



# Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Instituto de Fisiología  
Maestría en Ciencias Fisiológicas



Laboratorio de Neuroendocrinología



---

*Efecto de Interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) sobre la expresión de la proteína anti-apoptótica BIRC3 en células de glioblastoma multiforme humano*

---

## Tesis

Que para obtener el grado de:  
**Maestra en Ciencias Fisiológicas**

Presenta:

**LBM Selene Cruz Cantero**

Director de tesis:

**D.C. Eduardo Monjaraz Guzmán**

Asesores:

**D.C María de Jesús Gómez Villalobos**

**D.C Citlalli Gamboa Esteves**

Página 1 | 67

Mayo 2022

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado mediante la beca como alumna de Maestría con número de CVU 1031452

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por el apoyo brindado para la conclusión de este proyecto

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres por ser una parte fundamental de todos mis logros, por apoyarme y estar al pendiente siempre de mí, por animarme a seguir esforzándome todos los días. A mis hermanos, Fer, Ana e Iván por ser un ejemplo a seguir, a mi sobrino Miguelito por brindarme siempre momentos agradables, al gordito por darle tranquilidad, felicidad y bienestar a mi vida.

Agradezco al Dr. Eduardo Monjaraz por guiarme durante el desarrollo de mi tesis, por brindarme su conocimiento, por su paciencia, por abrirme las puertas de su laboratorio y fomentar en mí el amor a la investigación científica, gracias por tan buenos momentos llenos de risas, pero también de trabajo en su laboratorio.

A Angy y Nelly por enseñarme la importancia del trabajo en equipo, por su amistad y sinceridad, por estar siempre tan amables y dispuestas a acompañarme o ayudarme cuando las cosas no salían tan bien y sobre todo por esos momentos de felicidad y diversión.

A July por siempre cuidar de mis células, a Max por siempre tener que decirme y hacerme reír.

A mis compañeros de laboratorio Raúl, Irma, David, Rubén y Eve.

A Bren y Jessi que a pesar de la distancia siempre han estado al pendiente tanto de mí como de mi formación académica, por echarme porras y hacerme ver que todo pasa por algo, por compartir risas, llantos y dudas existenciales, por ser las personas que son y sobre todo por su amistad.

A Paty y Ale por esas charlas tan largas pero terapéuticas que me hacen recapacitar, por estar siempre que las necesito.

Quiero hacer un agradecimiento especial a mis revisoras: Dra. María de Jesús Gómez Villalobos y Dra. Citlalli Gamboa Esteves por su invaluable tiempo y apoyo en la realización de este proyecto.

# INDICE

ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN .....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
Cáncer de sistema nervioso y cerebro.....	9
Glioblastoma .....	12
Glioblastoma y microambiente tumoral .....	15
IL-1 $\beta$ en cáncer.....	17
Apoptosis.....	19
Proteínas inhibidoras de la apoptosis .....	23
BIRC3 en cáncer .....	28
Tratamientos contra glioblastoma .....	29
Miméticos de Smac .....	30
Miméticos de Smac en combinación con quimioterapia .....	32
JUSTIFICACIÓN .....	33
HIPÓTESIS .....	34
OBJETIVO GENERAL .....	34
OBJETIVOS PARTICULARES.....	34
MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
Modelo celular U87MG .....	35
Reactivos .....	36
Ensayo de RT-PCR de punto final .....	36
a) Extracción de ácido ribonucleico total (ARN <sub>T</sub> ).....	36
b) Cuantificación de ARN.....	37
c) Síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario (cADN).....	37
d) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	38
e) Separación electroforética de los productos de PCR .....	39
f) Densitometría.....	40
Cuento celular .....	40
Análisis estadístico .....	40
RESULTADOS .....	41
DISCUSIÓN .....	53
CONCLUSIONES .....	59
BIBLIOGRAFIA .....	60

