, M. E., & Tecalco-Cruz, Á. C. (2023). *Interferón-gamma: vías de señalización y sus implicaciones en el cáncer Interferon-gamma: signaling pathways and their implications in cancer*. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2023.533>
- Zhang, J., Cao, Z., Yang, G., You, L., Zhang, T., & Zhao, Y. (2019). MicroRNA-27a (miR-27a) in Solid Tumors: A Review Based on Mechanisms and Clinical Observations. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00893>
- Zhang, X., Wang, S., Zhu, Y., Zhang, M., Zhao, Y., Yan, Z., Wang, Q., & Li, X. (2021). Double-edged effects of interferons on the regulation of cancer-immunity cycle. *Oncolimmunology*, 10(1). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.1929005>
- Zhao, H., Wei, J., & Sun, J. (2020). Roles of TGF- β signaling pathway in tumor microenvironment and cancer therapy. In *International Immunopharmacology* (Vol. 89). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107101>
- Zhou, W., Jiang, Z., Li, X., Xu, Y., & Shao, Z. (2015). Cytokines: shifting the balance between glioma cells and tumor microenvironment after irradiation. In *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* (Vol. 141, Issue 4, pp. 575–589). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1772-6>

Zhou, Y., Weyman, C. M., Liu, H., Almassan, A., & Zhou, A. (2008). IFN- γ induces apoptosis in HL-60 cells through decreased Bcl-2 and increased Bak expression. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 28(2), 65–72.
<https://doi.org/10.1089/jir.2007.0025>

ANEXOS

Constancia del curso “Aplicación de tecnologías de alto rendimiento a la biomedicina” concluido el 11 de noviembre de 2022.

	<p>Universidad Nacional Autónoma de México Coordinación de la Investigación Científica Unidad de Proyectos Especiales en Apoyo a la Investigación y Docencia Red de Apoyo a la Investigación</p>	
	<p>Otorga la presente constancia a Sayra Ximena Zamora Salas</p>	
	<p>como asistente al: Aplicación de tecnologías de alto rendimiento a la biomedicina</p>	
<p>realizado del 14 de octubre al 11 de noviembre de 2022 en modalidad <i>online</i> con duración de 20 horas impartido por integrantes de la Red de Apoyo a la Investigación.</p>		
<p>“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU” Ciudad de México, a 28 de noviembre de 2022</p>		
 Dr. José Manuel Saniger Blesa Secretario de Investigación y Desarrollo Coordinación de la Investigación Científica	 Dr. Alfredo Ulloa Aguirre Director Científico de la Red de Apoyo a la Investigación	 Dra. Nancy R. Mejía Domínguez Responsable del Curso

Artículo de revisión “Interferón-gamma: vías de señalización y sus implicaciones en el cáncer” publicado en la revista TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas.

ARTÍCULO DE REVISIÓN

© 2023 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).
TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 26: 1-17, 2023.
<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2023.533>

Interferón-gamma: vías de señalización y sus implicaciones en el cáncer

Sayra Ximena Zamora-Salas¹, María Lucero Robles-Villarruel¹,
Marina Macías-Silva², María E. Álvarez-Sánchez¹ y Ángeles C. Tecalco-Cruz^{1*}

¹Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Av. San Lorenzo #290, Col. Del Valle, Alcaldía Benito Juárez 03100, Ciudad de México, México. ²Instituto de Fisiología Celular, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior s/n, Alcaldía Coyoacán 04510, Ciudad de México, México.
E-mail: *angeles.tecalco@uacm.edu.mx

RESUMEN

Los interferones son una familia de proteínas involucradas en actividades antivirales, inmunomoduladoras y antiinflamatorias. En los últimos años, su estudio se ha incrementado en el contexto del cáncer, y uno de los hallazgos más importantes es que son parte del microambiente de los tumores. El interferón-gamma (IFN- γ) es uno de los miembros de la familia de los interferones y tiene funciones protumorales o antitumorales dependiendo del tipo de cáncer y del microambiente tumoral. En esta revisión se discuten los elementos de la vía de transducción de señales canónica del IFN- γ y sus implicaciones en el desarrollo de las neoplasias malignas. Los estudios sugieren que los elementos de la vía activada por el IFN- γ podrían ser útiles como biomarcadores y/o como blanco de terapias para el cáncer.

Palabras clave: interferón, IFN- γ , transducción de señales, cáncer.

Interferon-gamma: signaling pathways and their implications in cancer

ABSTRACT

Interferons constitute a family of proteins involved in antiviral, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities. In the last years, the study of interferons in the cancer context has increased, and one of the most important findings is that interferons are part of the tumor microenvironment. The interferon-gamma (IFN- γ) is one of the members of the interferons family and has protumoral and antitumoral functions depending on the type of cancer and tumoral microenvironment. In this review, we discussed the elements of the canonical transduction pathway of IFN- γ and their implications for the study of malign neoplasms. Studies suggest that the elements of the pathway activated by IFN- γ could be useful as biomarkers and/or therapy targets against cancer.

Key words: interferon, IFN- γ , signal transduction, cancer.

Artículo recibido el 30 de junio del 2022.
Artículo aceptado el 19 de febrero del 2023.