



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA**



**INSTITUTO DE FISIOLOGÍA
LABORATORIO DE NEUROENDOCRINOLOGÍA**

**PARTICIPACIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS SOBRE LA
CAPACIDAD MIGRATORIA DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA
MULTIFORME HUMANO, U-87 MG.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

PRESENTA

QUIM. Irma Núñez Méndez

DIRECTOR DE TESIS

D.C. Eduardo Monjaraz Guzmán

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS	3
ABREVIATURAS	4
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	8
1. Cáncer	8
2. Glioblastoma Multiforme (GBM)	11
2.1 Células gliales	11
2.2 Glioblastoma	13
2.2.1 Epidemiología	17
2.2.2 Factores de riesgo	17
2.2.3 Alteraciones Moleculares	20
2.3 Microambiente tumoral	21
2.4 Citocinas	22
2.5 Interleucina 6 (IL-6)	23
3. Vía de señalización JAK/STAT	26
4. Metaloproteinasas (MMPs)	27
5. Canales iónicos	28
JUSTIFICACIÓN	30
HIPÓTESIS	31
OBJETIVO GENERAL	31
OBJETIVOS PARTICULARES	31
METODOLOGÍA	32
Cultivo de la Línea Celular	32
Ensayo de expresión génica	32
Ensayo de Migración	36
Análisis Estadístico	37
RESULTADOS	38
IL-6 promueve el aumento en la capacidad migratoria de las células U-87 MG	38
Las células U-87 MG expresan el ARNm que codifica para el receptor a IL-6 y de su proteína accesoria gp130	39
IL-6 estimula de manera dosis-dependiente los niveles de expresión del ARNm que codifican para IL-6R y gp130	41
Expresión de ARNm que codifica para IL-6 en la línea celular U-87 MG	43

Las células U-87 MG expresan el ARNm que codifica para Metaloproteinasas (MMPs) -----	43
IL-6 estimula de manera dosis-dependiente los niveles de expresión del ARNm que codifican para MMP-2, MMP-9 y MMP-14-----	45
IL-6 exagera la expresión de la subunidad α del del canal de sodio Nav 1.5 dependiente de voltaje en las células U-87 MG-----	48
El efecto que IL-6 ejerce sobre la capacidad migratoria de las células U-87 MG es mediado por la vía de señalización JAK/STAT-----	50
El efecto que IL-6 ejerce sobre la expresión de IL-6R, gp130, metaloproteinasas y de la subunidad α del canal de sodio Nav 1.5 es mediado por la vía de señalización JAK/STAT en las células U-87 MG-----	52
DISCUSIÓN -----	57
CONCLUSIONES -----	64
BIBLIOGRAFÍA -----	65

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. División celular.	9
Figura 2. Estadística del cáncer en México.	11
Figura 3. Funciones homeostáticas de los astrocitos.....	13
Figura 4. Distribución de tumores malignos primarios y otros tumores del Sistema Nervioso Central.....	16
Figura 5. Representación esquemática de las vías de desarrollo de GBM.)	20
Figura 6. Vías de señalización de IL-6.....	24
Figura 7. Efecto de IL-6 sobre la capacidad migratoria de las células U-87 MG.	39
Figura 8. Expresión del ARNm que codifica para el receptor de IL-6 (IL-6R) y su proteína accesoria gp130.....	40
Figura 9. IL-6 estimula la expresión del ARNm que codifica para IL-6R y gp130.	42
Figura 10. Expresión del ARNm que codifica para IL-6 en las células U-87 MG.....	43
Figura 11. Expresión del ARNm que codifica paraMMP-2, MMP-9 y MMP-14.	44
Figura 12. IL-6 estimula de manera dosis-dependiente la expresión del ARNm que codifica para MMP-2.....	46
Figura 13. IL-6 estimula de manera dosis-dependiente la expresión del ARNm que codifica para MMP-9 y MMP-14.....	47
Figura 14. Expresión del ARNm que codifica para la subunidad α del canal de sodio Nav 1.5.....	48
Figura 15. IL-6 induce la expresión del ARNm que codifica para Nav 1.5 de manera dosis-dependiente en las células U-87 MG.	49
Figura 16. El efecto de IL-6 sobre la capacidad migratoria de las células U-87 MG es mediado por la vía de señalización JAK2/STAT3.	51
Figura 17. Efecto de los inhibidores de la vía JAK2/STAT3 sobre los niveles de expresión del ARNm que codifica para IL-6R.	53
Figura 18. Efecto de los inhibidores de la vía JAK2/STAT3 sobre los niveles de expresión del ARNm que codifica para gp130 y MMP-2.	54
Figura 19. Efecto de los inhibidores de la vía JAK2/STAT3 sobre los niveles de expresión del ARNm que codifica para MMP-14 y Nav 1.5.	55

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

BHE: Barrera Hematoencefálica

BrEt: Bromuro de Etidio

CBTRUS: Centro Central de Tumores del Sistema Nervioso Central

CD: Células dendríticas

CD8⁺: Linfocitos T citotóxicos

CPA: Células presentadoras de antígenos

EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

GBM: Glioblastoma Multiforme Humano

gp130: Glucoproteína 130

IARC: Agencia Internacional para la investigación del Cáncer

IDH: Isocitrato Deshidrogenasa

IL-6: Interleucina seis

IL-6R: receptor de interleucina seis

INNN: Instituto Nacional de Neurología de México

JAK/STAT: Transductor de la Cinasa-Señal de Jano y activador de la Transcripción

KH₂PO₄: Fosfato de Potasio monobásico

MAT: Microambiente tumoral

MDSC: Células Supresoras Derivadas de Mieloides

MMP-2: Metaloproteinasas 2

MMP-9: Metaloproteinasas 9

MMP-14: Metaloproteinasas 14

Nav 1.5: Canal de sodio dependiente de voltaje 1.5

NTK: Células asesinas naturales

OMS: Organización Mundial de la Salud

P16: Proteína supresora de tumores

pb: Pares de bases PBS: Solución Salina Amortiguada de Fosfatos (de sus siglas en inglés)

PDGF: Factor de Crecimiento Derivado de plaquetas

PDGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas

SNC: Sistema Nervioso Central

TAE: Mezcla de base Tris, ácido acético y EDTA

TP53: Proteína tumoral 53

VEGF: Factor de Crecimiento Vascular Endotelial

VGSC: Canales de Sodio Voltaje Dependientes

RESUMEN

Actualmente el cáncer es una de las principales preocupaciones a nivel mundial debido a su alta tasa mortalidad. El glioblastoma multiforme (GBM, OMS-grado IV) es el tumor cerebral primario más frecuente y maligno con una esperanza de vida media que se encuentra entorno a los 14 meses tras su diagnóstico. Este tumor se caracteriza por presentar proliferación celular descontrolada, infiltración difusa en el tejido adyacente, focos de necrosis, elevada angiogénesis y una fuerte resistencia a la apoptosis, además de una elevada inestabilidad cromosómica. Diversos estudios reportados en la literatura demostraron que la producción y secreción aberrante de IL-6 en una gran variedad de tumores malignos, incluido el cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón y GBM, se relaciona con una escasa supervivencia del paciente. Debido a que los GBM son resistentes a los protocolos terapéuticos actuales, incluyendo la radioterapia y que la cirugía no es capaz de eliminar por completo el tumor, debido a su naturaleza infiltrante, las terapias actuales solo llevan a una mejora temporal y limitada. Por esta razón, comprender los mecanismos de invasión y migración del GBM podría abrir el camino a nuevos tratamientos capaces de revertir el pronóstico severo y, posiblemente dar una mejor calidad de vida.

En base a estos datos, en este trabajo evaluamos el papel de IL-6 sobre la capacidad migratoria de las células U-87 MG. Los resultados que obtuvimos muestran que IL-6 exacerba la capacidad migratoria de las células U-87 MG, y que este efecto va acompañado por un incremento significativo en los niveles de expresión de ARNm que codifica para elementos moleculares asociados a la migración celular (MMP-2, MMP-9, MMP-14 y Nav 1.5).

La unión de IL-6 a su receptor, activa entre otras vías, la vía de señalización JAK/STAT, por lo cual decidimos explorar de manera preliminar la participación de esta vía en la capacidad migratoria de las células, así como en la expresión de las metaloproteinasas y del canal de sodio Nav 1.5. Para el desarrollo experimental utilizamos IL-6 y 2 inhibidores de la vía JAK/STAT, AG490 que es un inhibidor específico de JAK, y Stattic un inhibidor de STAT. Las células U-87 MG fueron mantenidas por 48 horas en presencia de IL-6, AG490 y Stattic, observándose que la presencia de AG490 no afecta la capacidad migratoria estimulada por IL-6 de estas células, pero sí lo hace Stattic.

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

El cuerpo está formado por muchos tipos celulares, estas células crecen y se dividen de forma controlada para producir más células, según sean necesarias para mantener el cuerpo sano. Cuando las células envejecen o se dañan, mueren y aparecen nuevas células (Shlyakhtina et al., 2021).

Algunas veces, este proceso ordenado se descontrola. El material genético (ADN) de una célula puede dañarse o alterarse, lo cual produce mutaciones que afectan el crecimiento y la división normal de las células. Las células normales se dividen y mueren durante un periodo de tiempo programado. Sin embargo, la célula cancerosa o tumoral “pierde” la capacidad para morir y se divide casi sin límite (Figura 1). Tal multiplicación en el número de células llega a formar unas masas, denominadas “**tumores**” o “**neoplasias**”, que en su expansión pueden destruir y sustituir a los tejidos normales (Puente & de Velasco, 2019)

La Figura 1, compara el proceso de división normal (A) con el proceso de división neoplásico (B). Las células normales, se dividen de forma controlada, si ocasionalmente, la célula normal desarrolla mutaciones u otras alteraciones que no pueden ser adecuadamente reparadas, activa su propio programa de muerte celular para así controlar su desarrollo y crecimiento. Este proceso es conocido como “apoptosis” (Puente & de Velasco, 2019). Por su parte, las células cancerosas, desarrollan mutaciones que no son reparadas y pierden la capacidad para morir, proliferando en exceso (Puente & de Velasco, 2019).

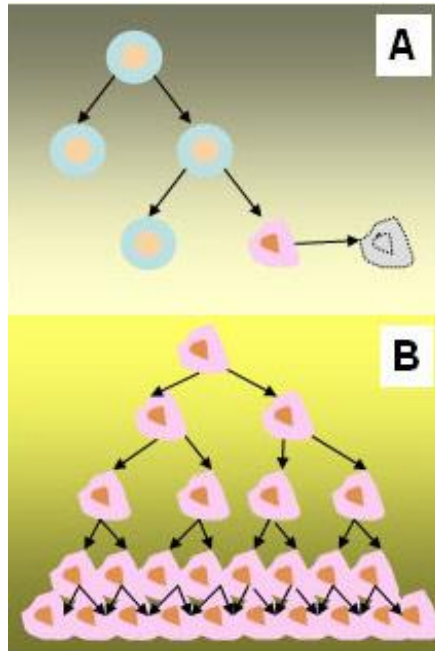


Figura 1. División celular. **A.** Las células normales se dividen de forma controlada. Cuando una célula normal desarrolla mutaciones u otras alteraciones que no pueden ser adecuadamente reparadas activa su propio programa de muerte celular para así controlar su desarrollo y crecimiento. Este proceso es conocido como “apoptosis”. **B.** Las células cancerosas desarrollan mutaciones que no son reparadas y pierden la capacidad para morir. (Puente & de Velasco, 2019).

El término cáncer, engloba un grupo numeroso de enfermedades que se caracterizan por el desarrollo de células anormales, que se dividen, crecen y se diseminan sin control en cualquier parte del cuerpo (Puente & de Velasco, 2019). La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2017, define al cáncer, como un amplio número de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo.

El cáncer, es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2019, el cáncer es la primera o segunda causa principal de muerte antes de los 70 años en 112 de 183 países y ocupa el tercer lugar en otros 23 países. La creciente prominencia del cáncer como una de las primeras causas de muerte refleja en parte una marcada disminución de las tasas de mortalidad por accidente cerebrovascular y enfermedad coronaria, en relación con el

cáncer, en muchos países. En todo el mundo, se estima que en 2020 se produjeron 19,3 millones de nuevos casos de cáncer (18,1 millones sin incluir el cáncer de piel no melanoma) y casi 10,0 millones de muertes por cáncer (9,9 millones sin incluir el cáncer de piel no melanoma), esto es una actualización sobre la carga mundial del cáncer utilizando las estimaciones de GLOBOCAN 2020 de incidencia y mortalidad producidas por cáncer por la Agencia Internacional para la investigación del Cáncer (IARC). Se espera que la carga mundial de cáncer sea de 28,4 millones de casos en 2040, un aumento del 47% con respecto a 2020, con un mayor aumento en países que estén en vías de desarrollo (Sung et al., 2020)

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) estima que, a nivel mundial, 1 de cada 5 personas desarrollan cáncer durante su vida, y 1 de cada 8 hombres y 1 de cada 11 mujeres mueren a causa de la enfermedad. Estas nuevas estimaciones sugieren que más de 50 millones de personas viven dentro de los cinco años posteriores a un diagnóstico de cáncer anterior. El envejecimiento de la población a nivel mundial y los factores de riesgo socioeconómico siguen siendo los principales factores que impulsan este aumento.

La magnitud de los efectos del cáncer en la salud en México no es muy diferente al panorama mundial, pues es la tercera causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes (Secretaría de Salud, 2017). Aunque en México como en resto del mundo el cáncer de mayor prevalencia es el cáncer de mama, en 2020 se registraron 308,102 nuevos casos de cáncer de cerebro a nivel mundial, y de este número de casos registrados hubo 251, 329 muertes (Sung et al., 2020), representando

aproximadamente el 82% de muertes por cáncer de cerebro con respecto a los casos reportados de cáncer de cerebro.

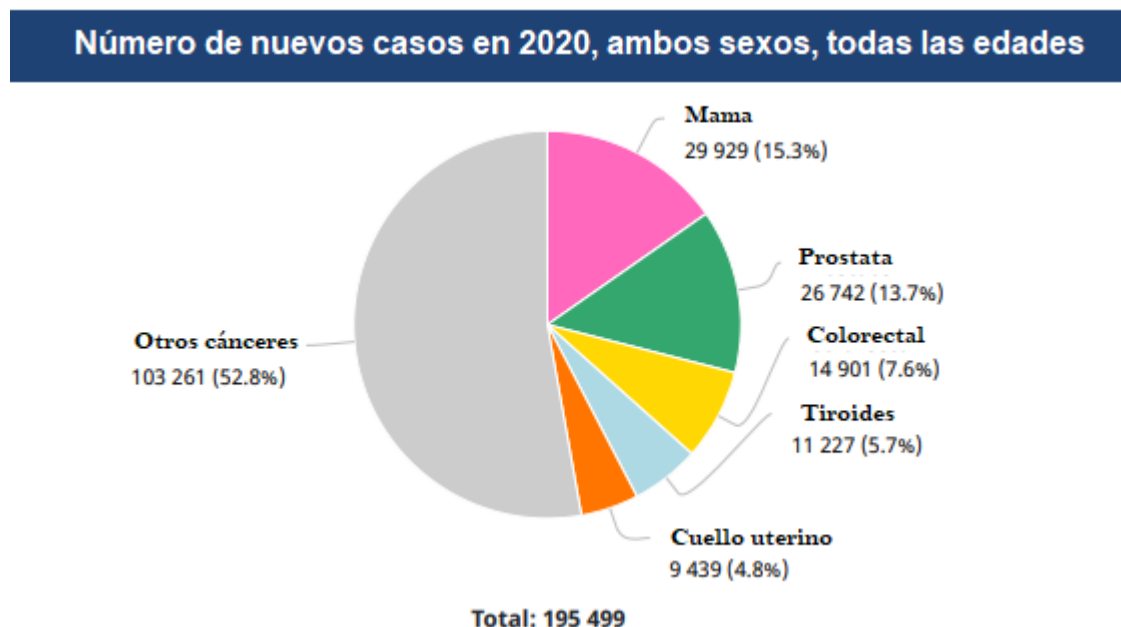


Figura 2. Estadística del cáncer en México. Los tipos de cáncer con mayor incidencia en la población mexicana en ambos sexos es: cáncer de mama (15.3%), cáncer de próstata (13.7%), cáncer colorrectal (7.6%), cáncer de tiroides (5.7%), cáncer cervical (64.8%) y otros tipos de cáncer (52.8%). Estimaciones por cada 100 000 habitantes. (Tomada y modificada de IARC, 2020).

Uno de los tipos de cáncer más agresivos que se presentan en la etapa infantil y adulta de las personas, es el glioblastoma multiforme (GBM), ya que una vez que es diagnosticado, que por lo regular ocurre tardíamente, el periodo de sobrevida no es mayor a los 16 meses. Actualmente se carecen de tratamientos eficientes para su atención y control.

2. Glioblastoma Multiforme (GBM)

2.1 Células gliales

Las células de la glía o neuroglia son el grupo de células del sistema nervioso más abundante en el cerebro. Sin embargo, durante mucho tiempo se consideraron solo como un

elemento de soporte neuronal, que no cumplía una función importante (Verkhratsky et al., 2019).

La función fundamental unificada de estas células es la homeostasis del sistema nervioso. Esta función, tanto para el contexto fisiológico, cuando las células gliales realizan sus tareas domésticas rutinarias, como para el contexto patológico, las células gliales pueden sufrir una remodelación reactiva para preservar, reparar y restaurar la homeostasis cerebral. La falla en esta función da como resultado el desarrollo de una enfermedad neurológica y daño al tejido nervioso. Por tanto, la neuroglia puede definirse como células homeostáticas y defensivas del sistema nervioso, representadas por poblaciones celulares muy heterogéneas de diferente origen, estructura y función (Verkhratsky et al., 2019).

Los astrocitos, un subtipo de células gliales, se presentan en una variedad de formas y funciones. El papel primordial de estas células es mantener la homeostasis del cerebro, ya sea la regulación de iones, neurotransmisores, metabolismo o redes sinápticas neuronales (Figura 3) (Verkhratsky & Nedergaard, 2018). La pérdida de homeostasis representa la causa subyacente de todos los trastornos cerebrales. Por lo tanto, es probable que los astrocitos estén involucrados en la mayoría, si no en todas, las patologías cerebrales (Verkhratsky et al., 2017)

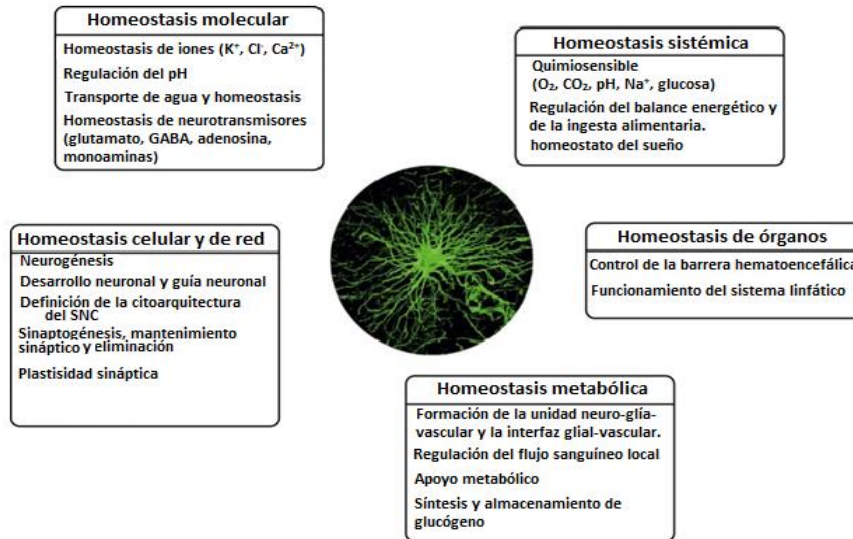


Figura 3. Funciones homeostáticas de los astrocitos. Los astrocitos mantienen la homeostasis molecular del SNC transportando iones y protones principales, eliminando y catabolizando neurotransmisores y liberando precursores de neurotransmisores y secuestrantes de especies reactivas de oxígeno. Los astrocitos regulan la homeostasis metabólica mediante la síntesis de glucógeno y el suministro de sustratos energéticos a las neuronas, también los astrocitos (junto con la microglía) representan el principal sistema defensivo del SNC. Estas numerosas funciones de los astrocitos son de vital importancia para todos los aspectos del funcionamiento del SNC, incluido su desarrollo, adaptación dependiente de la experiencia y envejecimiento (Tomado y modificada Verkhratsky & Nedergaard, 2018)

Los astrocitos humanos parecen ser los más grandes y complejos de todas las células de la glía estudiadas hasta ahora. Por lo tanto, resulta imperativo desarrollar modelos humanizados para estudiar el papel de los astrocitos en las patologías cerebrales, lo que quizás sea más evidente en el caso del Glioblastoma multiforme (Verkhratsky & Nedergaard, 2018).