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AIF</b>	Factor inductor de apoptosis, por sus siglas en ingles
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>BHE</b>	Barrera hematoencefálica
<b>BIRC3</b>	IAP baculoviral que contine 3 repeticiones, por sus siglas en ingles
<b>CARD</b>	Dominio de reclutamiento de caspasa, por sus siglas en ingles
<b>CCECC</b>	Cáncer de células escamosas de cabeza y cuello
<b>CHC</b>	Carcinoma hepatocelular
<b>cIAP</b>	Proteína inhibidora de la apoptosis celular
<b>COSAG</b>	Cáncer de ovario seroso de alto grado
<b>CPCNP</b>	Cáncer de pulmón de células no pequeñas, por sus siglas en ingles
<b>CVB</b>	Cáncer de vesícula biliar
<b>DAMP</b>	Patrones moleculares asociados a daño, por sus siglas en ingles
<b>DISC</b>	Complejo de señalización inductor de muerte, por sus siglas en ingles
<b>FADD</b>	Dominio de muerte asociado a Fas, por sus siglas en ingles
<b>FasL</b>	Ligando Fas, por sus siglas en ingles
<b>GBM</b>	Glioblastoma multiforme
<b>IAP</b>	Proteína inhibidora de la apoptosis, por sus siglas en ingles
<b>IBM</b>	Motivos de unión a IAP, por sus siglas en ingles
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 beta
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>INNN</b>	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>LRR</b>	Dominio rico en leucina, por sus siglas en ingles
<b>MAPK</b>	Proteína cinasa activada por mitógeno, por sus siglas en ingles
<b>MGMT</b>	Metil guanina metil transferasa, por sus siglas en ingles
<b>MSDC</b>	Células supresoras derivadas de mieloides, por sus siglas en ingles
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear kappa B, por sus siglas en ingles

<b>NOD</b>	Proteínas del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos,
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintasa, por sus siglas en ingles
<b>PAMP</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos, por sus siglas en ingles
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en ingles
<b>PDGF</b>	Factor derivado de plaquetas, por sus siglas en ingles
<b>PDGFR</b>	Receptor del factor derivado de plaquetas, por sus siglas en ingles
<b>RB1</b>	Gen de retinoblastoma, por sus siglas en ingles
<b>RIP1</b>	Proteína quinasa que interactúa con el receptor, por sus siglas en ingles 1
<b>SM</b>	Miméticos de Smac, por sus siglas en ingles
<b>Smac</b>	Segundo activador derivado de mitocondrias, por sus siglas en ingles
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>STAT3</b>	Transductor de señal y activador de la transcripción 3, por sus siglas en ingles
<b>TA</b>	Tumor astrocítico
<b>TLR</b>	Receptores tipo Toll, por sus siglas en ingles
<b>TMZ</b>	Temozolamida
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral, por sus siglas en ingles
<b>TRADD</b>	Dominio de muerte asociado al receptor de TNF, por sus siglas en ingles
<b>TRAF</b>	Factores asociados al receptor TNF, por sus siglas en ingles
<b>TRAIL</b>	Ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF
<b>TSCN</b>	Tumor del sistema nervioso central
<b>Ub</b>	Ubiquitina

## RESUMEN

El glioblastoma multiforme (GBM) es la forma más frecuente y maligna de tumor cerebral primario en los humanos, con pronóstico grave debido a que la supervivencia promedio luego de la terapia convencional (cirugía, radio y quimioterapia) es de tan solo 15 a 18 meses. Las evidencias científicas consideran a los mediadores y efectores celulares de la inflamación como constituyentes importantes del microambiente tumoral, que pueden estar influyendo sobre el desarrollo y progresión tumoral. Por ejemplo, niveles elevados de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) contribuyen a la proliferación, progresión y evasión de la apoptosis en diferentes tipos de cáncer. Además, se ha observado que los pacientes con glioblastoma comienzan a desarrollar resistencia a la temozolamida después de cierto tiempo de tratamiento. La temozolamida es el fármaco de primera línea utilizado para el tratamiento de glioblastoma humano. Se ha propuesto que la quimio-resistencia a este fármaco, se debe al menos en parte, a la sobre-expresión de proteínas anti-apoptóticas, como BIRC3. El nivel de expresión de dicha proteína se correlaciona positivamente con la quimio-resistencia que presentan los pacientes de glioblastoma, así como a un mal pronóstico de supervivencia. Con base a estos antecedentes, el propósito general del presente trabajo es definir si el efecto estimulador que ejerce IL-1 $\beta$  sobre la capacidad proliferativa y la capacidad de quimio-resistencia a temozolamida, por parte de las células U87MG, derivadas de glioblastoma multiforme, se debe a un aumento en la expresión de la proteína inhibidora de la apoptosis BIRC3. Los resultados obtenidos muestran de manera clara, que la presencia crónica de IL-1 $\beta$  en el medio de cultivo de las células U87MG, induce un incremento en la expresión del ARNm que codifica para BIRC3, y que este efecto es dependiente tanto de la concentración de la citocina como de la duración del tratamiento. También se observó, que IL-1 $\beta$  reduce el efecto citotóxico que ejerce la temozolamida, apoyando la propuesta de que esta citocina favorece la quimo-resistencia de las células de glioblastoma. La presencia del mimético de Smac, AZD5582, aumenta de manera significativa la expresión del ARNm que codifica para BIRC3, y que se ve potenciado, en presencia de IL-1 $\beta$ , probablemente como una respuesta compensatoria para contrarrestar el efecto apoptótico inducido por AZD5582. La presencia de IL-1 $\beta$  estimula, además la expresión del ARNm que codifica para survivina, IL-6 así como de la propia IL-1 $\beta$ .

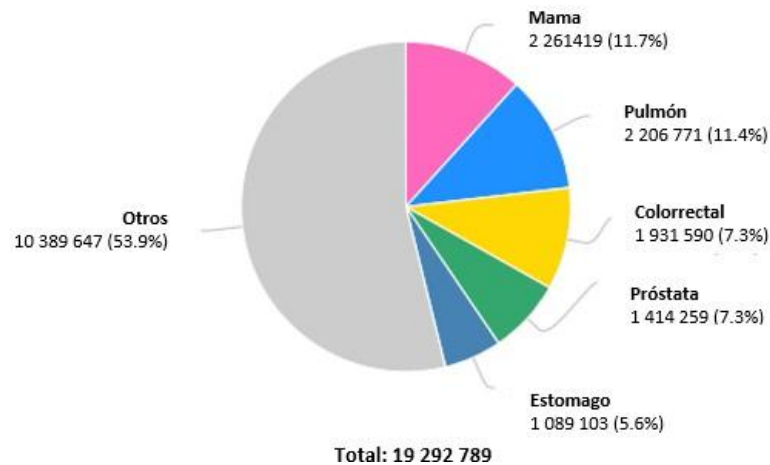
# INTRODUCCIÓN

Actualmente, el cáncer es considerado como un desorden de células que se dividen anormalmente, lo que conduce a la formación de agregados celulares, tumores, que crecen dañando tejidos y órganos vecinos, nutriéndose del organismo y alterando su fisiología. Además, estas células pueden migrar e invadir tejidos lejanos, donde encuentran un nicho apropiado para continuar su crecimiento, proceso conocido como metástasis, siendo la principal causa de muerte de los individuos afectados (OMS, 2018; Mitrus *et al.*, 2012). Resulta evidente, que esta enfermedad surge a través de un proceso mutagénico de varios pasos, durante el cual las alteraciones genéticas impulsan la transformación progresiva de células humanas normales en derivados altamente malignos que se generan como consecuencia del daño al genoma (Bertram, 2000) y por el cual, las células cancerosas adquieren un conjunto común de propiedades: que incluyen un potencial ilimitado de proliferación, autosuficiencia en las señales de crecimiento y resistencia a las señales antiproliferativas y apoptóticas, entre otras características (Hanahan & Weinberg, 2011).