2.2 Glioblastoma

El Glioblastoma Multiforme (GBM), es la neoplasia maligna primaria del sistema nervioso central más prevalente diagnosticada en adultos (Ostrom et al., 2014). A pesar del tratamiento quirúrgico (Brown et al., 2016)

y quimio radioterapéutico (Haque et al., 2017) la mediana de supervivencia global de los pacientes que reciben el estándar de atención sigue siendo baja, aproximadamente de 15 a 16 meses (Stupp et al., 2005; Stupp et al., 2017). La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica los tumores cerebrales de acuerdo con sus características morfológicas en función del posible origen celular del tejido neoplásico (Louis et al., 2007). Los gliomas, representan más de la mitad de los tumores cerebrales, y engloban un amplio espectro que va desde los tumores con bajo grado de proliferación e infiltración a los tejidos adyacentes, a tumores altamente agresivos. Se clasifican a su vez en diferentes tipos como son los ependimomas, oligodendrogliomas y astrocitomas (Louis et al., 2007; Louis et al., 2016). A su vez, los astrocitomas pueden clasificarse en 4 grados según sus características histológicas:

a) Grado I (astrocitomas pilocíticos)

Es un tumor bien delimitado, de crecimiento lento, que suele ser quístico y se presenta generalmente en niños y adultos jóvenes. Afecta comúnmente al nervio óptico, cerebro, cerebelo y tallo cerebral. La resección quirúrgica total es la principal estrategia terapéutica. En la mayoría de los casos cuando el tumor ha sido extraído total o parcialmente, las probabilidades de una sobrevida mayor a 20 años son de más del 85% (Louis et al., 2007; Louis et al., 2016; Komori, 2017; Hoshide & Jandial, 2016).

b) Grado II (astrocitomas difusos)

Se caracteriza por un crecimiento lento y poca infiltración en estructuras cerebrales adyacentes. Generalmente afecta a adultos jóvenes con un pico de incidencia entre los 30 y

40 años, además puede evolucionar a un grado mayor de malignidad. Se localiza en cualquier región del SNC, pero con más frecuencia en el cerebro, tallo cerebral y médula espinal. El tratamiento puede incluir resección quirúrgica, quimioterapia y/o radioterapia. La media de supervivencia después de la intervención quirúrgica es de 6 a 8 años. Pueden presentar mutaciones en los genes de isocitrato deshidrogenasa (IDH1/ IDH2) o en TP53 (Louis et al., 2007; Louis et al., 2016; Komori, 2017; Hoshide & Jandial, 2016).

c) Grado III (astrocitomas anaplásicos)

Este tipo de tumor puede surgir a partir de un astrocitoma difuso o manifestarse *de novo* y tienden a progresar a astrocitoma de grado IV. Se caracteriza por presentar una alta actividad mitótica, atipia nuclear y lesiones difusamente infiltrantes. El promedio de edad en los pacientes es de 40 años. Se localizan preferentemente en el cerebro. El tratamiento puede incluir resección quirúrgica parcial, quimioterapia y/o radioterapia. El tiempo de supervivencia en estos pacientes es de 2 a 3 años. Las aberraciones más comunes que se presentan en este tipo de tumores son las mutaciones en los genes IDH1/IDH2 (Louis et al., 2007; Louis et al., 2016; Komori, 2017; Hoshide & Jandial, 2016).

d) Grado IV (Glioblastoma multiforme, GBM)

El Glioblastoma se divide genotípicamente en IDH silvestre (el 90% de los casos), que se encuentra de forma frecuente en los Glioblastomas *de novo* y predomina en pacientes de más de 55 años, y con IDH mutado (el 10% de los casos) que corresponde a los Glioblastomas secundarios que provienen de los astrocitomas de grados más bajos (Louis et al., 2007; Louis et al., 2016; Komori, 2017; Hoshide & Jandial, 2016).

Los Astrocitomas son los más frecuentes del sistema nervioso central (SNC) y dentro de estos el GBM es el más común, que representa más del 50% de los tumores cerebrales en adultos (Figura 3) (Ostrom et al., 2019).

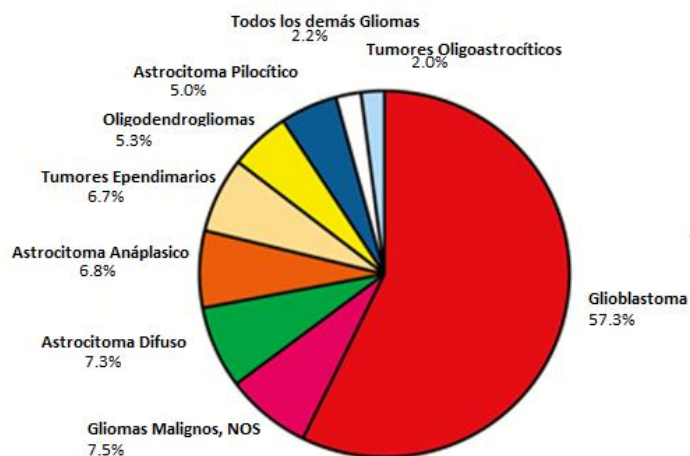


Figura 4. Distribución de tumores malignos primarios y otros tumores del Sistema Nervioso Central (Tomado y modificado de CBTRUS: Estadísticas de cáncer. de EE. UU. – NPCR y SEER, 2012-2016.)

El GBM, es un Astrocitoma muy heterogéneo donde se pueden encontrar células tumorales con diferentes grados de malignidad. Al igual que ocurre con otros tipos de tumores sólidos, su estructura también es muy heterogénea (razón por la que recibe el nombre de multiforme).

El GBM rara vez provocan metástasis fuera del tejido nervioso, únicamente tienden a infiltrarse en el tejido normal adyacente. Sin embargo, distintos tipos de tumores si metastatizan al cerebro dando lugar a las denominadas metástasis o tumores cerebrales metastásicos. La metástasis cerebral ocurre entre un 15 y un 20% de los pacientes con cáncer y es 10 veces más frecuente que los tumores cerebrales primarios. El cáncer de pulmón y el cáncer de mama son las principales fuentes de metástasis cerebral, seguidos por el melanoma y el cáncer colorrectal (Lowery & Yu, 2017; Achrol et al, 2019).

2.2.1 Epidemiología

El informe estadístico CBTRUS (Registro Central de Tumores Cerebrales de los Estados Unidos), contiene datos sobre la epidemiología de tumores del SNC en la población de EE. UU. Los siguientes datos abarcan un periodo 2012-2016 (Ostrom et al., 2019). La tasa de incidencia promedio de todos los tumores de SNC es de 23.41 por cada 100,000 habitantes. Esta tasa fue más alta en mujeres que en hombres (25.84 versus 20.82 por 100,000), blancos en comparación con negros (23.50 versus 23.34 por 100,000), y no hispanos (de cualquier raza) en comparación con los hispanos (23.84 versus 21.28 por 100,000) (Ostrom et al., 2019).

En México, la epidemiología de los tumores de SNC es incierta. Ya que la mayoría de los estudios que evalúan su frecuencia, incluyen un número limitado de casos o se enfocan en tipos específicos de tumores (Aguirre et al.). El Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México (INNN) reportó que en un periodo de 50 años del 100% de tumores del SNC, el 33% fueron los de tejido neuroepitelial, y 67% corresponden a tumores astrocíticos (Aguirre et al., 2016). Se desconoce la frecuencia exacta, la distribución por edad y género, así como las tendencias de los tumores del SNC en México. Esta falta de información dificulta la aportación de inferencias sobre la etiología, y los factores de riesgo asociados (Aguirre et al., 2016).

2.2.2 Factores de riesgo

Los factores de riesgo asociados al GBM al momento de ser diagnosticado no están definidos, pero hay algunos factores que pueden aumentar el riesgo de padecer GBM. Los factores de riesgo incluyen los siguientes:

a) Edad

El GBM puede ocurrir a cualquier edad, pero el riesgo de desarrollo aumenta con los años. Así, el 70 % de los casos se presenta en pacientes con edades comprendidas entre los 45 y 70 años (Gamma, 2020).

b) Género

Se desconoce la relación que guardan el género y la incidencia de GBM. No obstante, se ha observado que el GBM y los tumores relacionados con el SNC, son más frecuentes en hombres que en mujeres (Colen et al., 2015).

c) Exposición a radiación ionizante

Ciertas formas y dosis de radiación ionizante son causas generalmente aceptadas de tumores cerebrales, estudios de bombas atómicas, datos de caída de pruebas nucleares, radiación terapéutica para el cáncer y condiciones benignas, y estudios ocupacionales y ambientales conectan la radiación ionizante con la tumorigénesis (Gamma, 2020; Colen et al., 2015; Bondy et al., 2008).

d) Radiación no ionizante: teléfonos móviles

La tecnología de los teléfonos móviles se introdujo en la década de 1980, pero se hizo popular a mediados de la década de 1990 en todo el mundo y, en la actualidad, la gran mayoría de las personas utilizan teléfonos móviles. El cerebro es el órgano que absorbe la mayoría de los campos de radiofrecuencia cuando se sostiene el teléfono celular contra la cabeza. Debido a preocupaciones de salud pública de que el uso de teléfonos celulares podría ser un posible factor de riesgo emergente, la asociación entre el riesgo de desarrollar glioma y el uso de teléfonos celulares se ha investigado ampliamente. En 2011, el Programa

Monográfico de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) sobre la evaluación de los riesgos carcinogénicos para los seres humanos clasificó los campos de radiofrecuencia como un posible carcinógeno (IARC grupo 2B), basándose principalmente en los hallazgos epidemiológicos de un mayor riesgo de glioma en usuarios habituales de teléfonos móviles (Baan et al., 2011).

e) Alergias

Los estudios epidemiológicos de grupos grandes y diversos de casos y controles sugieren consistentemente que las condiciones alérgicas, como el asma, la fiebre del heno, el eccema y las alergias alimentarias, reducen el riesgo de glioma. Los resultados de un metaanálisis (Linos et al., 2007) revelan que las alergias reducen el riesgo de glioma en casi un 40%. Sin embargo, los hallazgos relacionados con las asociaciones entre la duración y el momento de la alergia y el riesgo de glioma son inconsistentes. Un análisis encontró que el riesgo de glioma disminuye con un número creciente de tipos de alergia (p. Ej., estacional, medicamentos, mascotas, alimentos), la edad en el momento del diagnóstico de alergia y el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de alergia (McCarthy et al., 2011). Otros estudios han encontrado que la disminución del riesgo de glioma proporcionada por estas afecciones se vio reforzada por el diagnóstico actual o reciente (Wigertz et al., 2007). La relación entre alergia y riesgo de glioma puede no ser consistente entre los tipos histológicos de glioma. Una evaluación conjunta de 7 estudios de casos y controles sugiere que los riesgos de oligodendroglioma y oligodendroglioma anaplásico se redujeron significativamente entre los participantes con antecedentes de asma solo o en combinación con antecedentes de alergias, pero no como resultado de un historial de alergias solamente (McCarthy et al., 2011).

2.2.3 Alteraciones Moleculares

Los GBM por su origen pueden ser clasificados de la siguiente manera: “*de novo*” (IDH wt) y secundario (IDH mutado), en base a sus diferencias genéticas y biológicas. Los GBM “*de novo*” aparecen normalmente en personas mayores de 50 años, expresan normalmente IDHwt, sobreexpresan un receptor del factor de crecimiento epidérmico mutado (EGFR), por su parte, los GBM secundarios o progresivos, aparecen inicialmente como astrocitomas difusos de bajo grado (OMS-Grado II) o astrocitomas anaplásicos (OMS-Grado III) en pacientes jóvenes y que paulatinamente se transforman en GBM de Grado IV, y se caracterizan por presentar mutaciones en el gen supresor de tumores p53, y aumenta la expresión del receptor para PDGF y VEGF. El tiempo de progresión entre el astrocitoma de grado II y el glioblastoma suele ser de 5,3 años, y la transición de un astrocitoma de grado III a glioblastoma es de solamente 1,4 años (Figura 4). Los GBM secundarios son menos frecuentes que los “*de novo*” (un 10% frente a un 90%, respectivamente) (Franco et al., 2007).

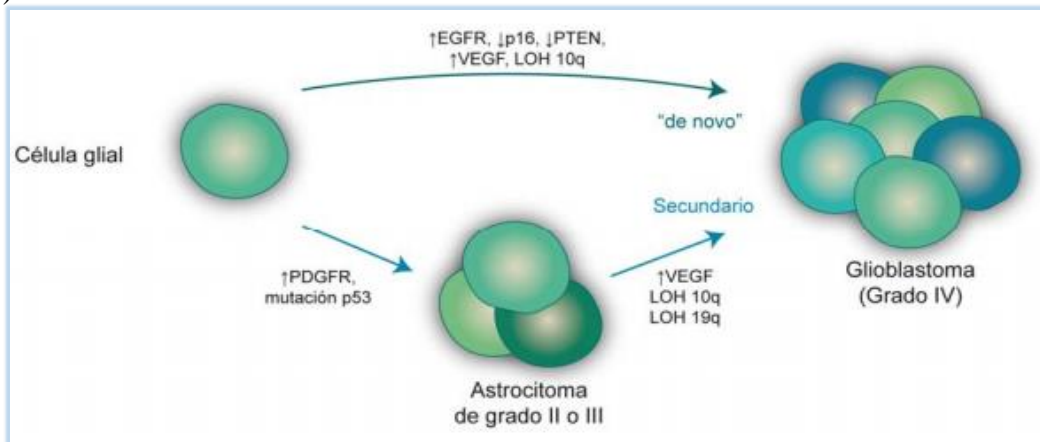


Figura 5. Representación esquemática de las vías de desarrollo de GBM. Las alteraciones moleculares más frecuentes y relevantes del GBM “*de novo*” son la amplificación de EGFR, la mutación de PTEN y la pérdida total del cromosoma 10. Las alteraciones genéticas más comunes en los GBM secundarios incluyen mutaciones en p53 y pérdida de 19q, lo que indica que estas alteraciones son eventos mutuamente excluyentes que definen 2 vías genéticas diferentes en la evolución del GBM. (Tomado y modificado Agnihotri et al, 2012)

Además de las mutaciones que ocurren en el GBM, el microambiente tumoral tiene un papel importante en la progresión del GBM, este microambiente proporciona los factores necesarios para que las células tumorales se vuelvan altamente invasivas y resistentes.

2.3 Microambiente tumoral

Las células tumorales, se encuentran en contacto con otras células no malignas, como fibroblastos, células de los vasos sanguíneos y del sistema inmune, constituyendo el microambiente tumoral (MAT). En teoría, las células del sistema inmune pueden eliminar estas células tumorales mediante un proceso conocido como vigilancia inmunológica (Vesely et al., 2011). Anteriormente, se pensaba que en el SNC no podía producirse una respuesta inmune debido a la barrera hematoencefálica (BHE), la falta de drenaje linfático y la actuación de la microglía. Sin embargo, estudios más recientes indican que los leucocitos pueden trasladarse al SNC sin necesidad de que la BHE se encuentre alterada (Carson et al., 2006; Shaftel et al., 2007). A su vez, las células del GBM secretan diferentes citocinas y factores de crecimiento capaces de reclutar a las diferentes células del sistema inmune. De esta manera, la alteración de la BHE, la generación de antígenos procedentes de las células necróticas, las citocinas y factores de crecimiento secretados al medio, explican en parte, el alto número de células dendríticas (CD), macrófagos M2, microglía, natural killers (NKT) y linfocitos T, que se encuentran en el microambiente tumoral.

La respuesta inmune antitumoral más efectiva es la respuesta citotóxica y su principal componente son los linfocitos T citotóxicos (CD8⁺). Estas células reconocen péptidos

antigénicos mediante sus receptores TCR (T-cell receptor), y amplifican la respuesta al interactuar con otras células inmunes, como las presentadoras de antígenos (CPA).

Los pacientes con GBM presentan de forma local y sistémica, un sistema inmune deficiente, especialmente relacionada con la inmunidad mediada por células. Esto se debe a que las células de GBM secretan diferentes biomoléculas como citocinas y quimiocinas (ej. IL-6, CSF-1, IL-10, IL-11, LIF), factores de crecimiento (ej. VEGF, TGF- β , enzimas inflamatorias) y metaloproteinasas (ej. MMP-2, MMP-7, MMP-9, etc.), que modifican las propiedades físicas y químicas del tejido, además de alterar la función de otras células en su beneficio. De esta forma, las NKT, las células derivadas de mieloides supresoras (MDSC), macrófagos M2 o linfocitos T reguladores (Treg) que se encuentran en el MAT, suprimen la función de las células T citotóxicas, y promueven la infiltración del glioma mediante la producción de diferentes citocinas y factores de crecimiento (Ma et al., 2018).

2.4 Citocinas

Las citocinas son un grupo de proteínas y glucoproteínas producidas por diversos tipos celulares que actúan fundamentalmente como reguladores de las respuestas inmunes e inflamatorias (Palomino & Marti, 2015). Las citocinas actúan como reguladores sistémicos a concentraciones del orden de nano o picomolar, modulando la actividad de un amplio espectro de tipos celulares.

Las citocinas, constituyen una compleja red de interacciones que conecta distintos tipos celulares y en la cual cada una de las citocinas actúa al inducir o suprimir su propia síntesis o la de otras citocinas o sus receptores. A la vez, las citocinas favorecen de manera

sinérgica la acción de otras citocinas o bien actúan como verdaderos antagonistas de sus efectos biológicos. Por otro lado, las citocinas se caracterizan por su capacidad para actuar de manera pleiotrópica sobre diversos tejidos y producir múltiples efectos biológicos, un ejemplo de ellas es la interleucina-6 (IL-6).

2.5 Interleucina 6 (IL-6)

La interleucina-6 (IL-6), es una citocina pleiotrópica de 26 kDa que consta de 184 aminoácidos, y se identificó originalmente como un regulador de la diferenciación celular (Rose, 2012).

En condiciones fisiológicas, los niveles plasmáticos de IL-6 van de 1 a 5 pg/ml, pero durante una condición inflamatoria, estos niveles pueden aumentar más de 1000 veces, y en condiciones extremas que provocan sepsis, los niveles de IL-6 alcanzan el rango de µg/ml.

Prácticamente, no exista ninguna otra proteína en el cuerpo humano, cuyo nivel pueda aumentar seis órdenes de magnitud bajo ciertas condiciones patológicas. Esto permite sugerir que la IL-6 es una de las principales alarmas en el cuerpo humano en respuesta a infecciones, inflamación y posiblemente cáncer (Rose, 2012).

Inicialmente, la IL-6 se une a su receptor específico de membrana (IL-6R), para posteriormente asociarse a una segunda proteína receptora (gp130). La dimerización de ambos receptores inicia la vía de señalización intracelular JAK/STAT (cinasa Janus/transductor de señal y activador de la transcripción). La IL-6 solo muestra afinidad por IL-6R, y solamente el complejo IL-6/IL-6R puede unirse a gp130. Prácticamente, todas las

células del cuerpo humano expresan gp130, pero solo pocos tipos celulares expresan IL-6R, incluyendo células normales y tumorales (Rose, 2020).

La señalización inducida por IL-6 involucra dos vías diferentes: a) la vía de señalización clásica y, b) la vía de trans-señalización (Figura 6). La vía de señalización clásica implica la unión de IL-6 a IL-6R en la superficie celular y la posterior interacción de este complejo con la subunidad gp130, la cual también es conocida como IL-6R β , para la activación de la vía JAK/STAT. Por su parte, la vía de trans-señalización, IL-6 se une a una forma soluble de IL-6R (sIL-6R), seguida de la interacción del complejo IL-6-sIL-6R con gp130 (Rose, 2012; Johnson et al., 2020).

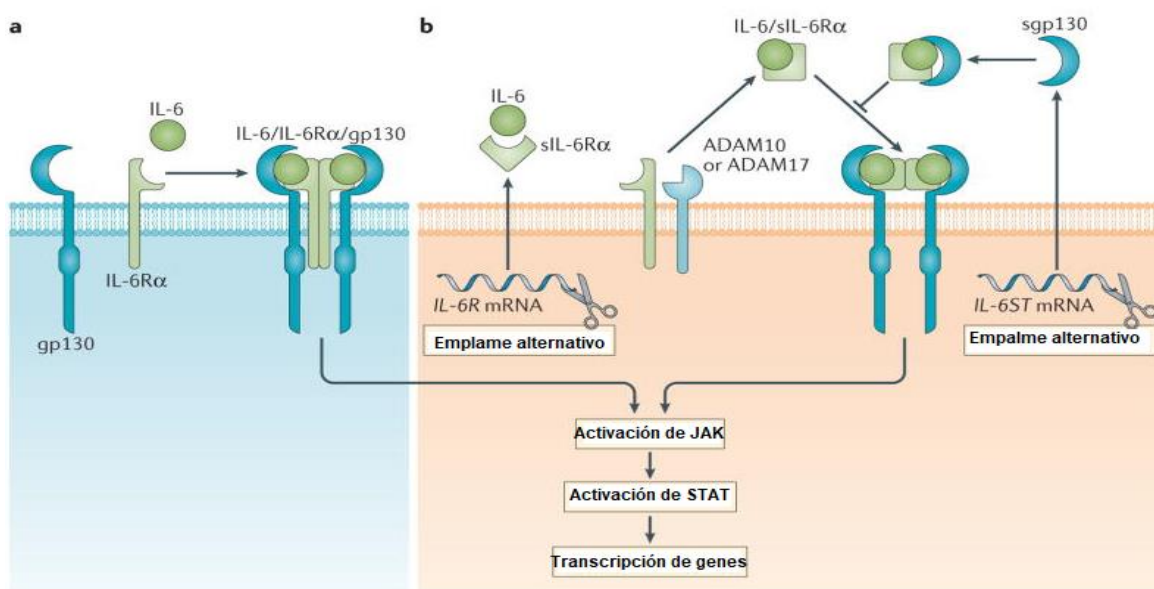


Figura 6. Vías de señalización de IL-6. a) En la vía de señalización clásica IL-6 se une a un receptor de membrana el cual conduce a la formación de complejo IL-6/IL-6R/gp130, la formación de este complejo da como resultado la activación de la vía de señalización JAK/STAT, también puede activar las Vías PI3K/AKT y RAS/RAF/MEK/ERK y posteriormente la transcripción de genes diana. b) En la vía de trans-señalización, IL-6 se une a IL-6R soluble (sIL-6R), para también poder formar el complejo IL-6/sIL-6R/gp130 y conduce a la activación de vías de señalización río abajo. (Tomado y modificado Johnson et al., 2020)

Diversos estudios han mostrado que la señalización de IL-6 juega un papel crucial en el desarrollo y progresión de diferentes tipos de cáncer, observándose aumentos significativos

en los niveles de expresión de ARNm que codifica para IL-6, así como de la proteína de IL-6 en cáncer colorrectal (Waldner et al., 2012), próstata (Culing & Pühr, 2012), mama (Dethlefsen et al., 2013), ovario (Macciò & Madeddu, 2013), cáncer de páncreas (Miura et al., 2015), pulmón (Chang et al., 2012) y cervical (Wei et al., 2013). Weissenberger y sus colegas, mostraron la importancia de la señalización de IL-6 en la tumorigenicidad del glioblastoma, utilizando ratones transgénicos (Weissenberger et al., 2004).

La señalización de IL-6 exagera la capacidad invasiva y migratoria de los gliomas, lo que resulta en una reducción de la eficacia del tratamiento y altas tasas de recurrencia. Se ha demostrado que la activación de STAT3 inducida por la señalización de IL-6 promueve la invasión y migración celular en células de glioblastoma U251 y T98G (Liu et al., 2010).

Diversos estudios han demostrado una correlación directa entre la expresión de IL-6 con el grado de malignidad del glioma, y una correlación indirecta con la supervivencia del paciente (Tabla 1) (West et al., 2018).

Author, date	Evaluation	Technique	Brain tumour (Grade I–III) (%)	Glioblastoma (Grade IV) (%)
Rolhion <i>et al.</i> , 2001	IL-6 mRNA expression	RT-PCR	7/16 (44)	38/43 (88)
Rolhion <i>et al.</i> , 2001	IL-6 protein expression	IHC	N/A	4/5 (80)
Tchirkov <i>et al.</i> , 2007	IL-6 gene amplification	FISH	0/17 (0)	15/36 (42)
Giometto <i>et al.</i> , 1996	IL-6 protein expression	IHC	3/10 (30)	4/4 (100)
Chang <i>et al.</i> , 2005	IL-6 protein expression	IHC	N/A	5/11 (56)
Sasaki <i>et al.</i> , 2001	IL-6 mRNA expression	RT-PCR	8/20 (40)	8/9 (89)
Sasaki <i>et al.</i> , 2001	IL-6 protein expression	IHC	N/A	4/7 (57)

Tabla 1. Porcentaje de IL-6 positivo detectado en muestras de tumores cerebrales primarios humanos por grado histopatológico. (Tomado de West et al., 2018).

3. Vía de señalización JAK/STAT

Durante las últimas tres décadas, la vía de señalización JAK/STAT ha surgido como un paradigma para comprender la participación de la transducción de señales en la salud y en la enfermedad del organismo. A nivel molecular, las citocinas e interleucinas dirigen la señalización JAK/STAT a la regulación transcripcional de genes diana, que están involucrados en la diferenciación, proliferación y migración celular. La señalización JAK/STAT está involucrada en varios tipos de trastornos de las células sanguíneas y cánceres en humanos, y su activación está asociada con carcinomas que son más invasivos o que probablemente se conviertan en metastásicos. A pesar de la inmensa información que se ha generado sobre la regulación de la vía JAK/STAT, no ha sido suficiente para el desarrollo de terapias con medicamentos (Thomas et al., 2015; Trivedi & Starz-Gaiano, 2018).

En los seres humanos, un conjunto de más de 40 interleucinas y citocinas sirven como señales de activación de la vía JAK/STAT, donde el marco básico para esta señalización es prácticamente el mismo en todas las especies, desde los humanos hasta las moscas (Bromberg & Darnell, 2000; Schindler & Plumlee, 2008).

En los mamíferos, la familia JAK comprende cuatro miembros: JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2, que se asocian a los dominios intracelulares de la proteína receptora, que al dimerizarse, se induce la transfosforilación de estas proteínas. Las JAK activadas, fosforilan los residuos de tirosina del dominio intracelular del receptor, favoreciendo la asociación inicial de las STAT y su posterior fosforilación, para la conformación del dímero, el cual es translocado al núcleo mediante un mecanismo que depende de la

importina α -5. Una vez en el núcleo, los complejos STAT dimerizados, se unen a secuencias reguladoras específicas de ADN para activar o reprimir la transcripción de genes diana. Por lo tanto, la vía de señalización JAK/STAT proporciona un mecanismo directo para traducir una señal extracelular en una respuesta transcripcional (Trivedi & Starz-Gaiano, 2018) y que posteriormente puede interactuar con otras vías de señalización (Shuai, 2000). que puede conducir a la expresión de proteínas involucradas en la migración celular, tales como metaloproteinasas y canales iónicos.

4. Metaloproteinasas (MMPs)

Las MMPs, son una familia de endoproteinasas secretadas o ancladas a la membrana (Könnecke & Bechmann, 2013). Su función principal es la degradación y remodelación de la matriz extracelular (MAE). La expresión de MMPs en el cerebro es baja en condiciones fisiológicas. En el glioma, las MMPs están activas y sobre-expresadas. El estudio de la expresión y la actividad de la MMP-2 y MMP-9 ha generado interés por su participación en los procesos invasivos de gliomas, ya que su expresión se correlaciona con el grado y la progresión tumoral (Wang et al., 2003). La MMP-2 y MMP-9 convierte el TGF- β de su forma inactiva a su forma activa, y este a su vez, favorece la expresión de MMP-2 en un ciclo de retroalimentación positiva. La expresión de la MMP-9 es regulada positivamente por STAT-3, EGF, vitronectina, IL-1 β , TNF- α y TGF- β (Yu & Stamenkovic, 2000; Esteve et al., 2002). La MMP-14 activa la MMP-2 al escindir su propéptido (Li et al., 2021; González- Molina et al., 2019).

5. Canales iónicos

El transporte de iones a través de canales iónicos, proteínas incorporadas a la membrana plasmática es un proceso fundamental para mantener la función y actividad celular normal. Los canales iónicos regulan el volumen, la proliferación y la muerte celular, tanto en células normales como en células tumorales, por lo que su expresión funcional se ha relacionado con el inicio, desarrollo y progresión tumoral (Kulbacka et al., 2017; Jentsch et al., 2016).

Las evidencias actuales sugieren la participación de los canales iónicos en la progresión de los tumores cerebrales (Griffin et al., 2020). Además, las células de glioma pueden integrarse eléctricamente en circuitos neuronales a través de sinapsis neurona-glioma (Venkatesh et al., 2019). Los canales iónicos funcionan en múltiples vías señalizadoras, relacionadas con la vascularización del tumor y las interacciones entre las células del sistema inmune con las células tumorales (Panyi et al., 2014).

Una clase importante de canales iónicos involucrados en la migración celular, son los canales de Na^+ dependientes de voltaje (VGSC). La subunidad principal del canal de sodio es codificada por 9 genes diferentes ($\text{Nav}1.1$ - $\text{Nav}1.9$), y puede, además, estar acompañada por una o más subunidades β [68]. La función del canal de sodio es favorecer la despolarización de V_m durante la fase de ascenso del potencial de acción en las células eléctricamente excitables (Wang et al., 2017). Además, se ha involucrado la actividad de los canales de sodio en la capacidad migratoria de células eléctricamente no excitables, tanto normales como tumorales. La subunidad $\text{Nav} 1.5$ neonatal, está ampliamente expresada en células de cáncer de mama, próstata, pulmón y cervicouterino, y que, al

silenciar su expresión, se ve reducida de manera significativa su capacidad migratoria y metastásica, dejando al descubierto la importancia de dicho canal iónico (Yang et al., 2020; López Charcas et al., 2021).

La activación y expresión de la subunidad Nav1.5 desencadenan una amplia variedad de mecanismos celulares, tales como la transición epitelio-mesénquima de las células tumorales, la acidificación del medio extracelular para la activación de la catepsina y por consiguiente de las MMPs, que en su conjunto potencia la metástasis y la invasividad de las células tumorales (Luo et al., 2020; López Charcas et al., 2021).

JUSTIFICACIÓN

El pobre pronóstico de vida asociado con el GBM lo convierte en un problema de salud pública. El GBM es altamente resistente a los tratamientos actuales, comparados con otros tipos y grados de gliomas, esto es por la gran capacidad migratoria que tienen estas células y por lo tanto se infiltran en tejidos adyacentes. Hasta la fecha, no se han encontrado marcadores que estén estrechamente relacionados con la aparición, el crecimiento y la invasión, es por esto que el GBM no se detecta en una etapa temprana. Hoy en día es necesario conocer los mecanismos moleculares responsables de la migración celular con el fin de identificar marcadores específicos de estas células antes de que ellas inicien el proceso de migración hacia otros tejidos. Sabemos que el GBM no solo se vuelve altamente maligno por las alteraciones moleculares, sino también por el microambiente en el que se está desarrollando, lo que propicia su alto potencial migratorio e invasivo. Actualmente se ha considerado que la elevada expresión de algunas citocinas proinflamatorias puede ser una condición que favorezca la capacidad migratoria e invasiva de las células derivadas de GBM.

Se sabe que en el microambiente de GBM, hay citocinas proinflamatorias, que favorecen la progresión tumoral, por lo tanto, es importante conocer el mecanismo molecular mediante el cual estas citocinas pueden estimular la capacidad migratoria de las células tumorales, esto con el fin proponer blancos farmacológicos que puedan alentar o inhibir la migración celular de GBM. En este trabajo particularmente, se analizará el efecto de IL-6 en la línea celular U-87 MG.

HIPÓTESIS

La presencia de IL-6 exagera la capacidad migratoria de las células de Glioblastoma Multiforme Humano U-87 MG.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el mecanismo molecular a través del cual IL-6 induce cambios sobre la capacidad migratoria de las células U-87 MG, provenientes de glioblastoma multiforme humano.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si la presencia de IL-6 altera la capacidad migratoria de las células U-87 MG
2. Detectar la expresión del ARNm que codifica para el receptor a IL-6 en células U-87 MG.
3. Evaluar cambios en los niveles de expresión del ARNm que codifica para diferentes elementos moleculares asociados positivamente a la capacidad migratoria de las células U-87 MG (factores de transcripción asociados al fenotipo mesénquima, Nav 1.5 y metaloproteinasas).
4. Investigar si el efecto de IL-6 sobre la capacidad migratoria de las células U-87 MG dependen de la concentración y de la duración del tratamiento.
5. Determinar la participación de la vía de señalización JAK-STAT sobre la capacidad migratoria de las células U-87 MG en presencia de IL-6.

METODOLOGÍA

Cultivo de la Línea Celular

Las células U-87 MG fueron sembradas en matraces planos de poliestireno de 25cm² de superficie, alimentadas con medio de cultivo DMEM suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB), 100 µ/ ml de penicilina y 100 lg/ ml de estreptomicina (Gibco, EE. UU.) Las células se mantuvieron en una incubadora a 37° C en una atmosfera de 5% de CO₂ y 95% de aire. El medio de cultivo se cambió cada 48 horas y cuando alcanzaron una confluencia del 90% se procedió a cosecharlas. Las células fueron expuestas 5 minutos a una solución de Tripsina- EDTA al 0.25% (Sigma- Aldrich, EUA), mediante dispersión mecánica con una pipeta serológica las células fueron despegadas del sustrato. La suspensión celular obtenida se utilizó para regenerar el cultivo madre en un matraz plano nuevo, así como para sembrar en placas multipozos para los experimentos diseñados previamente.

Ensayo de expresión génica

a) Extracción del Ácido Ribonucleico Total

Las células fueron sembradas en placas de 6 pozos con medio DMEM, suplementado con 10% de FBS, 1% de L-glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico –antimicótico (25µg/ml de anfotericina B, 10,000 µg/ml de estreptomicina y 10,000 unidades/ml de penicilina), una vez alcanzada la confluencia esperada, se recambió el medio de cultivo y se dio inicio al tratamiento de las células con IL-6. Al finalizar el tratamiento se procedió a realizar la extracción de ARN total empleando el kit comercial *FavorPrep TM, Tissue Total RNA Mini* (Favorgene, Biotech Corp., China), siguiendo las instrucciones del fabricante: a) se retiró el medio de cultivo de las placas; b) se lavaron las células dos veces con PBS; c) se agregó a cada pozo 350 µl de buffer de lisis suplementado con β- mercapto-etanol y se dejó incubar por 5 minutos; d) se transfirió el homogenado celular a una columna de filtración

soportada en un tubo colector, centrifugándose a 12,000 rpm por 2 min; e) el filtrado se transfirió a un tubo tipo eppendorf donde se agregó un volumen igual de etanol al 70%, se agitó vigorosamente y se dejó reposar por 3 minutos; f) la mezcla se transfirió a una columna FARB soportada en un tubo colector y se centrifugó a 12,000 rpm por 2 min; g) se eliminó el filtrado del tubo colector, se agregó a la columna FARB 500 μ l de buffer de lavado 1 y se centrifugó a 12,000 rpm por 2 minutos; h) se eliminó el filtrado del tubo colector, se agregó a la columna FARB 750 μ l de buffer de lavado 2 y se centrifugó a 12000 rpm por 2 minutos, repitiendo este paso una vez más; i) la columna FARB se transfirió a un tubo tipo eppendorf y se centrifugo en seco a 12,000 rpm por 3 minutos; j) se adicionó al filtro de la columna FARB 30 μ L de agua libre de RNAsas, se dejó reposar la muestra por 3 minutos a temperatura ambiente, y por último, se centrifugo a 12,000 rpm por 5 minutos para obtener el RNA total. Posteriormente se procedió a evaluar la cantidad y calidad del ARN extraído.

b) Cuantificación de ARN

La cuantificación del ARN se realizó por espectrofotometría. Se diluyeron en tubo tipo eppendorf 4 μ l de la solución de ARN extraído en 196 μ l de agua inyectable. La mezcla se transfirió a una cuveta UV, y se leyó la absorbancia a dos longitudes de onda: 260 nm y 280 nm. La concentración de ARN fue determinada por la longitud de onda de 260 nm, y la calidad del ARN extraído por el cociente 260 nm/ 280 nm (A_{260}/A_{280}). El valor del cociente obtenido debe estar en el rango de 1.8-2.0 para considerar al ARN como de buena calidad y sea utilizado para los ensayos de RT-PCR.

c) Síntesis de Ácido Desoxirribonucleico Complementario (Transcripción Reversa)

Para la síntesis de la cadena de Ácido Desoxirribonucleico complementario al ARN (ADNc), se llevó a cabo la Retrotranscripción empleando el kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystem, EUA), para el cual se siguieron las

indicaciones del fabricante considerando un volumen final de 20 μl para cada tubo de reacción. A cada tubo de reacción se le adicionó 4 μl de buffer RT, 1 μl de hexámeros aleatorios, 1 μl de una mezcla de nucleótidos (dNTP's), 2 μg de ARN purificado (el volumen de la solución de ARN dependerá de su concentración) y el volumen necesario de agua libre de ARNasas hasta completar los 20 μl volumen final. Posteriormente se colocaron los tubos de reacción en un termociclador personalizado con gradiente de temperatura (Mastercycler S50, Eppendorf) y se siguió el siguiente protocolo: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C, 5 minutos a 85°C y finalmente a 4°C, el ADNc se almacenó a -20°C hasta su uso para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

d) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

A partir del ADNc obtenido en la retro-transcripción, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el fin de detectar los niveles de expresión del ARNm de nuestro interés. Para tal fin, empleamos el Kit comercial *DreamTaq PCR Master Mix* (Thermo Scientific, EUA), para el cual se siguieron las indicaciones del fabricante considerando un volumen final de 20 μl para cada tubo de reacción. A cada tubo de reacción se le adicionó 10 μl de buffer PCR, 1 μl del oligonucleótido *forward*, 1 μl del oligonucleótido *reverse*, 1 μl de una mezcla de nucleótidos (dNTP's), 2 μl de ADNc y 5 μl de agua libre de ARNasas para completar los 20 μl de volumen final. Posteriormente se colocaron los tubos de reacción en un termociclador personalizado con gradiente de temperatura (Mastercycler S50, Eppendorf) y se siguió el siguiente protocolo para 35 ciclos: 5 minutos a 94 °C, 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la T_m de cada par de oligonucleótido utilizado, 1 minuto a 72°C, 10 minutos a 72°C y finalmente a 4°C, el producto de PCR se almacenó a -20°C hasta su uso para la electroforesis. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la siguiente tabla:

PRIMER	Sentido	SECUENCIA	T _m (°C)	Tamaño del amplicon (pb)
IL-6	Foward	CAGCTATGAACTCCTTCTCCAC	63.1	388
	Reverse	CTGGCTTGTTCCTCACTACTC		
IL-6R	Foward	CGCTGAGAGACAGAGACCATTTAG	62.2	474
	Reverse	GGACGTGCTGTGAGATAATAGAG		
gp130	Foward	GTCTGGGTAGAAGCAGAGAATG	62.2	679
	Reverse	GAAAGTCACAGGCAGGGATAG		
Nav 1.5	Foward	ACGGCACCTCTGATGTGTTACTGT	64.5	393
	Reverse	TGAGGGCCTCGTGTTCCTTTCTTGA		
MMP2	Foward	GCGGATCCAGCGCCAGAGAGACAC	76.6	686
	Reverse	TTAAGCTTCCACTCCGGGCAGGATT		
MMP9	Foward	TACCACCTCGAACTTTGACAGCGA	69.7	548
	Reverse	AAAGGCACAGTAGTGGCCGTAGAA		
MMP14	Foward	AACAGGCAAAGCTGATGCAGACAC	60.3	314
	Reverse	AGAAGATCATGATGTCGGCCTGCT		
b-actina	Forward	CAAGAGATGGCCACGGCT	218	72.7
	Reverse	TCCTTCTGCATCCTGTCTGGCA		

e) Separación electroforética de los productos de PCR

Los productos de PCR obtenidos fueron separados electroforéticamente utilizando geles de agarosa al 1.2% y teñidos con bromuro de etidio (BrEt). Para la preparación del gel se disolvieron 600 miligramos de agarosa en 50 ml de buffer TAE 1X, la solución fue calentada por 90 segundos hasta que se haya disuelto perfectamente la agarosa y se adicionó 4 µL de bromuro de etidio. La mezcla se vertió en la cámara de electroforesis dejando gelificar por 30 minutos a temperatura ambiente. En cada pozo del gel se

depositaron 9 µl de muestra y como marcador de peso molecular se utilizó *Gene Ruler 100 pb DNA Ladder* (Thermo Scientific, EUA). La cámara se conectó a una fuente de poder y se aplicó una diferencia de potencial de 65 V por 80 minutos, al final se tomaron imágenes digitales del gel en un fotodocumentador (Marca Axygen).

f) Densitometría

Se realizó el análisis densitométrico de las bandas presentes en las imágenes obtenidas de los geles utilizando el software *ImageJ* que es proporcionado gratuitamente por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de América (NIH).