El cáncer, es una de las principales patologías que afectan a la población a nivel mundial. En el año 2020, GLOBOCAN reportó **19.2 millones** de nuevos casos y **9.9 millones** de muertes ocasionadas por este padecimiento (figura 1), observándose un incremento significativo en los países en vías de desarrollo (GLOBOCAN 2020). Las predicciones sugieren que para el año 2050, la incidencia será de **29.5 millones** (WHO, 2020; IARC, 2020).

En México, por su parte, la magnitud de los efectos del cáncer en la salud no es muy diferente al panorama mundial. En el año 2020 se diagnosticaron alrededor de **195 499** nuevos casos y se reportó la muerte ocasionada por este padecimiento de **90 222** personas (WHO, 2020), posicionándolo como la tercera causa de muerte en nuestro país representando el 9% de las defunciones, únicamente por debajo de las enfermedades cardíacas (19.2%) y la diabetes mellitus (14.8%) (INEGI, 2020).

## Estadística a nivel mundial de nuevos casos de cáncer en 2020, ambos sexos, todas las edades



**Figura 1| Estadística del cáncer en el mundo** Los tipos de cáncer con mayor incidencia en la población mundial en ambos sexos y de todas las edades es: cáncer de mama (11.7%), cáncer de pulmón (11.4%), cáncer colorrectal (10 %), cáncer de próstata (7.3%), cáncer de estómago (5.6 %) y otros tipos de cáncer (53.9%). Estimaciones por cada **100 000** habitantes (Tomada y modificada de IARC, 2020).

## Cáncer de sistema nervioso y cerebro

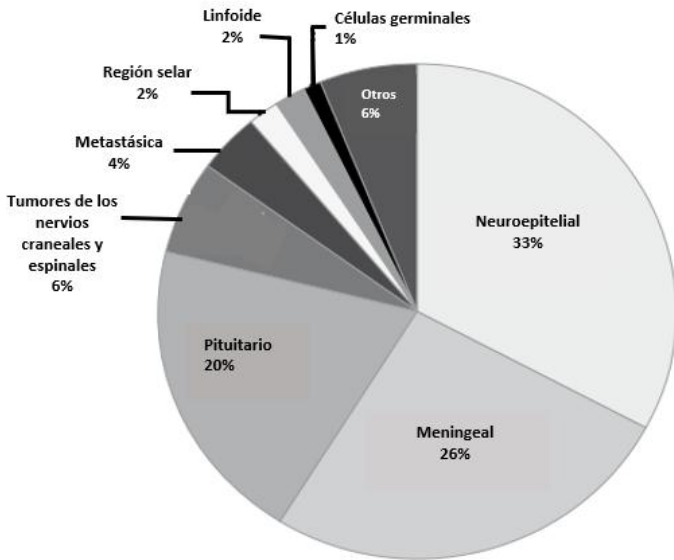
Dentro de todos los tipos de cáncer en México, el cáncer de sistema nervioso y cerebro representa el 1.6%, donde el número de nuevos casos se estima que fue de **3 189** personas y de **2 571** muertes por año, observándose claramente que es uno de los tipos de cáncer más agresivos y letales (IARC,2020).

Los gliomas son la forma más común de neoplasia del sistema nervioso central (SNC) (Fassil & Mohammed, 2017) que muestran diferenciación glial. Consisten en un espectro de tipos de cáncer de grados variados de neoplasia que generan tumores infiltrativos muy difusos que afectan el tejido cerebral circundante, y que se clasifican de acuerdo con su presunta célula de origen (Hollan, 2000), encontrando: astrocitomas, oligodendrogliomas, gliomas mixtos (oligoastrocitomas),ependimomas, tumores de los plexos coroides y variantes menos comunes. Dentro de todos estos tipos, los astrocitomas comprenden el 75% del total (CBTRUS, 2006).