Ensayo de Migración

Cámara Transwell

Para el ensayo se utilizaron Soportes Permeables Transwell® con membranas de policarbonato (poro de 8.0 µm, Corning Incorporated, EUA). Las células fueron sembradas en placas de 6 pozos con medio DMEM, suplementado con 10% de FBS, 1% de L-glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico –antimicótico (25µg/ml de anfotericina B, 10,000 µg/ml de estreptomycin y 10,000 unidades/ml de penicilina), una vez alcanzada la confluencia esperada, se recambió el medio de cultivo y se dio inicio al tratamiento de las células con IL-6. Al finalizar el tratamiento se procedió a obtener una suspensión celular final de 3×10^5 células/ml en medio de cultivo libre de suero fetal bovino. El ensayo de migración en cámaras transwell se realizó de la siguiente manera: a) en la parte inferior de la cámara se agregaron 750 µl de medio de cultivo completo y sobre la membrana de policarbonato de la cámara transwell se adicionaron 100 µl de la suspensión celular, dando un número final de 30,000 células sembradas; b) la placa con los insertos se incubó por 18 horas a 37°C, en 95% de aire y 5% de CO₂; c) con ayuda de un hisopo de algodón se retiraron las células que permanecieron en la parte superior de la membrana de

policarbonato del inserto; d) las células que migraron permanecieron en la parte inferior de la membrana de policarbonato del inserto y fueron fijadas con una mezcla de metanol/acetona (vol/vol) por 20 minutos a 4°C; e) las células fueron teñidas con el colorante cristal violeta (0.05%) por 20 minutos; f) las células fueron lavadas varias veces con agua tridestilada con el fin de eliminar el exceso de colorante, dejándose finalmente el inserto en agua; g) las cámaras transwell se mantuvieron en refrigeración hasta el conteo celular; h) se realizaron microfotografías en un microscopio de campo claro que tiene acoplado una cámara modelo c10 plus (Jenoptick) y con el objetivo 10X; i) a partir de las microfotografías obtenidas se realizó el conteo celular empleando el programa *Image J*.

Análisis Estadístico

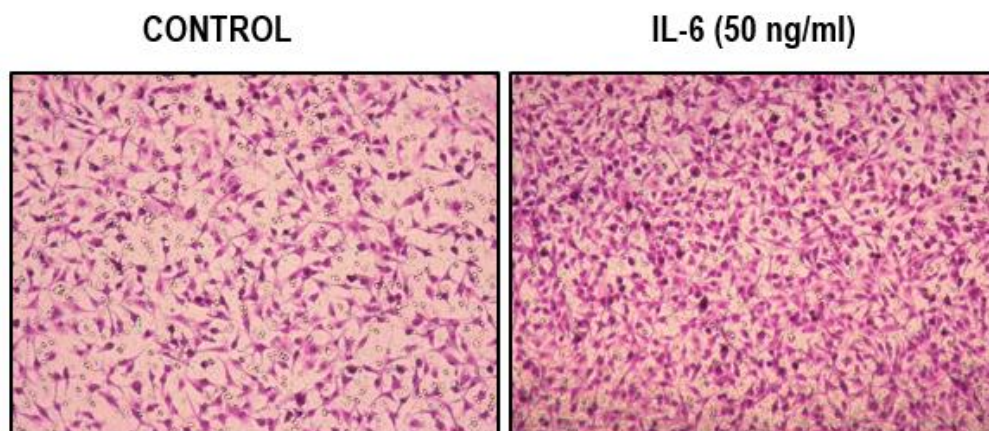
El análisis estadístico y gráficos se realizaron con el programa el programa SigmaPlot 12.5 (Jandel Corporation, EUA), a los datos experimentales se les aplicó la prueba *t de Student*, y consideramos la diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de p es menor a 0.05 ($p < 0.05$).

RESULTADOS

IL-6 promueve el aumento en la capacidad migratoria de las células U-87 MG

La IL-6, además de ser una molécula que participa en la reacción inflamatoria, también está involucrada en el desarrollo y progresión tumoral en diferentes tipos de cáncer, tales como cáncer de mama, cáncer de próstata, entre otros, desconociéndose hasta el momento su participación en la progresión del glioblastoma. Por lo que inicialmente decidimos investigar si la presencia de IL-6 modificaba de alguna manera la capacidad migratoria de las células U-87 MG, para lo cual, se realizaron ensayos de migración en cámaras transwell. Las células se mantuvieron por 48 horas en la presencia crónica de 50 ng/ml de IL-6. Al finalizar este periodo, las células fueron cosechadas para ser sembradas en los insertos de las cámaras transwell (30,000 células/inserto), se incubaron nuevamente durante 18 horas, manteniendo la presencia de IL-6 en el medio de cultivo. Al finalizar la incubación, las células que migraron fueron fijadas, teñidas y fotografiadas. A partir de las microfotografías obtenidas se realizó el conteo celular utilizando el programa *Image J*. La figura 1A muestra las microfotografías de las células que migraron bajo nuestras condiciones experimentales. El conteo celular mostró que a esa concentración de IL-6 se ve un incremento significativo en la capacidad migratoria de las células U-87 MG. (Figura 7B).

A



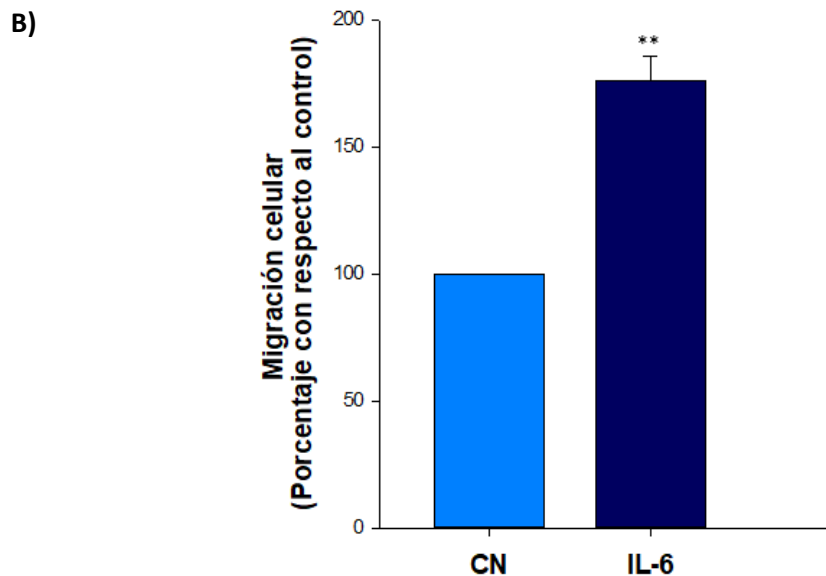


Figura 7. Efecto de IL-6 sobre la capacidad migratoria de las células U-87 MG. **A)** Se muestran micrografías representativas obtenidas con el objetivo 10x, del ensayo de migración en cámaras transwell. Estas micrografías muestran que la migración de las células U-87 MG aumenta de manera significativa cuando son tratadas con 50 ng/mL de IL-6 con respecto al control. **B)** Cuantificación del porcentaje de células que migran en la condición tratada con 50 ng/ml de IL-6 con respecto a la condición control, vemos que el porcentaje de migración de células U-87 MG tratadas, es 75 % más que las que migran en condición control. Los valores graficados son el promedio con su error estándar de cuatro experimentos independientes, (** = $p \leq 0.01$).

Las células U-87 MG expresan el ARNm que codifica para el receptor a IL-6 y de su proteína accesoria gp130

La IL-6 induce cambios significativos en la capacidad migratoria de las células U-87 MG, por lo que decidimos investigar si este efecto es mediado por la activación de su receptor, a continuación, evaluamos si nuestro modelo experimental, expresa el ARNm que codifica para el receptor IL-6 y de la proteína accesoria gp130, para esto se hizo un ensayo de expresión génica RT-PCR de punto final y posteriormente se hizo la separación electroforética de los productos de PCR. La figura 8A muestra claramente que las células U-87 MG expresan el ARNm que codifica para el receptor de IL-6 (IL-6R) y el de su proteína accesoria gp130, observándose una banda de 474 y 679 pares de bases,

respectivamente. La figura 8B muestra el resultado del análisis densitométrico realizado a los productos de PCR amplificados. Se observa que la expresión de ARNm de gp130 es aproximadamente 3 veces mayor que la del receptor para IL-6 (IL6-R), probablemente se debe a que gp130 es una proteína receptora de señalización común para varios receptores a citocinas.

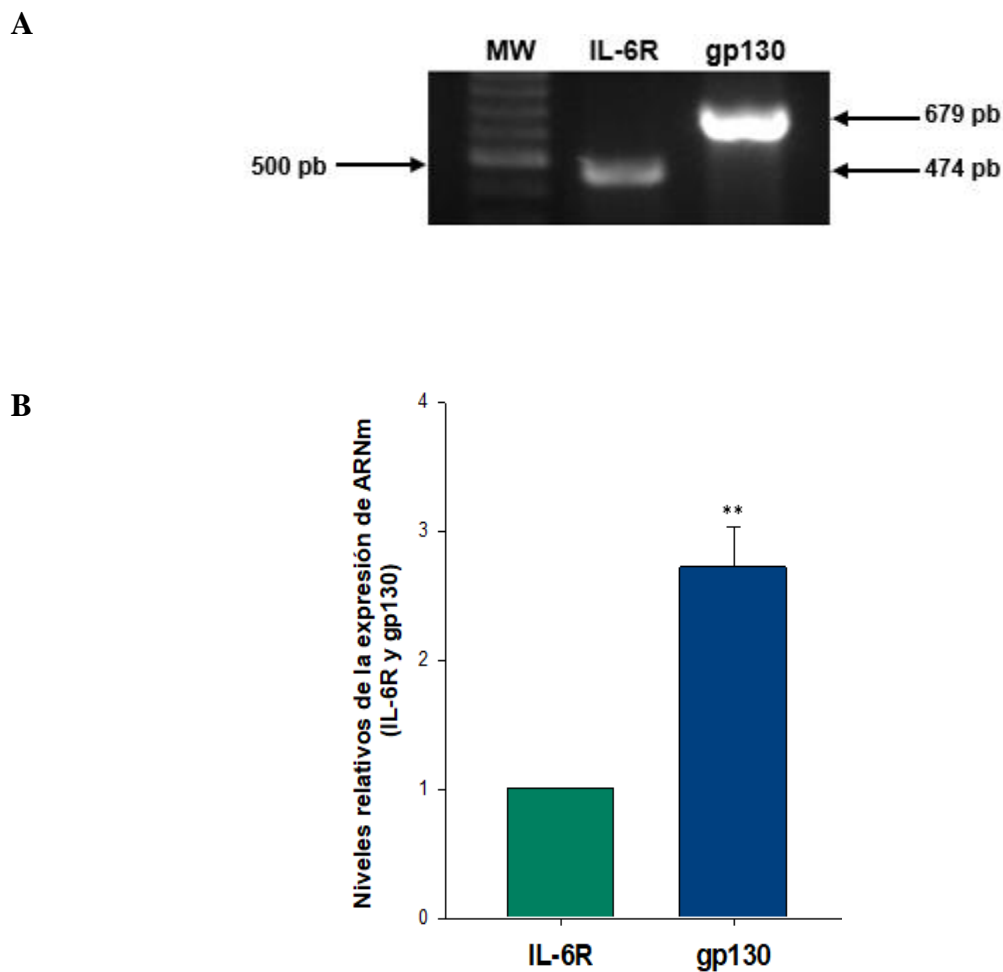
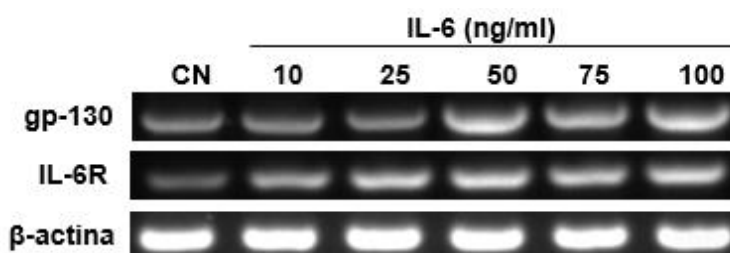


Figura 8. Expresión del ARNm que codifica para el receptor de IL-6 (IL-6R) y su proteína accesoria gp130. A) Mediante extracción del ARNm de las células U-87 MG y la realización de retrotranscripción seguida de PCR, se lograron amplificar secuencias específicas para el receptor IL-6R y la subunidad gp130. B) Se muestra una diferencia significativa de la expresión de ARNm que codifica para gp130 con respecto a la expresión de ARNm que codifica para IL-6R, esta diferencia puede deberse principalmente a que gp130, no solo es la proteína accesoria de IL-6R, sino que también gp130 forma complejos con receptores de otras citocinas. Los valores graficados se normalizaron con respecto a gp130. Los datos mostrados representan la media (\pm error estándar) de una serie de tres experimentos independientes (** = $p \leq 0.01$).

IL-6 estimula de manera dosis-dependiente los niveles de expresión del ARNm que codifican para IL-6R y gp130

Una característica común de los receptores a moléculas relacionadas con la reacción inflamatoria es que pueden ser regulados por sus propios ligandos, ya sea de manera positiva o negativa. Con estos antecedentes, decidimos investigar si la presencia crónica de IL-6 es capaz de modificar los niveles de expresión del ARNm que codifica para IL-6R y gp130 presentes en nuestro modelo experimental, y si este efecto era dependiente de la concentración. Las células U-87 MG fueron tratadas con diferentes concentraciones de IL6 (10, 25, 50, 75 y 100 ng/ml) por 72h. Al finalizar el tratamiento, las células fueron cosechadas, se aisló y purificó el ARN, y por RT-PCR evaluamos el nivel de expresión del ARNm que codifica para IL6-R y gp130, utilizando la β -actina como control interno. La Figura 9A muestra la imagen representativa de la separación electroforética de los productos de PCR para IL-6R, gp130 y β -actina, con su respectivo tamaño expresado en pares de bases de nucleótidos. Se observa con claridad que el tratamiento con IL-6 no modifica el nivel de expresión del ARNm que codifica para β -actina independientemente de la concentración utilizada de IL-6, lo cual valida su uso como control interno en nuestros experimentos de expresión génica. Por su parte, la expresión del ARNm que codifica para gp130 resulta estimulada a partir del tratamiento de 50 ng/ml, alcanzado un incremento superior al 200% con respecto a la condición control (Figura 9B). De igual manera, la expresión de ARNm que codifica para IL-6R es regulada positivamente por la presencia crónica de IL-6, a partir de una concentración de 10 ng/ml, alcanzando su valor máximo de expresión entre 25 y 50ng/ml (Figura 9C). Se puede concluir que el nivel de expresión del receptor para IL-6 (IL-6R y gp130) depende de la concentración de IL-6.

A



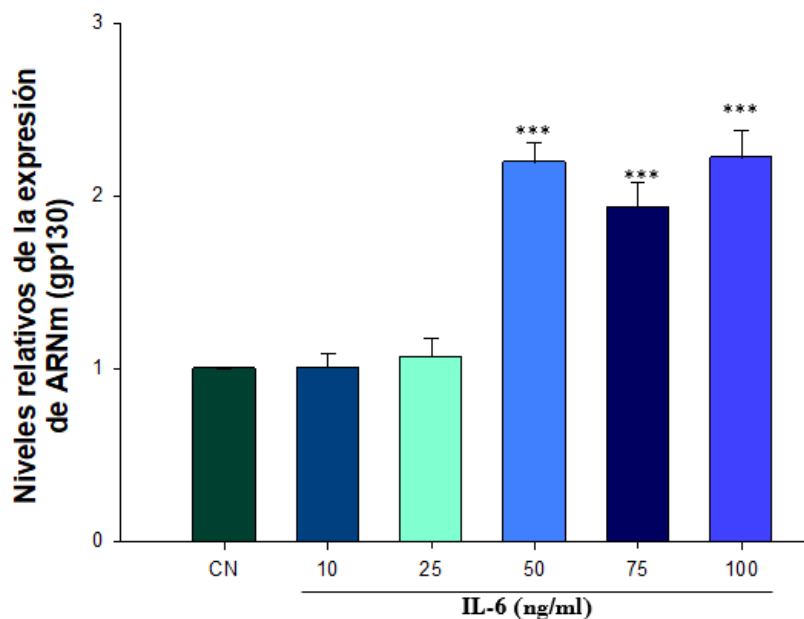
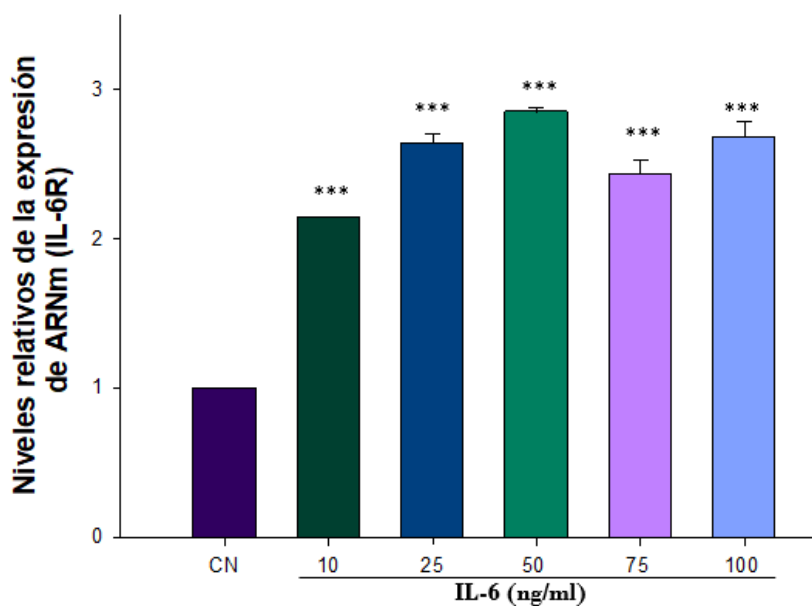
B**C**

Figura 9. IL-6 estimula la expresión del ARNm que codifica para IL-6R y gp130. A) Expresión de ARNm que codifica para IL-6R y gp130, con diferentes concentraciones de IL-6, se puede ver que en gp130 la intensidad de la banda es aproximadamente el doble cuando las células U-87 MG son tratadas con 50 ng/ml de IL-6, mientras que para IL-6R la intensidad de la banda aumenta desde 10 ng/ml de IL-6. B) Los resultados del análisis densitométrico muestran que hasta una concentración de 50 ng/ml de IL-6 hay un aumento en más del 200 % en la expresión de ARNm que codifica para gp130, disminuyendo ligeramente con una concentración de 75 ng/ml, pero vuelve a aumentar en más del 200% con una concentración de 100 ng/ml de IL-6. C) Para el caso de IL-6R la expresión de ARNm aumenta en más del 200 % a partir de una concentración de 10 ng/ml de IL-6R, esta expresión sigue en aumento hasta una concentración de 50 ng/ml, donde alcanza la máxima expresión. Las células U-87 MG se trataron con diferentes concentraciones de IL-6 (10, 25, 50, 75 y 100ng/ml) el tiempo de tratamiento fue de 72h. Los datos mostrados representan la media (\pm error estándar) de una serie de tres experimentos independientes (***) ($p \leq 0.001$).

Expresión de ARNm que codifica para IL-6 en la línea celular U-87 MG

Una de las características que adquieren las células tumorales durante su transformación maligna, es su capacidad de producir citocinas pro-inflamatorias, con el fin de mantener un microambiente propicio para el desarrollo y progresión tumoral. Por lo que de manera preliminar quisimos investigar, si las células U-87 MG son capaces de producir su propia IL-6. Examinamos la expresión de ARNm que codifica para IL-6 en nuestro modelo experimental, y observamos que efectivamente, las células U-87 MG expresan el ARNm que codifica para IL-6 en células U- MG87 (Figura 10).

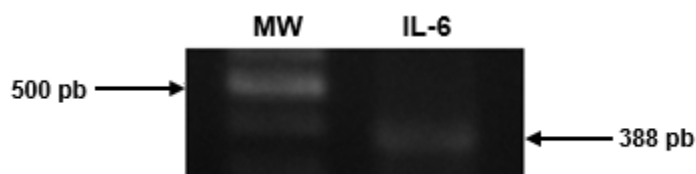


Figura 10. Expresión del ARNm que codifica para IL-6 en las células U-87 MG. Las células U-87 MG se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar, se aisló y purificó el ARN para por ensayos de RT-PCR detectar el ARNm que codifica para IL-6, obteniéndose la banda respectiva de IL-6 en 388 pb.

Las células U-87 MG expresan el ARNm que codifica para Metaloproteinasas (MMPs)

Actualmente, la investigación del cáncer se centra en comprender los mecanismos funcionales que subyacen a la transformación celular y la progresión tumoral. Las MMPs son una familia de proteasas que participan en la degradación de los componentes de la matriz extracelular, incluida la membrana basal y la superficie del tumor, lo que favorece la capacidad invasiva y migratoria de las células tumorales al tejido u órgano más cercano. Además, las MMPs promueven el crecimiento tumoral y la diseminación a través del endotelio capilar y la neovascularización. Decidimos evaluar en nuestro modelo experimental, el nivel de expresión de las MMPs que están implicadas en la capacidad migratoria de las células tumorales. Las células U-87 MG se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar, se aisló y purificó el ARN total y por ensayos de expresión génica, evaluamos los niveles de expresión del ARNm que codifica para las siguientes

metaloproteinasas: MMP-2, MMP-9 y MMP-14. La figura 11A evidencia que la línea celular U-87 MG expresa en condiciones basales el ARNm que codifica para MMP-2, MMP-9 y MMP-14. El análisis densitométrico muestra que no hay diferencia significativa en la expresión de ARNm de cada una de estas metaloproteinasas (Figura 11B).

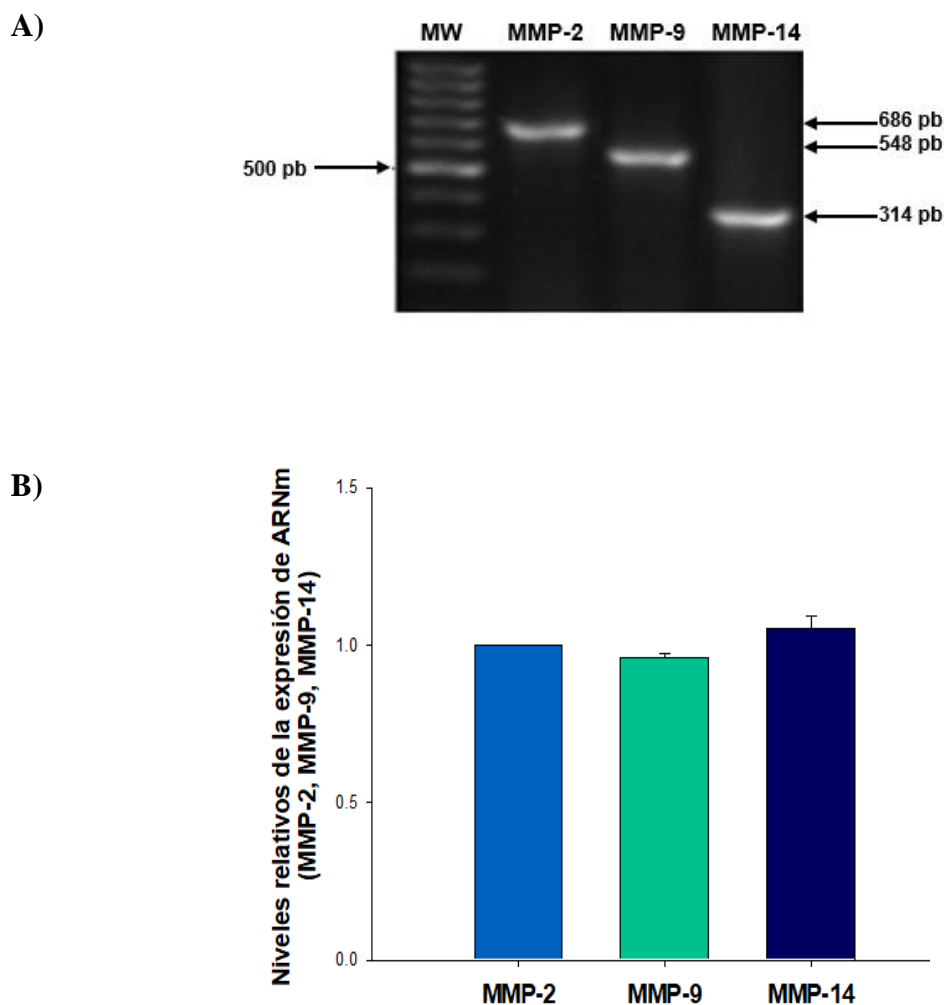


Figura 11. Expresión del ARNm que codifica para MMP-2, MMP-9 y MMP-14. A) Ensayos de RT-PCR de células U-87 MG mantenidas en condiciones de cultivo estándar, muestran la expresión de ARNm que codifica para la MMP-2, MMP-9 y MMP-14. B) Se muestra que las células U-87 MG en condiciones basales no presentan diferencia significativa en la expresión del ARNm que codifica para estas MMPs. Los valores presentados se normalizaron con respecto a la MMP-2. Los datos mostrados representan la media (\pm error estándar) de una serie de tres experimentos independientes (* = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$ y *** = $p \leq 0.001$).

IL-6 estimula de manera dosis-dependiente los niveles de expresión del ARNm que codifican para MMP-2, MMP-9 y MMP-14

A continuación, decidimos evaluar si el efecto estimulador que ejerce la IL-6 sobre la capacidad migratoria de las células U-87 MG es acompañado por cambios en los niveles de expresión del ARNm que codifican para las tres metaloproteinasas (MMP-2, MMP-9 y MMP-14) involucradas en la capacidad migratoria de las células tumorales, y además determinar, si este efecto depende de la concentración presente de IL-6. Las células U-87 MG se mantuvieron durante 72 horas en presencia de diferentes concentraciones de IL-6 (10, 25, 50, 75, y 100 ng/ml). Al finalizar el tratamiento, se realizaron ensayos de expresión génica para evaluar los niveles de expresión del ARNm que codifica para cada una de las metaloproteinasas evaluadas. En términos generales podemos decir, que las células U-87 MG al ser tratadas con IL-6 se induce un incremento en la expresión del ARNm que codifica para MMP-2, MMP-9 y MMP-14, de forma dependiente de la concentración y de manera diferencial (Figura 12A). Por ejemplo, la expresión de MMP-2 se ve incrementada casi un 50% a partir de 25 ng/ml de IL-6, alcanzando su efecto máximo, más de dos veces con respecto a la condición control, cuando las células se mantienen a una concentración de 50 ng/ml de la citocina pro-inflamatoria (Figura 12B). Para el caso de la MMP-9 se observa un fenómeno similar, se incrementa aproximadamente un 50% con respecto a la condición control, a partir de una concentración de 25 ng/ml de IL-6, incrementándose ligeramente (70% con respecto a la condición control) cuando las células se mantienen en presencia de altas concentraciones de IL-6 (50 y 100 ng/ml) (Figura 13A). La respuesta sobre la expresión del ARNm que codifica para la MMP-14 es menos sensible a la presencia de IL-6, con respecto a las otras metaloproteinasas evaluadas, ya que en este caso, se requiere una concentración mínima de 50 ng/ml de IL-6 para observar un incremento significativo en los niveles de expresión de MMP-14 (40% con respecto a la condición control), y conforme se incrementa la concentración de IL-6 a 75 y 100 ng/ml, aumentan los niveles de expresión de esta metaloproteinasas, un 45% y 60% respectivamente (Figura 13B).

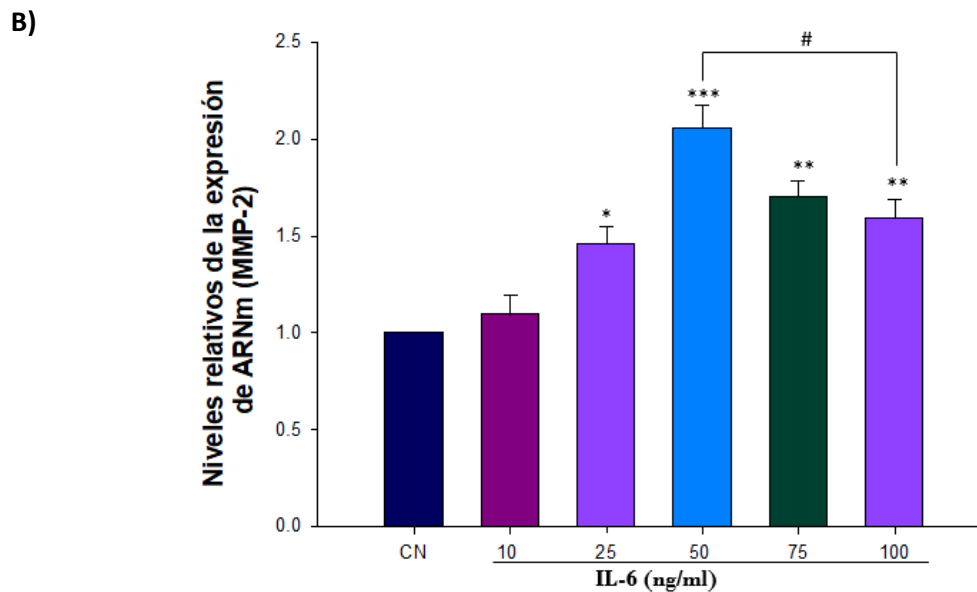
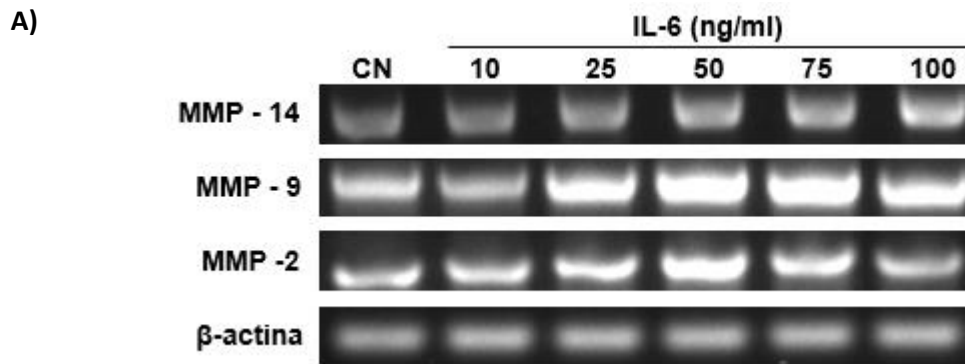
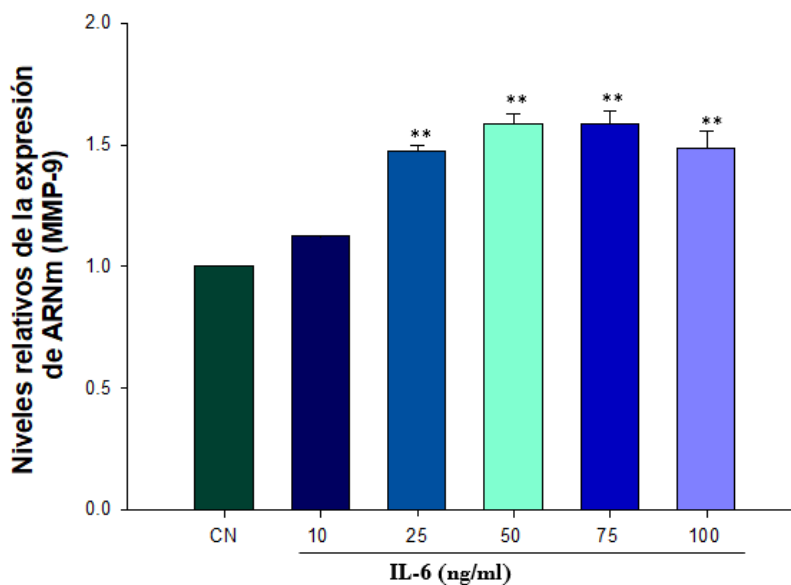


Figura 12. IL-6 estimula de manera dosis-dependiente la expresión del ARNm que codifica para MMP-2. Las células U-87 MG se trataron por 72 horas a diferentes concentraciones de IL-6: 10, 25, 50, 75 y 100ng/ml. **A)** Imagen representativa de la separación electroforética de los productos de PCR, de las MMPs (2, 9 y 14). **B)** Análisis densitométrico de los niveles de expresión del ARNm que codifica para la MMP-2. Se observa que a una concentración de 25 ng/ml de IL-6 ya hay un aumento significativo en la expresión de MMP-2 y cuando las células son tratadas con una concentración de 50 ng/ml de IL-6, la expresión es más de 2 veces, vemos que a esta concentración esta la expresión máxima del ARNm que codifica para MMP-2 en células U-87 MG, ya que a concentraciones más altas la expresión disminuye significativamente. Los datos mostrados representan la media (\pm error estándar) de una serie de tres experimentos independientes (* = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$ y *** = $p \leq 0.001$).

A)



B)

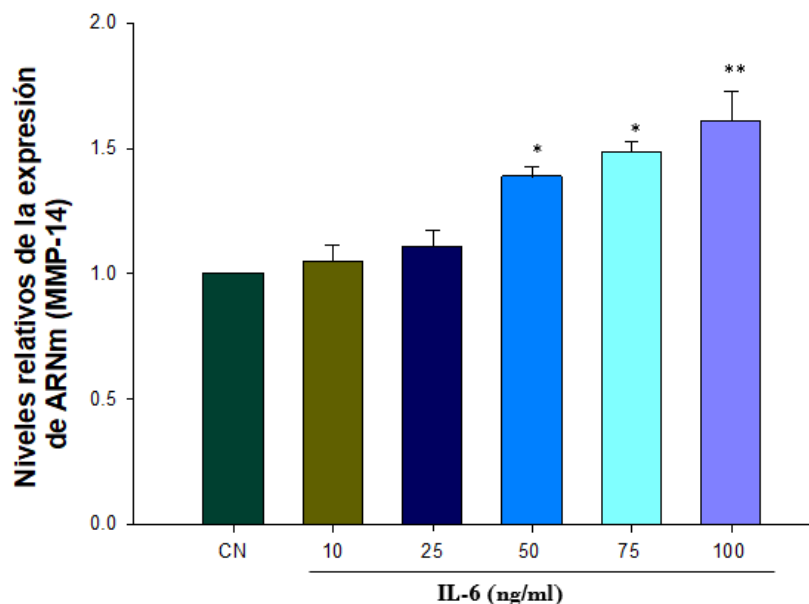


Figura 13. IL-6 estimula de manera dosis-dependiente la expresión del ARNm que codifica para MMP-9 y MMP-14. Las células U-87 MG se trataron por 72 horas a diferentes concentraciones de IL-6: 10, 25, 50, 75 y 100ng/ml. Se muestra análisis densitométrico. **A)** LA expresión del ARNm que codifica para MMP-14 tiene una diferencia significativa del 50 %, a una concentración de 25 ng/ml de IL-6, aumentando ligeramente a un 70% en una concentración entre 50 y 75 ng/ml, pero a una concentración de 100 ng/ml, expresión de ARNm de MMP-9 empieza a disminuir ligeramente. **B)** En el caso de la MMP-14 hay un aumento significativo en la expresión del ARNm a partir de 50 ng/ml y esta expresión sigue en incremento cuando se aumenta la concentración de IL-6. Los datos mostrados representan la media (\pm error estándar) de una serie de tres experimentos independientes (* = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$).

IL-6 exagerba la expresión de la subunidad α del del canal de sodio Nav 1.5 dependiente de voltaje en las células U-87 MG

Existen numerosas evidencias que muestran que la subunidad α de los canales de sodio Nav 1.5 que normalmente se localiza en el corazón de los mamíferos, se expresa de manera aberrante en células tumorales de origen epitelial, como cáncer de mama, próstata, colon, cuello uterino, pulmón, entre otros. Debido a la participación del canal de sodio Nav 1.5 en la capacidad migratoria de múltiples tipos de cáncer, decidimos investigar de manera inicial si las células U-87 MG expresan el ARNm que codifica para la subunidad α del canal de sodio Nav 1.5. El resultado del ensayo de expresión génica mostrado en la figura 14 evidencia que las células U-87 MG expresan de manera intensa el ARNm que codifica para dicho canal de sodio.

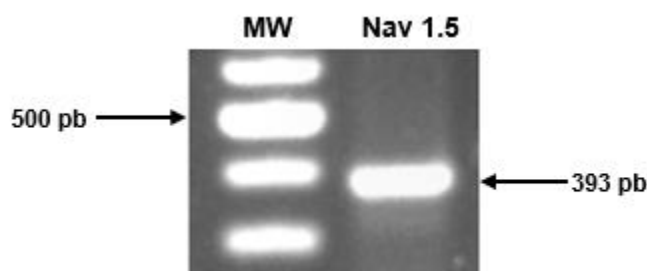


Figura 14. Expresión del ARNm que codifica para la subunidad α del canal de sodio Nav 1.5. Las células U-87 MG se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar, a partir de las cuales se realizó el ensayo de expresión génica. El producto de PCR obtenido tiene una extensión de 393 pares de bases, tamaño que coincide con el esperado.

Lo siguiente que decidimos investigar fue sí la presencia crónica de IL-6 incide sobre los niveles de expresión del ARNm que codifica para el canal de sodio Nav 1.5, y si este efecto depende de la concentración empleada de la citocina pro-inflamatoria. Las células U-87 MG fueron tratadas por 72 horas a diferentes concentraciones de IL-6 (10, 25, 50, 75, y 100 ng/ml).

Los resultados obtenidos muestran que IL-6 induce un incremento significativo sobre los niveles de expresión del ARNm que codifica para Nav 1.5, y que este efecto es dosis dependiente (Figura 15B). Es necesaria una concentración mínima de 25 ng/ml de IL-6 para

observar un incremento significativo del 25% con respecto a la condición control. El nivel máximo de expresión del ARNm que codifica para Nav 1.5, se alcanza cuando las células U-87 MG son mantenidas en presencia de 50 y 75 ng/ml de IL-6, lográndose un incremento del 50 y 48%, respectivamente.

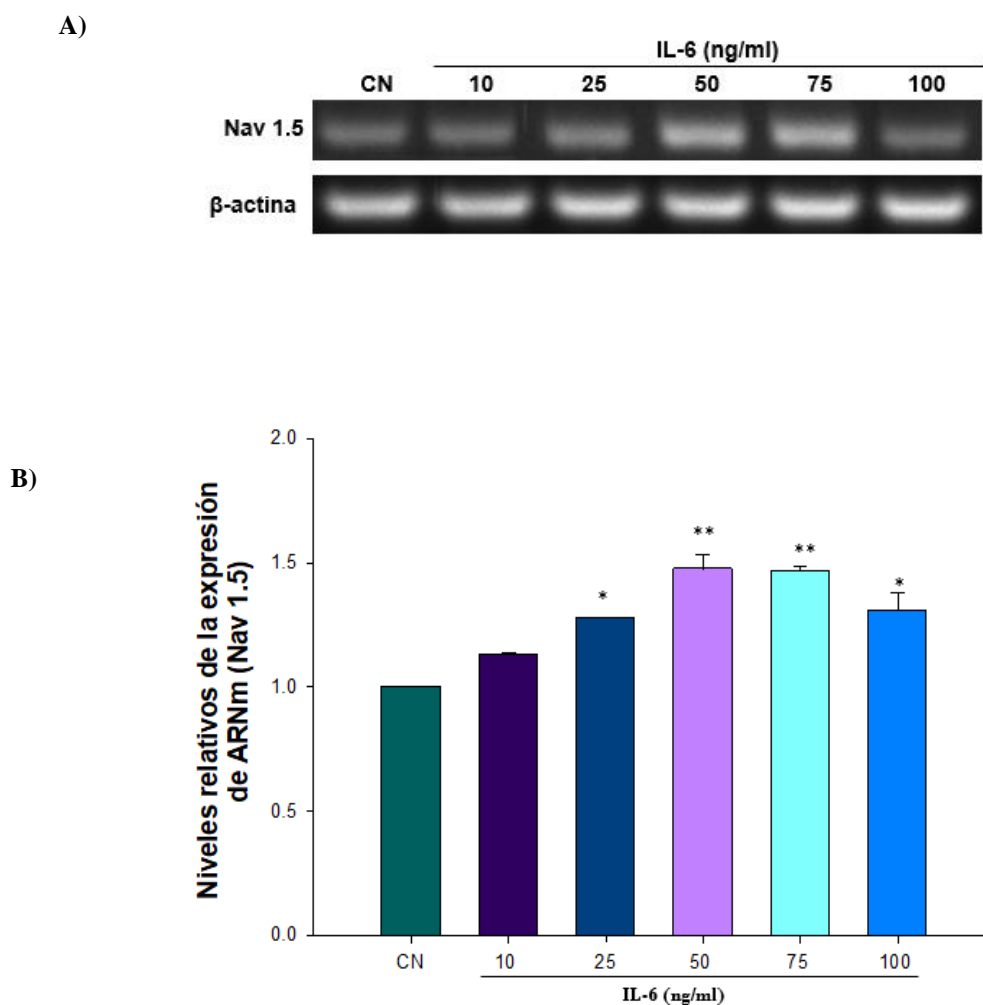


Figura 15. IL-6 induce la expresión del ARNm que codifica para Nav 1.5 de manera dosis-dependiente en las células U-87 MG.