El sistema de estadificación más aceptado para los gliomas es el establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que los clasifica en 4 grados con base a criterios histopatológicos. El grado I se reserva para las variantes histológicas específicas, relativamente benignas que presentan solo hiper celularidad, son de crecimiento lento con pronóstico excelente después de la resección quirúrgica. Los que poseen solo una característica de células anormales son los grado II, en este grupo además de presentar hiper celularidad existen gemistocitos o bien puede tratarse de un glioma mixto, se considera al glioma de grado I y II como gliomas de bajo grado (Lang *et al.*, 2006), mientras que se les considera de alto grado a los gliomas III o IV (glioblastoma) debido a que son altamente malignos e invasivos (Kleihues *et al.*, 1999)

De acuerdo con un estudio realizado por el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) de México se informó la distribución de **12,776** casos de tumores de Sistema Nervioso Central (TSNC) atendidos en el INNN en un periodo de 50 años. Reportándose que el 33% de los TSNC fueron provenientes del tejido neuroepitelial (figura 2), 67% de los cuales corresponden a tumores astrocíticos (TA) (Aguirre-Cruz, *et al.*, 2016) (tabla 1). Para el año 2020 se realizó un estudio más detallado sobre estos TA atendidos en este mismo instituto, pero de **2,287** casos, correspondientes a pacientes con edad entre 15 y 96 años y diagnóstico histológico confirmado de TA, encontrando que **1,356** casos se desarrollaron en hombres y **931** en mujeres con una relación de hombre/mujer de **1.46**. También se observó que existe un mayor número de casos en mujeres en el rango de edad de 45-49 años y de 50-59 años en el caso de los hombres (figura 3). Los TA más frecuentes en todas las edades fueron glioblastoma multiforme (GBM) los cuales se incrementaron en frecuencia conforme aumento la edad (Aguirre-Cruz, *et al.*, 2020) (figura 4).

Frecuencias porcentuales de tumores del sistema nervioso central en el INNN de México (1965-2014)

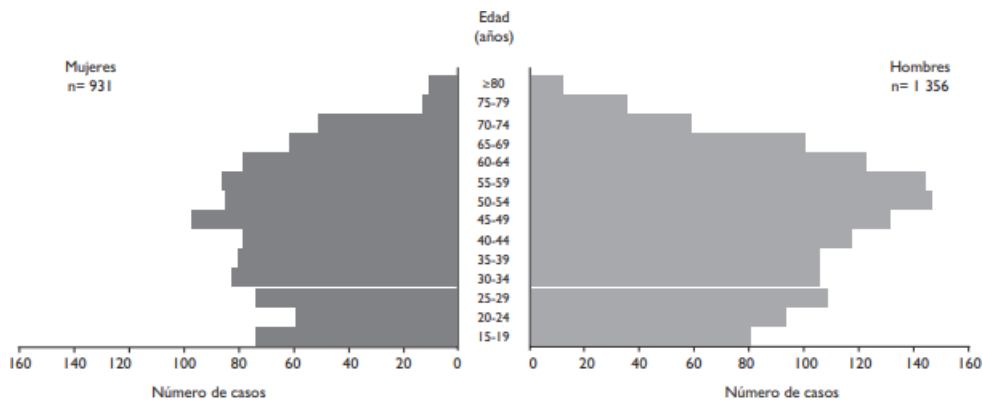


**Figura 2| Frecuencias porcentuales de tumores del Sistema nervioso central en el INNN de México.** Los tipos de tumores del sistema nervioso central con mayor incidencia son de origen: neuroepitelial (33%), meningeal (26%), pituitario (20%), craneal y nervios paraespinales (6%), metastásicos (4%), región selar (2%), linfoide (2%) y de células germinales (1%). Imagen tomada y modificada de Aguirre-Cruz *et al.*, 2016