Las células U-87 MG se trataron por 72 horas a diferentes concentraciones de IL-6: 10, 25, 50, 75 y 100ng/ml. **A)** Imagen representativa de la separación electroforética de los productos de PCR. Podemos ver que la intensidad de la banda empieza a aumentar en 25 ng/ml, pero hay una mayor intensidad entre 50 y 75 ng/ml. **B)** Análisis densitométrico de los niveles de expresión del ARNm que codifica para Nav 1.5, se observa que hay una mayor expresión entre 50 y 75 ng/ml, cuando las células U-87 MG son tratadas con 100 ng/ml, hay una ligera disminución de la expresión, pero aun así este nivel de expresión tiene un aumento significativo con respecto al control. Los datos mostrados representan la media (\pm error estándar) de una serie de tres experimentos independientes (* = $p \leq 0.05$ y ** = $p \leq 0.01$).

El efecto que IL-6 ejerce sobre la capacidad migratoria de las células U-87 MG es mediado por la vía de señalización JAK/STAT

Es un hecho que la IL-6 al unirse a IL-6R y gp130, exagera la capacidad migratoria de las células U-87 MG, desconociéndose hasta el momento la vía de señalización involucrada. Recientes reportes científicos han mostrado la asociación positiva de la vía de señalización JAK2/STAT3 sobre la capacidad migratoria de células de cáncer de mama. Por lo que decidimos investigar de manera preliminar si el efecto estimulador que ejerce la IL-6 sobre la capacidad migratoria de las células U-87 MG es mediado al menos parcialmente por la vía de señalización JAK2/STAT3 para lo cual utilizamos inhibidores específicos para estas proteínas en presencia y ausencia de IL-6. Las células U-87 MG se mantuvieron en presencia de 50 ng/ml de IL-6, 50 nM de AG490 (inhibidor de la proteína JAK2) y 10 nM de Stattic (inhibidor de STAT3) por 48 horas. Al finalizar el tratamiento, se cosecharon las células y se sembraron en los insertos de las cámaras transwell para realizar el ensayo de migración celular. Los resultados obtenidos muestran, tal y como lo habíamos visto, que 50 ng/ml de IL-6 inducen un incremento significativo cercano del 70% sobre el número de células que migran, con respecto a la condición control. La presencia de AG490, para sorpresa nuestra, igualmente que el efecto de IL-6, favorece un aumento del 20% sobre el número de células que migran. Por su parte, la presencia de Stattic reduce un 70% la capacidad migratoria de las células U-87 MG. Cuando las células son pretratadas con 50 ng/ml de IL-6 y se añade al medio de cultivo AG490 o Stattic, el efecto estimulador de IL-6 sobre la capacidad migratoria de las células U-87 MG se ve reducido, por ejemplo, pasa del 170% al 95% en presencia de AG490, y del 170% al 50% cuando se añade Stattic (Figura 16). Estos resultados preliminares sugieren la participación de la vía JAK2/STAT3 en el efecto estimulador que ejerce la IL-6 sobre la capacidad migratoria de las células U-87 MG.

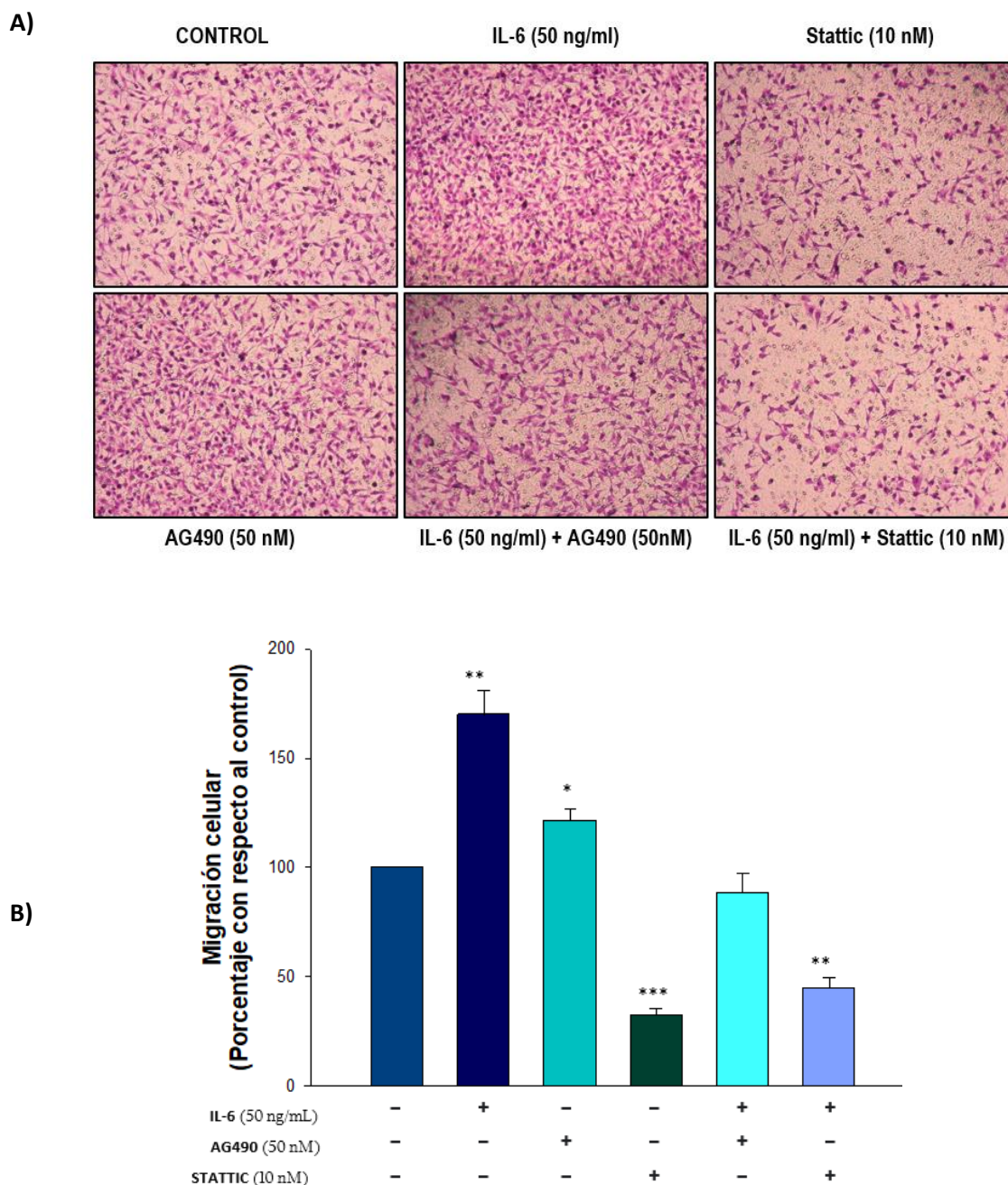


Figura 16. El efecto de IL-6 sobre la capacidad migratoria de las células U-87 MG es mediado por la vía de señalización JAK2/STAT3.

Las células U-87 MG se trataron por 48 horas con 50 ng/ml de IL-6, 50 nM de AG490 y 10 nM de Stattic, ya sea de manera individual o combinada. **A)** Imagen representativa de las células que migraron bajo las diferentes condiciones experimentales, obtenidas con el objetivo 10x. Cuando las células U-87 MG son tratadas con 50 ng/ml de IL-6, podemos ver que es muy notoria el número de células que migran, de la misma manera se observa una mayor migración cuando son tratadas con AG490, pero disminuye radicalmente la migración de estas células cuando son tratadas con Stattic, sin embargo cuando las células son pretratadas con IL-6 y posteriormente se adiciona AG490 pareciera ser que el número de células que migran es similar a las que migran cuando están en condición control, por otra parte cuando las células están pretratadas y se añade

Sttatic también se observa una disminución significativa con respecto al control. **B)** Cuantificación de las células que migraron en las diferentes condiciones experimentales. Las células tratadas con IL-6 (50ng/ml) tienen un aumento del 70% con respecto a la condición control, cuando las células están en presencia de AG490 hay un aumento en la migración del 20%, cuando las células son pretratadas con IL-6 y se añade AG490 la disminución de las células que migran es aproximadamente 5% con respecto al control, las células tratadas con Sttatic (10nM) disminuyen la capacidad migratoria en un 70% y finalmente cuando la células son pretratadas con IL-6 y se adiciona Sttatic, también hay una disminución significativa en la capacidad migratoria. Los datos mostrados representan la media (\pm error estándar) de una serie de tres experimentos independientes (* = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$ y *** = $p \leq 0.001$).

El efecto que IL-6 ejerce sobre la expresión de IL-6R, gp130, metaloproteinasas y de la subunidad α del canal de sodio Nav 1.5 es mediado por la vía de señalización JAK/STAT en las células U-87 MG

Los datos presentados previamente, muestran que la IL-6 favorece la expresión del ARNm que codifica para IL-6R, gp130, MMP-2, MMP-14 y la subunidad Nav 1.5 de manera dosis-dependiente. Estas moléculas participan de manera importante en la capacidad migratoria de las células tumorales. La presencia de los inhibidores de la vía de señalización JAK2-STAT3 (AG490 y Sttatic) reducen el efecto estimulador de la IL-6 sobre la capacidad migratoria de las células U-87 MG, por lo que quisimos investigar si este efecto inhibitorio era ocasionado por una reducción en los niveles de expresión del ARNm que codifica para IL-6R, gp130, MMP-2, MMP-14 y la subunidad Nav 1.5. Las células U-87 MG se mantuvieron en presencia de 50 ng/ml de IL-6, 50 nM de AG490 (inhibidor de la proteína JAK2) y 10 nM de Sttatic (inhibidor de STAT3) por 48 horas. Al finalizar el tratamiento, se aisló y purificó el ARN para realizar los ensayos de expresión génica para cada una de las proteínas mencionadas. Los resultados obtenidos muestran claramente que la expresión tanto basal como la estimulada por IL-6 del ARNm que codifica para IL-6R (Figura 17B), gp130 y MMP-2 (Figura 18A-B) depende de la vía de señalización JAK2-STAT3, mientras que la expresión de MMP-14 y de la subunidad α del canal de sodio Nav 1.5 es independiente de dicha vía de señalización (Figura 19A-B).

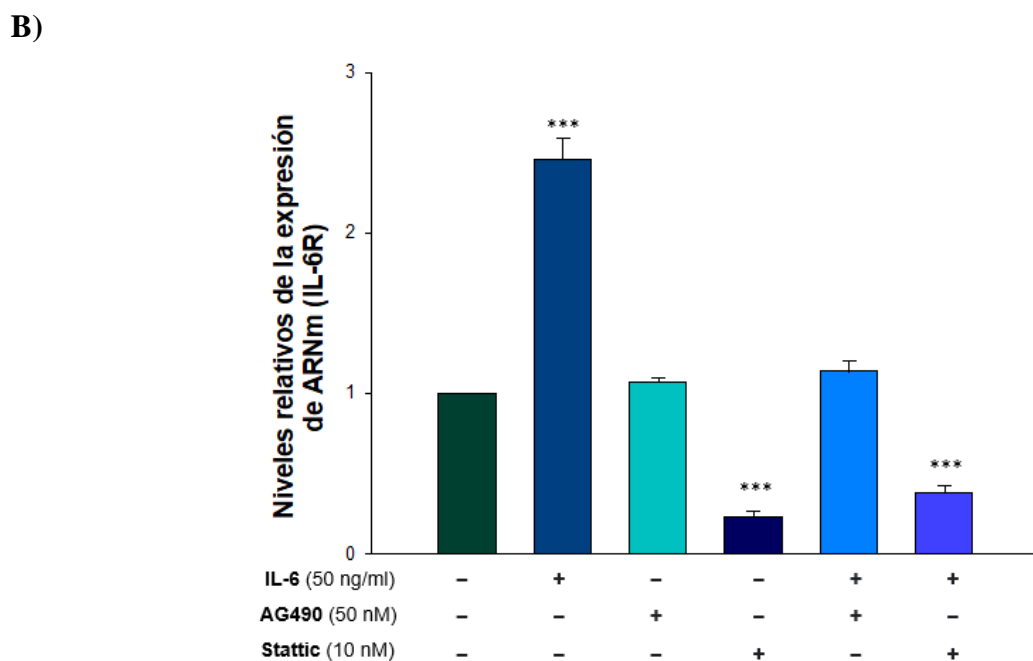
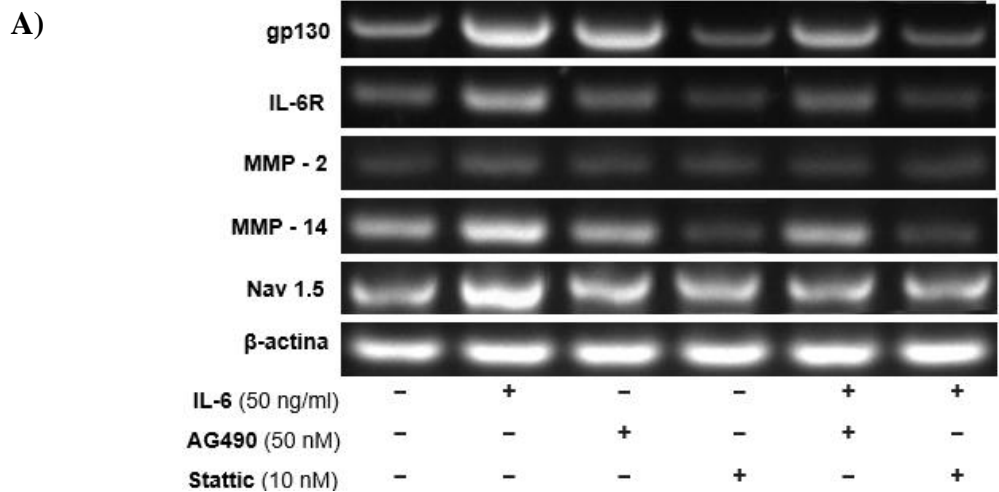


Figura 17. Efecto de los inhibidores de la vía JAK2/STAT3 sobre los niveles de expresión del ARNm que codifica para IL-6R. Las células U-87 MG se trataron por 48 horas con 50 ng/ml de IL-6, 50 nM de AG490 y 10 nM de Stattic, ya sea de manera individual o combinada. **A)** Imagen representativa de la separación electroforética de los productos de PCR (gp130, IL-6R, MMP-2, MMP-9 y Nav 1.5). **B)** Análisis densitométrico de los niveles de expresión del ARNm que codifica para IL-6R. Las células en presencia de IL-6 aumentan la expresión de ARNm que codifica para este en más del 200%, mientras que en presencia de IL-6+AG490 y AG490 no hay diferencia significativa de la expresión de ARNm que codifica para IL-6R con respecto al control, por otra parte, cuando las células están en presencia de IL-6 + Stattic y Stattic la disminución en la expresión del ARNm que codifica para IL-6R es significativa. Los datos mostrados representan la media (\pm error estándar) de una serie de tres experimentos independientes (***) = $p \leq 0.001$.

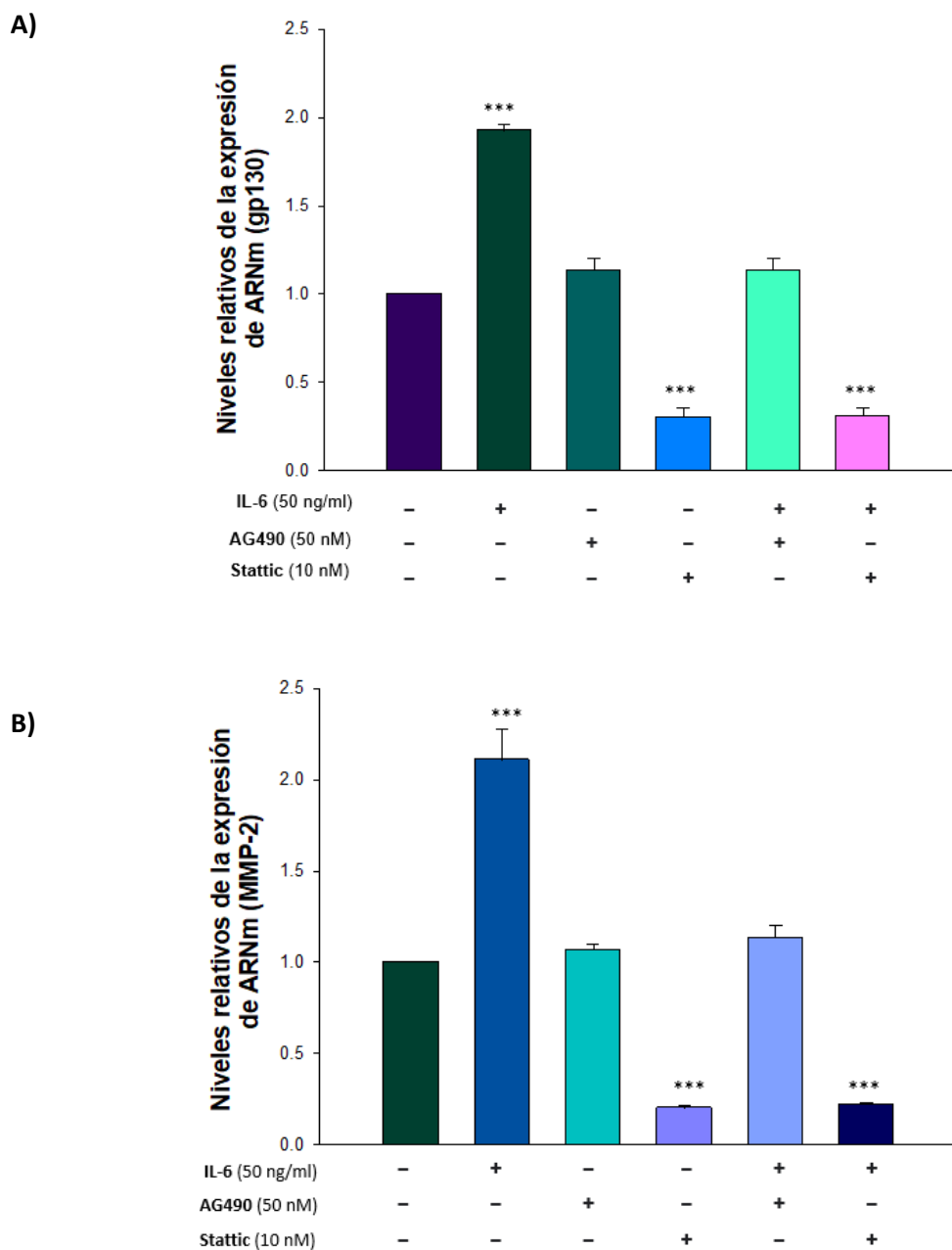
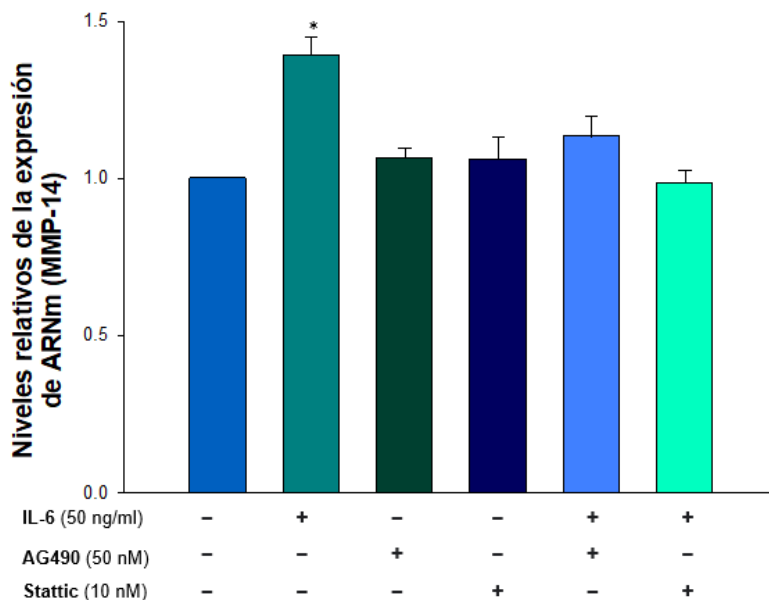


Figura 18. Efecto de los inhibidores de la vía JAK2/STAT3 sobre los niveles de expresión del ARNm que codifica para gp130 y MMP-2.