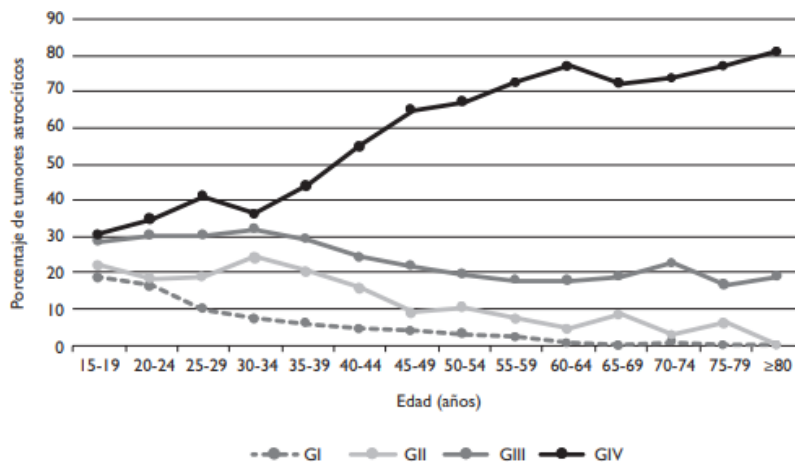
Tipos de tumores del tejido neuroepitelial atendidos en el INNN de México de 1965-2014)

Tipo de tumor	Numero	Porcentaje
Astrocitoma	1 413	66.7
Oligodendroglioma	94	2.3
Oligoastrocitomas	378	9.5
Ependimoma	157	4.3
Plexo coroideo	389	6.5
Otros tumores neuroepiteliales	179	4.3
Neuroglia	49	1.7
Región pineal	14	0.8
Embrionarios	30	3.2
<b>Total</b>	<b>3 217</b>	<b>100</b>

**Tabla 1| Tipos de tumores del tejido neuroepitelial atendidos en el INNN de México de 1965-2014.** Los tipos de tumores de origen neuroepitelial son: astrocitomas (66.7%), oligodendrogliomas (2.3%), oligoastrocitomas (9.5%), Ependimales (4.3%), del plexo coroideo (6.5%), neuroglial (1.7%), región pineal (0.8%), embrionario (3.2%) y otros (4.3%) (Tabla tomada y modificada de Aguirre-Cruz *et al.*, 2016).



**Figura 3| Distribución por edad y género de los tumores astrocíticos en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía en México de 1965-2014.** Se describe la distribución de 2 287 casos de los cuales 1 356 se desarrollaron en hombres y 931 en mujeres. Hubo un mayor número de casos en mujeres de 45-49 años mientras que en hombres fue de 50-54 años (Imagen tomada de Aguirre-Cruz *et al.*, 2020).



**Figura 4|Frecuencia porcentual de 2,287 tumores astrocíticos por edad y su grado de malignidad de 1965-2014.** La clasificación se realizó de acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud. Se observa que el glioblastoma multiforme (GIV) es el tumor astrocíticos más frecuente en todas las edades y que estos se ven incrementados conforme aumenta la edad (Imagen tomada de Aguirre-Cruz *et al.*, 2020).

## Glioblastoma

El glioblastoma (GBM) es el tumor cerebral primario más común y agresivo de origen astrocítico glial, compone el 60% de los gliomas malignos, la edad promedio al momento del diagnóstico es de 64 años, aunque el rango en la edad al momento de su aparición es algo amplio. La proporción de incidencia del GBM es mayor en los hombres en comparación con las mujeres (Ohgaki & Kleihues, 2005) así como en caucásicos a diferencia con otras etnias (Thakkar *et al.*, 2014).