Las células U-87 MG se trataron por 48 horas con 50 ng/ml de IL-6, 50 nM de AG490 y 10 nM de Stattic, ya sea de manera individual o combinada. **A)** Análisis densitométrico de los niveles de expresión del ARNm que codifica para gp130. Las células en presencia de IL-6 aumentan la expresión de ARNm que codifica para este en aproximadamente 200%, mientras que en presencia de IL-6+AG490 y AG490 no hay diferencia significativa de la expresión de ARNm que codifica para gp130 con respecto al control, sin embargo, cuando las células están en presencia de IL-6 + Stattic y Stattic la disminución en la expresión del ARNm que codifica para IL-6R es significativa, de manera similar en ambas condiciones. **B)** Análisis densitométrico de los niveles de expresión del ARNm que codifica para MMP-2. Las células en presencia de IL-6 aumentan la expresión de ARNm que codifica para este en más del 200%, y cuando las células son tratadas con demás condiciones, el comportamiento en la expresión de ARNm que codifica para MMP-2 es similar al descrito

para IL-6R. Los datos mostrados representan la media (\pm error estándar) de una serie de tres experimentos independientes (***) = $p \leq 0.001$).

A)



B)

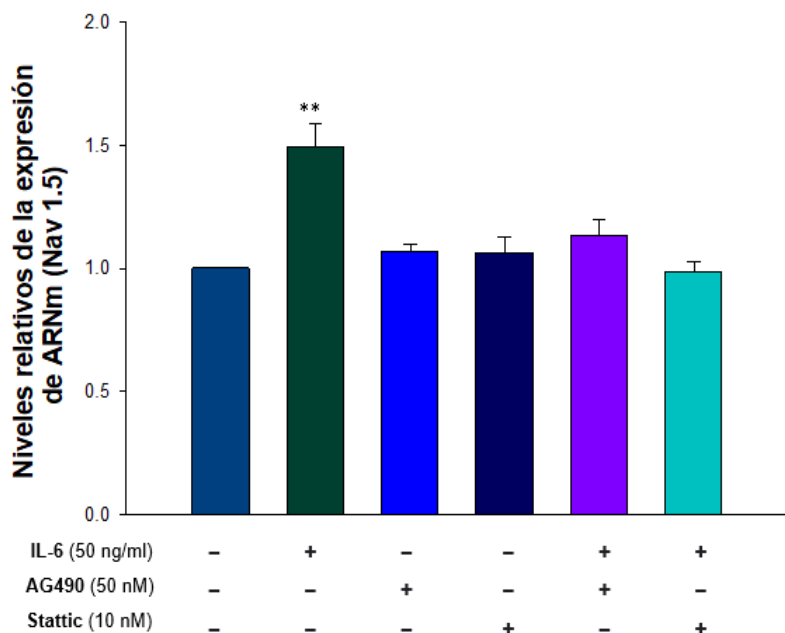


Figura 19. Efecto de los inhibidores de la vía JAK2/STAT3 sobre los niveles de expresión del ARNm que codifica para MMP-14 y Nav 1.5.

Las células U-87 MG se trataron por 48 horas con 50 ng/ml de IL-6, 50 nM de AG490 y 10 nM de Stattic, ya sea de manera individual o combinada. A) Análisis densitométrico de los niveles de expresión del ARNm que codifica para MMP-14. Las células en presencia de IL-6 aumentan la expresión de ARNm que codifica para este en aproximadamente 40%, mientras que en presencia de IL-6+AG490, AG490, IL-6 + Stattic y Stattic no

se observan diferencias significativas de la expresión de ARNm que codifica para MMP-14 con respecto al control. **B)** Análisis densitométrico de los niveles de expresión del ARNm que codifica para Nav 1.5. Las células en presencia de IL-6 aumentan la expresión de ARNm que codifica para este en un 50%, y cuando las células son tratadas con demás condiciones, no hay cambios significativos en la expresión de ARNm que codifica para Nav 1.5. Los datos mostrados representan la media (\pm error estándar) de una serie de tres experimentos independientes. (* = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$).

DISCUSIÓN

En los últimos años se ha incrementado la incidencia a nivel mundial de los tumores del sistema nervioso central. El glioblastoma multiforme es el tumor cerebral primario más común y letal del SNC, no existiendo actualmente estrategias terapéuticas eficaces para su tratamiento. La mayor parte de los ensayos clínicos que se han desarrollado a lo largo de los últimos años han obtenido un resultado negativo, en el caso del glioblastoma primario. Actualmente, el tratamiento de elección en la mayoría de los pacientes con glioblastoma primario es una combinación de temozolamida y radioterapia. Sin embargo, desde entonces no se han producido avances significativos en cuanto al tratamiento de estos tumores, ya que se conoce poco acerca de los mecanismo moleculares involucrados en la capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales, por lo que resulta de gran interés el identificar las probables señales del microambiente tumoral que favorecen el potencial invasivo de las células de glioblastoma, y de esta manera proponer nuevos blancos farmacológicos para un tratamiento más eficaz y seguro.

En la actualidad, se acepta generalmente que el microambiente inflamatorio juega un papel crítico en el desarrollo del tumor, incluido el inicio, la promoción, la invasión y la metástasis del tumor (Grivennikoy et al., 2010; Coussens & Werb, 2002). La interleucina-6 (IL-6), una citocina multifuncional, ha surgido como un contribuyente importante al microambiente tumoral. Muchos estudios han demostrado que un aumento en los niveles de expresión de IL-6 se correlaciona positivamente con un mal pronóstico en una gran variedad de tumores malignos (Chang et al., 2013; Kumari et al., 2016; Siersbæk et al., 2020). Los efectos biológicos de IL-6 son regulados por la activación de un complejo

proteico receptor presente en la membrana plasmática, y que está constituido por dos subunidades: IL-6R y gp130. Brevemente, IL-6 se une a IL-6R y desencadena la dimerización y fosforilación de gp130, lo que lleva a la activación de la tirosina cinasa de Janus (JAK). A continuación, se activan las siguientes vías de transducción de señales: a) vía JAK / STAT (transductor de señal y activadores de la transcripción); b) vía Ras / MAPK (proteína cinasa activada por mitógenos), y c) vía PI3K / Akt (Martínez-Pérez et al., 2021). Se ha identificado que la IL-6 y sus vías de señalización relacionadas contribuyen a la proliferación, migración e invasión de diversas células tumorales (Yi et al., 2012; Ara & Declerck, 2010).

En la mayoría de los tumores sólidos asociados con la hiperactivación de STAT3, el desarrollo y la progresión de la enfermedad se han atribuido a un aumento de la señalización de citocinas o a la inhibición de reguladores negativos de la vía JAK / STAT (Igelmann et al., 2019; Orlova et al., 2019). En los cánceres, la activación aberrante de STAT3, a menudo a través de niveles elevados de IL-6 en el microambiente tumoral, se asocia con un aumento de la proliferación, supervivencia y metástasis de las células tumorales, así como con la inmunosupresión de las células inmunitarias que infiltran el tumor (Johnson et al., 2020), por lo tanto, el bloqueo de la vía de señalización, a nivel de la vía JAK / STAT podría ser un enfoque terapéutico útil para la supresión tumoral. El compuesto AG490, inhibidor específico de JAK, se ha utilizado ampliamente para inhibir su actividad tanto *in vitro* como *in vivo* (Miyamoto et al., 2001; Samanta et al., 2006). Se ha demostrado que esta molécula induce a una regulación negativa de la activación gp130 en células de Schawnnoma RT4 (Seo et al., 2009) y que, en muchos tipos de células tumorales, AG490 bloquea la fosforilación de STAT3, inhibiendo la expresión de los genes diana STAT3 y favorece la inducción de apoptosis (Gurbuz et al., 2014).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la presencia crónica de IL-6 en el medio de cultivo, exagera la capacidad migratoria de las células U-87 MG, observándose un incremento significativo en los niveles de expresión del ARNm que codifica para diferentes moléculas relacionadas positivamente con la capacidad migratoria de las células tumorales, tal es el caso de las metaloproteinasas y del canal de sodio.

Las células U-87 MG expresan el ARNm que codifica para IL-6R y gp130, por lo que muy probablemente, la activación de este complejo receptor sea el primer paso para que la IL-6 favorezca la capacidad migratoria de las células U-87 MG. Como se mencionó anteriormente, la activación de este complejo receptor puede iniciar tres diferentes vías de señalización, la vía JAK / STAT es la que más ampliamente está involucrada en el desarrollo y progresión tumoral, por lo que fue considerada la primera vía de señalización a evaluar. En este sentido, se emplearon dos compuestos, AG490 para inhibir la proteína JAK y Stattic para inactivar la proteína STAT, en presencia de IL-6. La presencia de AG490 no afecta negativamente la capacidad migratoria estimulada por IL-6 en las células U-87 MG, y tampoco los niveles de expresión del ARNm que codifica para los factores asociados a la migración que elegimos analizar en este trabajo. En cambio, cuando utilizamos Stattic, los resultados obtenidos fueron totalmente opuestos a los observados en presencia de AG-490. La capacidad migratoria de las células U-87 MG se reduce de manera drástica en presencia de Stattic. Este resultado sugiere que es vital la participación de STAT3 en el efecto estimulador que ejerce IL-6 sobre la capacidad migratoria de las células de glioblastoma, pero que su activación es independiente de JAK2. Varios trabajos han reportado en células tumorales la activación de STAT3 de manera independiente a JAK 2, lo cual apoya nuestra evidencia que tenemos hasta el momento al evaluar dichos factores moleculares asociados a la migración, de que en las células de glioblastoma U-87 MG, el aumento de la capacidad

migratoria que adquieren en presencia de IL-6 está mediado por STAT3, pero que la activación de STAT3 en estas células es independiente de JAK2 (Singh et al., 2011; Looyenga et al., 2012))

Otros factores que influyen en la progresión del tumor, es la secreción de altos niveles de metaloproteinasas, que degradan la matriz extracelular y la membrana basal, lo que permite que las células cancerosas puedan migrar a sitios adyacentes o distales. Por ejemplo, la MMP-14 mejora la invasión y diseminación tumoral a través de la escisión de CD44, una glicoproteína de la superficie celular (Kajita et al., 2001), o la activación de MMP-2 y MMP-9 (Ulasoy et al., 2014). Un creciente acúmulo de evidencias indica que la MMP-14 está regulada al alza en diversas células tumorales y estromales agresivas y, por lo tanto, la MMP-14 que se origina a partir de células de microglía o glioma está emergiendo como un objetivo intervencionista potencial para la terapia del glioma (Ulasoy et al., 2014). También se ha descubierto que la IL-6 activa MMP-2 y MMP-9, lo que mejora la capacidad de invasión de las células cancerosas (Wang et al., 2006; Chernov et al., 2009). Dado que MMP-14 es un activador de MMP-2 y MMP-9, un posible mecanismo que impulsa la invasión y migración del tumor es la activación de MMP-2 y MMP-9 a través de MMP-14 inducida por IL-6.

Los resultados obtenidos muestran que IL-6 aumenta significativamente la expresión del ARNm que codifica para MMP-2, -9 y -14 de manera dependiente de la dosis y del tiempo de tratamiento, y que cuando se bloquea la vía de señalización a nivel de STAT3, disminuye de manera significativa la expresión de MMP-2, pero no afecta a la expresión de MMP-14 con respecto al control, por lo que podemos proponer entonces de manera inicial, que la vía de señalización JAK2/STAT3 no participa en la expresión de MMP-14 en la línea celular U-87 MG.

Los canales iónicos tienen una participación más reconocida en la progresión del cáncer a través de la regulación de la proliferación, migración y muerte celular. Los canales de iónicos conducen pasivamente los iones a favor de su gradiente electroquímico en respuesta a estímulos externos, responsables de conducir las corrientes eléctricas en las células nerviosas, musculares y cardíacas; sin embargo, también desempeñan funciones vitales fuera de la regulación de la excitabilidad eléctrica, tanto en células normales como tumorales. Cada vez se comprende más que alteraciones en la expresión funcional de los canales iónicos están implicados en la transformación y progresión tumoral (Fiorio & Munaron, 2014), incluida la regulación del ciclo celular (Becchetti, 2011), la migración (Turner & Sontheimer, H.2014). y la apoptosis (Burtner & Cidlowski, 2014). De manera interesante, se ha demostrado que la inhibición de algunos canales iónicos dificulta la formación y el crecimiento de tumores (Hutchings et al., 2019).

Durante la migración de las células de glioma a lo largo de los vasos sanguíneos, se requieren cambios de volumen celular para navegar por espacios intersticiales estrechos. La migración celular implica protrusión en el borde migratorio y retracción en la parte posterior del cuerpo celular, y estos pasos dependen de la actividad de múltiples canales iónicos (Schwab & Stock, 2014). La migración e invasión progresiva de células en el parénquima cerebral normal circundante es una de las características definitorias de los gliomas malignos y hace que la resección quirúrgica completa del tumor sea prácticamente imposible. Por lo tanto, es concebible que las alteraciones en la función de los canales iónicos contribuyan a la migración de las células de glioma.

Los canales de Na^+ activados por voltaje permiten selectivamente el paso de iones de Na^+ a las células, lo que da como resultado la despolarización de la membrana y desempeñan un papel fundamental en el inicio y la conducción del potencial de acción en

las células excitables, incluidas las neuronas, el corazón y el tejido esquelético (Hernández & Richards, 2021). En los últimos años, se ha informado ampliamente sobre el aumento de la expresión de los canales de sodio dependientes de voltaje en un amplio número de cánceres (Djamgoz et al., 2019; Lastraioli et al., 2015). Además, algunos cánceres expresan isoformas neonatales, como el Nav1.5, Nav1.7 y Nav1.9 neonatales (Brackenbury et al., 2007). Las células tumorales expresan diferentes isoformas del canal de sodio, por ejemplo, la subunidad Nav1.5 se expresa con mayor abundancia en las líneas celulares de cáncer de mama y de colon (Djamgoz et al., 2019), mientras que la subunidad Nav1.6 en el cáncer de cuello uterino y la subunidad Nav1.7 en el cáncer de próstata (Lopez- Charcas et al., 2021). La expresión y actividad de la subunidad Nav1.5 está exacerbada en líneas celulares con alto potencial metastásico, como la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 en comparación con línea celular MCF-7, que es débilmente metastásica (Gradek et al., 2019). Actualmente hay una gran influencia en la progresión tumoral sobre la expresión del ARNm que codifica para Nav 1.5 y está asociada con la capacidad migratoria de las células (Lopez- Charcas et al., 2021).

En la literatura no hemos encontrado reportada la expresión de ARNm que codifica para la subunidad Nav 1.5 en líneas celulares de glioblastoma. De acuerdo con esto, decidimos investigar si las células U-87 MG expresan el ARNm que codifica para la subunidad Nav 1.5. Los resultados obtenidos demuestran que la línea celular U-87 MG expresa el ARNm que codifica para la subunidad Nav 1.5, y que su nivel de expresión se incrementa cuando las células son expuestas de manera crónica a IL-6 de manera dosis-dependiente.

El bloqueo de la vía de señalización JAK / STAT no afecta los niveles de expresión del ARNm que codifica para la subunidad Nav 1.5, en presencia y ausencia de IL-6, por lo que la expresión del gen *Scn5a* que codifica para dicha subunidad, es independiente de dicha

vía de señalización, pudiendo participar cualquiera de las otras dos vías de señalización activadas por el complejo IL-6R y gp130, u otra vía (Ballou et al., 2015; Ezeani et al., 2017; Lu et al., 2020). Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que detecta la expresión de ARNm que codifica para Nav 1.5 en la línea celular U87.

Son necesarios más experimentos para la identificación de los elementos moleculares responsables de la capacidad migratoria de las células tumorales, ya que representan una excelente oportunidad para el diseño de fármacos, métodos para terapias moleculares y génicas, con el fin de mejorar el pronóstico de vida de los pacientes con glioblastoma multiforme.

CONCLUSIONES

- La presencia crónica de IL-6 exacerba la capacidad migratoria de las células U-87 MG.
- Las células U-87 MG expresan de manera basal el ARNm que codifica para IL-6, IL-6R y gp130.
- El nivel de expresión del ARNm que codifica para IL-6R y gp130 depende de la concentración de IL-6.
- Las células U-87 MG mantenidas en condiciones de cultivo estándar expresan el ARNm que codifica para diversas proteínas involucradas en la capacidad migratoria de las células tumorales, tales como MMP-2, MMP-9, MMP-14 y la subunidad α del canal de sodio Nav 1.5).
- IL-6 induce un aumento en la expresión del ARNm que codifica para los elementos moleculares asociados a la capacidad migratoria (MMP-2, MMP-9, MMP-14 y la subunidad α del canal de sodio Nav 1.5) de manera dosis dependiente.
- El efecto estimulador que ejerce IL-6 sobre la capacidad migratoria de las células U-87 MG, así como sobre la expresión del ARNm que codifica para IL-6R, gp130, y MMP-2, es mediado, al menos parcialmente por la vía de señalización Jak2/STAT3.
- El efecto estimulador que ejerce IL-6 sobre la expresión del ARNm que codifica para MMP-14 y la subunidad α del canal de sodio Nav 1.5 es independiente de la vía de señalización Jak2/STAT3.

BIBLIOGRAFÍA

Achrol, A. S., Rennert, R. C., Anders, C., Soffietti, R., Ahluwalia, M. S., Nayak, L., Peters, S., Arvold, N. D., Harsh, G. R., Steeg, P. S., & Chang, SD (2019). Brain metastases. *Nat Rev Dis Primers*. 2019 Jan 17;5(1):5.

Agnihotri, S., Burrell, K. E., Wolf, A., Jalali, S., Hawkins, C., Rutka, J. T., & Zadeh, G. (2012). Glioblastoma, a Brief Review of History, Molecular Genetics, Animal Models and Novel Therapeutic Strategies. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 61(1), 25–41.

Aguirre, C. L., Rangel, L. E., Cruz, A. D., Rodríguez, P. C., Ruano, L., Velásquez, P. L., Martínez, M. M., Garduño, E. J., & Sotelo, J. Historical distribution of central nervous system tumors in the Mexican National Institute of Neurology and Neurosurgery. Recuperado de <https://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/7786/10648>.

Ara, T., & Declerck, Y. A. (2010). Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, 46(7), 1223–1231.

Baan, R., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Islami, F., Galichet, L., & Straif, K. (2011). Carcinogenicity of radiofrequency electromagnetic fields. *Lancet Oncol*. 2011 jul;12(7):624-6.

Ballou, L. M., Lin, R. Z., & Cohen, I. S. (2015). Control of cardiac repolarization by phosphoinositide 3-kinase signaling to ion channels. *Circulation research*, 116(1), 127–137.

Becchetti, A. (2011). Ion channels and transporters in cancer. 1. Ion channels and cell proliferation in cancer. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 301, C255–C265. (10.1152/ajpcell.00047.2011).

Bondy, M. L., Scheurer, M. E., Malmer, B., Barnholtz-Sloan, J. S., Davis, F. G., Il'yasova, D., Kruchko, C., McCarthy, B. J., Rajaraman, P., Schwartzbaum, J. A., Sadetzki, S., Schlehofer, B., Tihan, T., Wiemels, J. L., Wrensch, M., & Buffler, P. A. (2008). Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer*, 113(7 Suppl), 1953–1968.

Bortner, C. D., & Cidlowski, J. A. (2014). Ion channels and apoptosis in cancer. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369(1638), 20130104.

Brackenbury, W. J., Chioni, A. M., Diss, J. K., & Djamgoz M. B. (2007). The neonatal splice variant of Nav 1.5 potentiates in vitro invasive behavior of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment*, 101(2), 149-160.

Bromberg, J., & Darnell, J.E., Jr. (2000). The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene*; 19:2468–2473.

Brown, T. J., Brennan, M. C., Li, M., Church, E. W., Brandmeir, N. J., Rakszawski, K. L., Patel, A. S., Rizk, E. B., Suki, D., Sawaya, R., & Glantz, M. (2016). Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA oncology*, 2(11), 1460–1469.

Carson, M. J., Doose, J. M., Melchior, B., Schmid, C. D., & Ploix, C. C. (2006). CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunological reviews*, 213, 48–65.

Cathcart, J. M., Banach, A., Liu, A., Chen, J., Goligorsky, M., & Cao, J. (2016). Interleukin-6 increases matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) levels via down-regulation of p53 to drive cancer progression. *Oncotarget*, 7(38), 61107–61120.

Chang, C. H., Hsiao, C. F., Yeh, Y. M., Chang, G. C., Tsai, Y. H., Chen, Y. M., Huang, M. S., Chen, H. L., Yang, P. C., Hsiung, C. A., & Su, W. C. (2013). Circulating interleukin-6 level is a prognostic marker for survival in advanced nonsmall cell lung cancer patients treated with chemotherapy. *Int J Cancer*. 1; 132:1977–1985.

Chang, C. H., Hsiao, C. F., Yeh, Y.M., Chang, G. C., Tsai, Y. H., Chen, Y.M., Huang, M. S., Chen, H. L., Li, Y. J., Yang, P. C., Chen, C. J., Hsiung, A. C., & Su, W. C. (2012). Circulating interleukin-6 level is a prognostic marker for survival in advanced nonsmall cell lung cancer patients treated with chemotherapy. *Int J Cancer*; 132:1977–1985.

Chen B., Zhang C., Wang Z., Chen Y., Xie H., Li S., Liu X., Liu Z., Chen P. (2019). Mechanistic insights into Nav1.7-dependent regulation of rat prostate cancer cell invasiveness revealed by toxin probes and proteomic analysis. *FEBS J*. 2019; 286:2549–2561.

Chernov, A. V., Sounni, N. E., Remacle, A. G., & Strongin, A. Y. (2009). Epigenetic control of the invasion-promoting MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 axis in cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 284(19), 12727–12734.

Colen, R. R., Wang, J., Singh, S. K., Gutman, D. A. & Zinn, P. O. (2015). Glioblastoma: Imaging Genomic Mapping Reveals Sex-specific Oncogenic Associations of Cell Death. *Radiology* 275, 215–227.

Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature01322>.

Culig, Z., & Pühr, M. (2012) Interleukin-6: A multifunctional targetable cytokine in human prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol*; 360:52–58.

Dethlefsen, C., Højfeldt, G., & Hojman, P. (2013). The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*; 138:657–664.

Djamgoz, M., Fraser, S. P., & Brackenbury, W. J. (2019). In Vivo Evidence for Voltage-Gated Sodium Channel Expression in Carcinomas and Potentiation of Metastasis. *Cancers*, 11(11), 1675.

Esteve, P.O., Chicoine, E., Robledo, O., Aoudjit, F., Descoteaux, A., Potworowski, E. F., & St-Pierre, Y. (2002). Protein kinase C-zeta regulates transcription of the matrix metalloproteinase-9 gene induced by IL-1 and TNF-alpha in glioma cells via NF-kappa B. *J Biol Chem*;277(38):35150–5.

Ezeani, M., & Elom, S. (2017). Necessity to evaluate PI3K/Akt signalling pathway in proarrhythmia. *Open heart*, 4(2), e000596.

Fiorio Pla, A., & Munaron, L. (2014). Functional properties of ion channels and transporters in tumour vascularization. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369(1638), 20130103.

Franco, H. C., Martinez, G. V., & Re, J. A. (2007). Biología molecular de los glioblastomas. *Neurocirugia* vol.18 (5). 373-382.

Gamma Knife del Pacífico. (2020). ¿Qué es el glioblastoma cerebral? Síntomas, causas y tratamientos. Recuperado de <https://blog.gammaknifedelpacifico.com/que-es-el-glioblastoma-cerebral-sintomas-causas-y-tratamientos>.

Gonzalez-Molina, J., Gramolelli, S., Liao, Z., Carlson, J. W., Ojala, P. M., & Lehti, K. (2019). MMP14 in Sarcoma: A Regulator of Tumor Microenvironment Communication in Connective Tissues. *Cells*, 8(9), 991.

Gradek, F., Lopez-Charcas, O., Chadet, S. et al. (2019). Sodium Channel Na_v1.5 Controls Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Invasiveness in Breast Cancer Cells Through its Regulation by the Salt-Inducible Kinase-1. *Sci Rep* 9, 18652.

Griffin, M., Khan, R., Basu, S., & Smith, S. (2020). Ion Channels as Therapeutic Targets in High Grade Gliomas. *Cancers*, 12(10), 3068.

Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883–899.

Gurbuz, V., Konac, E., Varol, N., Yilmaz, A., Gurocak, S., Menevse, S., & Sozen, S. (2014). Effects of AG490 and S3I-201 on regulation of the JAK/STAT3 signaling pathway in relation to angiogenesis in TRAIL-resistant prostate cancer cells in vitro. *Oncology letters*, 7(3), 755–763.

Haque, W., Verma, V., Butler, EB., & Teh, BS. (2017). Definitive chemoradiation at high volume facilities is associated with improved survival in glioblastoma. *J Neurooncol* 135, 173–181.

Hernandez, C. M., & Richards, J. R. (2021). Physiology, Sodium Channels. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545257/>.

Hoshida, R., Jandial, R. (2016). World Health Organization Classification of Central Nervous System Tumors: An Era of Molecular Biology. *World Neurosurg.* 2016 oct; 94:561-562.

Hutchings, C. J., Colussi, P., & Clark, T. G. (2019). Ion channels as therapeutic antibody targets. *mAbs*, 11(2), 265–296.

Igelmann, S., Neubauer, H. A., & Ferbeyre, G. (2019). STAT3 and STAT5 Activation in Solid Cancers. *Cancers*, 11(10), 1428.

Jentsch T. J. (2016). VRACs and other ion channels and transporters in the regulation of cell volume and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*; 17:293–307.

Johnson, D. E., O'Keefe, R. A., & Grandis, J. R. (2018). Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nature reviews. Clinical oncology*, 15(4), 234–248.

Kajita, M., Itoh, Y., Chiba, T., Mori, H., Okada, A., Kinoh, H., & Seiki, M. (2001). Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *The Journal of cell biology*, 153(5), 893–904.

Komori, T. (2017). The 2016 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: The Major Points of Revision. *Neurologia medico-chirurgica vol. 57,7 (2017): 301-311.*

Könnecke, H., & Bechmann, I. (2013). The role of microglia and matrix metalloproteinases involvement in neuroinflammation and gliomas. *Clinical & developmental immunology*, 2013, 914104.

Kulbacka, J., Choromańska, A., Rossowska, J., Weźgowiec, J., Saczko, J., & Rols, M. P. Cell Membrane Transport Mechanisms: Ion Channels and Electrical Properties of Cell Membranes. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2017; 227:39-58.

Kumari, N., Dwarakanath, B. S., Das, A., & Bhatt, A. N. (2016). Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumor Biol*. **37**, 11553–11572.

Lastraioli, E., Iorio, J., & Arcangeli, A. (2015). Ion channel expression as promising cancer biomarker. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848(10), 2685–2702.

Li, M., Li, S., Zhou, L., Yang, L., Wu, X., Tang, B., Xie, S., Fang, L., Zheng, S., & Hong, T. (2021). Immune Infiltration of MMP14 in Pan Cancer and Its Prognostic Effect on Tumors. *Frontiers in oncology*, 11, 717606.

Linos, E., Raine, T., Alonso, A., & Michaud, D. (2007). Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* Oct 17;99(20):1544-50.

Liu, Q., Li, G., Li, R., Shen, J., He, Q., Deng, L., Zhang, C., & Zhang, J. (2010). IL-6 promotion of glioblastoma cell invasion and angiogenesis in U251 and T98G cell lines. *J Neurooncol.*;100:165–176.

Looyenga, B. D., Hutchings, D., Cherni, I., Kingsley, C., Weiss, G. J., & Mackeigan, J. P. (2012). STAT3 is activated by JAK2 independent of key oncogenic driver mutations in non-small cell lung carcinoma. *PLoS one*, 7(2), e30820.

Lopez-Charcas, O., Pukkanasut, P., Velu, S. E., Brackenbury, W. J., Hales, T. G., Besson, P., Gomora, J. C., & Roger, S. (2021). Pharmacological and nutritional targeting of voltage-gated sodium channels in the treatment of cancers. *iScience*, 24(4), 102270.

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 neuropathol*;114(2), 97–109.

Louis, DN., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, WK., Ohgaki, H., Wiestler, OD., Kleihues, P., & Ellison, DW. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol*;131(6):803-20.

Lowery, F. J., & Yu, D. (2017). Brain metastasis: Unique challenges and open opportunities. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, 1867(1), 49–57.

Lu, A., Kamkar, M., Chu, C., Wang, J., Gaudet, K., Chen, Y., Lin, L., Liu, W., Marbán, E., & Liang, W. (2020). Direct and Indirect Suppression of Scn5a Gene Expression Mediates Cardiac Na⁺ Channel Inhibition by Wnt Signalling. *Can J Cardiol.*;36(4):564-576.

Luo, Q., Wu, T., Wu, W., Chen, G., Luo, X., Jiang, L., Tao, H., Rong, M., Kang, S., & Deng, M. (2020). The Functional Role of Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.5 in Metastatic Breast Cancer. *Frontiers in pharmacology*, 11, 1111.

Ma, Q., Long, W., Xing, C., Chu, J., Luo, M., Wang, H. Y., Liu, Q., & Wang, R. F. (2018). Cancer Stem Cells and Immunosuppressive Microenvironment in Glioma. *Frontiers in immunology*, 9, 2924.

Macciò, A., & Madeddu, C. (2013). The role of interleukin-6 in the evolution of ovarian cancer: Clinical and prognostic implications-a review. *J Mol Med (Berl)*; 91:1355–1368.

Martínez-Pérez, C., Kay, C., Meehan, J., Gray, M., Dixon, J. M., & Turnbull, A. K. (2021). The IL6-like Cytokine Family: Role and Biomarker Potential in Breast Cancer. *Journal of personalized medicine*, 11(11), 1073.

McCarthy, B. J., Rankin, K. M., Aldape, K., Bondy, M. L., Brännström, T., Broholm, H., Feychting, M., Il'yasova, D., Inskip, P. D., Johansen, C., Melin, B. S., Ruder, A. M., Butler, M. A., Scheurer, M. E., Schüz, J., Schwartzbaum, J. A., Wrensch, M. R., & Davis, F. G. (2011). Risk factors for oligodendroglial tumors: a pooled international study. *Neuro-oncology*, 13(2), 242–250.

McCarthy, B. J., Rankin, K., Il'yasova, D., Erdal, S., Vick, N., Ali-Osman, F., Bigner, D. D., & Davis, F. (2011). Assessment of type of allergy and antihistamine use in the development of glioma. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 20(2), 370–378.

Miura, T., Mitsunaga, S., Ikeda, M., Shimizu, S., Ohno, I., Takahashi, H., Furuse, J., Inagaki, M., Higashi, S., Kato, H., Terao, K., & Ochiai, A., (2015). Characterization of patients with advanced pancreatic cancer and high serum interleukin-6 levels. *Pancreas*; 44:756–763.

Miyamoto, N., Sugita, K., Goi, K., Inukai, T., Lijima, K., Tezuka, T., Kojika, S., Nakamura, M., Kagami, K., & Nakazawa, S. (2001). The JAK2 inhibitor AG490 predominantly abrogates the growth of human B-precursor leukemic cells with 11q23 translocation or Philadelphia chromosome. *Leukemia*; 15:1758–1768.

Orlova, A., Wagner, C., de Araujo, E. D., Bajusz, D., Neubauer, H. A., Herling, M., Gunning, P. T., Keserü, G. M., & Moriggl, R. (2019). Direct Targeting Options for STAT3 and STAT5 in Cancer. *Cancers*, 11(12), 1930.

Ostrom, Q. T., Bauchet, L., Davis, F. G., Deltour, I., Fisher, J. L., Langer, C. E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J. A., Turner, M. C., Walsh, K. M., Wrensch, M. R., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2014). The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro-oncology*, *16*(7), 896–913.

Ostrom, Q. T., Cioffi, G., Gittleman, H., Patil, N., Waite, K., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2019). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro-oncology*, *21*(Suppl 5), v1–v100.

Palomino, D. C., & Marti, L. C. (2015). Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, *13*(3), 469–473.

Panyi, G., Beeton, C., & Felipe, A. (2014). Ion channels and anti-cancer immunity. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, *369*(1638), 20130106.

Puente, J., & de Velasco, G. (2019). ¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla? Sociedad Española de Oncología Médica. Recuperado de <https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla>

Rose-John S. (2012). IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *International journal of biological sciences*, *8*(9), 1237–1247.

Rose-John S. (2012). IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *International journal of biological sciences*, *8*(9), 1237–1247.

Rose-John S. (2020). Interleukin-6 signalling in health and disease. *F1000Research*, *9*, F1000 Faculty Rev-1013.

Samanta, A. K., Lin, H., Sun, T., Kantarjian, H., & Arlinghaus, R. B. (2006) Janus kinase 2: a critical target in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res* 2006; *66*:6468–6472.

Schindler, C., & Plumlee, C. (2008). Inteférons pen the JAK-STAT pathway. *Seminars in cell & developmental biology*, *19*(4), 311–318.

Schwab, A., & Stock, C. (2014). Ion channels and transporters in tumour cell migration and invasion. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369(1638), 20130102.

Secretaría de Salud Pública México. (2017). Cáncer, tercera causa de muerte en México. Recuperado de <https://www.gob.mx/salud/prensa/318-cancer-tercera-causa-de-muerte-en-mexico>.

Seo IA, Lee HK, Shin YK, et al. (2009). Janus Kinase 2 Inhibitor AG490 Inhibits the STAT3 Signaling Pathway by Suppressing Protein Translation of gp130. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*:131-138.

Seo, I. A., Lee, H. K., Shin, Y. K., Lee, S. H., Seo, S. Y., Park, J. W., & Park, H. T. (2009). Janus Kinase 2 Inhibitor AG490 Inhibits the STAT3 Signaling Pathway by Suppressing Protein Translation of gp130. *The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 13(2), 131–138.

Shaftel, S. S., Carlson, T. J., Olschowka, J. A., Kyrkanides, S., Matousek, S. B., & O'Banion, M. K. (2007). Chronic interleukin-1beta expression in mouse brain leads to leukocyte infiltration and neutrophil-independent blood brain barrier permeability without overt neurodegeneration. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(35), 9301–9309.

Shlyakhtina, Y., Moran, K. L., & Portal, M. M. (2021). Genetic and Non-Genetic Mechanisms Underlying Cancer Evolution. *Cancers*, 13(6), 1380.

Shuai, K. (2000). Modulation of STAT signaling by STAT- interacting proteins. *Oncogene* 19, 2638-2644.

Siersbæk, R., Scabia, V., Nagarajan, S., Chernukhin, I., Papachristou, E. K., Broome, R., Johnston, S. J., Joosten, S., Green, A. R., Kumar, S., Jones, J., Omarjee, S., Alvarez-Fernandez, R., Glont, S., Aitken, S. J., Kishore, K., Cheeseman, D., Rakha, E. A., D'Santos, C., Zwart, W., ... Carroll, J. S. (2020). IL6/STAT3 Signaling Hijacks Estrogen Receptor α Enhancers to Drive Breast Cancer Metastasis. *Cancer cell*, 38(3), 412–423.e9.

Singh R. (2011). Jak2-Independent Activation of Stat3 by Intracellular Angiotensin II in Human Mesangial Cells. *Journal of signal transduction*, 2011, 257862.

Stupp, R., Mason, WP., van den Bent, MJ., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, MJ., Belanger, K., Brandes, AA., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, RC., Ludwin, SK., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, JG., Eisenhauer, E., & Mirimanoff, RO. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 10;352(10):987-96.

Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A., Read, W., Steinberg, D., Lhermitte, B., Toms, S., Idbaih, A., Ahluwalia, M. S., Fink, K., Di Meco, F., Lieberman, F., Zhu, J. J., Stragliotto, G., Tran, D., Brem, S., Hottinger, A., Kirson, E. D., Lavy-Shahaf, G., Weinberg, U., ... Ram, Z. (2017). Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 318(23), 2306–2316.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, RL., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2020). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209-249.

Thomas, S. J., Snowden, J. A., Zeidler, M. P., & Danson, S. J. (2015). The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. *British journal of cancer*, 113(3), 365–371.

Trivedi, S., & Starz-Gaiano, M. (2018). Drosophila Jak/STAT Signaling: Regulation and Relevance in Human Cancer and Metastasis. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 4056.

Turner, K. L., & Sontheimer, H. (2014). Cl⁻ and K⁺ channels and their role in primary brain tumour biology. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369(1638), 20130095.

Ulasov, I., Yi, R., Guo, D., Sarvaiya, P., & Cobbs, C. (2014). The emerging role of MMP14 in brain tumorigenesis and future therapeutics. *Biochim Biophys Acta.* Aug;1846(1):113-20. doi: 10.1016/j.bbcan.2014.03.002. PMID: 24657728

Venkatesh, H. S., Morishita, W., Geraghty, A. C., Silverbush, D., Gillespie, S. M., Arzt, M., Tam, L.T., Espenel, C., Ponnuswami, A., Ni, L., Woo, P. J., Taylor, K. R., Agarwal, A., Regev, A., Brang, D., Vogel, H., Hervey-Jumper, S., Bergles, D. E., Suva, M. L., Malenka, R. C., & Monje, M. (2019). Electrical and synaptic integration of glioma into neural circuits. *Nature.*; 573:539–545.

Verkhratsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. *Physiological reviews*, 98(1), 239–389.

Verkhratsky, A., Ho, M. S., Zorec, R., & Parpura, V. (2019). The Concept of Neuroglia. *Advances in experimental medicine and biology*, 1175, 1–13.

Verkhratsky, A., Zorec, R., & Parpura, V. (2017). Stratification of astrocytes in healthy and diseased brain. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 27(5), 629–644.

Vesely, M. D, Kershaw, M. H., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol.* 29:235-71.

Waldner, M., J, Foersch, S., & Neurath, M. F. (2012). Interleukin-6-a key regulator of colorectal cancer development. *Int J Biol Sci.*; 8:1248–1253.

Wang, J., Ou, S. W., & Wang, Y. J. (2017). Distribution and function of voltage-gated sodium channels in the nervous system. *Channels (Austin, Tex.)*, 11(6), 534–554.

Wang, M., Wang, T., Liu, S., Yoshida, D., & Teramoto, A. (2003). The expression of matrix metalloproteinase-2 and-9 in human gliomas of different pathological grades. *Brain Tumor Pathology*, 20(2), 65–72.

Wang, X., Lee, S. O., Xia, S., Jiang, Q., Luo, J., Li, L., Yeh, S., & Chang, C. (2013). Endothelial cells enhance prostate cancer metastasis via IL-6→androgen receptor→TGF-β→MMP-9 signals. *Molecular cancer therapeutics*, 12(6), 1026–1037.

Wei, L. H., Kuo, M. L., Chen, C. A., Chou, C. H., Lai, K.B., Lee, C. N., & Hsieh, C. Y. (2003). Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene*; 22:1517–1527.

Weissenberger, J., Loeffler, S., Kappeler, A., Kopf, M., Lukes, A., Afanasieva, T. A., Aguzzi, A., & Weis, J. (2004). IL-6 is required for glioma development in a mouse model. *Oncogene.*; 23:3308–3316.

West, A. J., Tsui, V., Stylli, S. S., Nguyen, H., Morokoff, A. P., Kaye, A. H., & Luwor, R. B. (2018). The role of interleukin-6-STAT3 signalling in glioblastoma. *Oncology letters*, 16(4), 4095–4104.

Wigertz, A., Lönn, S., Schwartzbaum, J., Hall, P., Auvinen, A., Christensen, H. C., Johansen, C., Kjaer, L., Salminen, T., Schoemaker, M.J., Swerdlow, A. J., Tynes, T., & Feychting, M. (2007). Allergic conditions and brain tumor risk. *Am J Epidemiol.* Oct 15;166(8):941-50.

Yang, M., James, A. D., Suman, R., Kaspruwicz, R., Nelson, M., O'Toole, P. J., & Brackenbury, W. J. (2020). Voltage-dependent activation of Rac1 by Na_v 1.5 channels promotes cell migration. *Journal of cellular physiology*, 235(4), 3950–3972.

Yi, H., Cho, H. J., Cho, S. M., Jo, K., Park, J. A., Kim, N. H., Amidon, G. L., Kim, J. S., & Shin, H. C. (2012). Blockade of interleukin-6 receptor suppresses the proliferation of H460 lung cancer stem cells. *Int Oncol.*41:310-316

Yu, Q., & Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & development*, 14(2), 163–176.