Se han descrito por lo menos dos formas clínicas y genéticas distintas del GBM. Los GBM primarios o también llamados *de novo* representan la mayoría de los casos (>90%) el cual se presentan en pacientes de edad avanzada después de una breve historia clínica con signos neurológicas que aumentan rápidamente y se desarrollan sin ninguna evidencia clínica o histológica de una lesión precursora previa menos maligna (Ohgaki & Kleihues, 2009). Los glioblastomas secundarios son menos frecuentes (<10%) afectan a pacientes más jóvenes y surgen más lentamente a partir de un astrocitoma anaplásico (AA) preexistente (grado III según la OMS) o un astrocitoma difuso de bajo grado (grado II) (Ohgaki & Kleihues, 2011),

tienen menor grado de necrosis, se localizan preferentemente en el lóbulo frontal y tienen un pronóstico significativamente mejor (Ohgaki & Kleihues, 2011).

Histológicamente los glioblastomas primarios y secundarios son en gran parte indistinguibles, pero difieren en sus perfiles genéticos y epigenéticos. Los indicadores genéticos decisivos del glioblastoma primario son la sobreexpresión del receptor de factor del crecimiento epidérmico (EGFR), mutación de PTEN y la pérdida total del cromosoma 10 (Ohgaki *et al.*, 2007; Fujisawa *et al.*, 2000). Mientras que las alteraciones genéticas más comunes en los glioblastomas secundario son mutaciones IDH1/2 que están ausentes en los glioblastomas primarios y que están asociadas con un fenotipo de hipermetilación así como mutaciones en TP53 y pérdida del brazo largo del cromosoma 19 (19q) (Ohgaki *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2000).

## **Factores de riesgo para tumores cerebrales**

Existen muchos factores de riesgo estudiados y relacionados con la aparición de tumores cerebrales, sin embargo, sólo en algunos de ellos se ha podido establecer una relación real como lo son la radiación ionizante, susceptibilidad genética y alergias (McNeill, 2016).

- **Radiación ionizante**

La radiación ionizante es un factor de riesgo ambiental establecido para el desarrollo de gliomas. Estudios de seguimiento a poblaciones expuestas a radiación por motivos médicos durante la niñez (*tinea capitis*, hemangiomas cutáneos, hipertrofia amigdalina, linfoma, leucemia u otros tumores cerebrales primarios en niños) han demostrado estar relacionada con la aparición de tumores cerebrales años posteriores a la radioterapia (Sadetzki *et al.*, 2005). Los tumores radio-inducidos más frecuentes son los meningiomas, gliomas y schwannomas (Neglia *et al.*, 2006). Esta asociación también se observó en personas expuestas a bombas atómicas y pruebas de armas nucleares (Bondy *et al.*, 2008)

- Susceptibilidad genética

Un pequeño subconjunto de menos del 1% de los glioblastomas se asocia con síndromes de cáncer hereditario, incluidos los tipos de neurofibromatosis 1 y 2, el síndrome de Turcot y el síndrome de LiFraumeni, generalmente secundarios al diagnóstico de gliomas de grado II o III de la OMS (Ohgaki *et al.*, 2011). Rara vez se observan antecedentes familiares de glioma, pero cuando están presentes, se asocian con un aumento en el doble de riesgo de desarrollar glioma (Shete *et al.*, 2009).

- Alergias y relaciones inmunodependientes

Existe evidencia de que las alergias y condiciones autoinmunes están inversamente relacionadas con el riesgo de aparición de gliomas. Pacientes con asma, dermatitis atópica y rinitis alérgica tienen menos riesgo en la aparición de glioblastoma (Wiemels *et al.*, 2002).

La razón principal por la que existe una alta tasa de mortalidad de los pacientes con glioblastoma multiforme es por la alta capacidad invasiva que presentan las células tumorales, esta condición se ve favorecida por la presencia de citocinas proinflamatorias presentes en el microambiente tumoral. Dicha condición inflamatoria es originada por la reactividad de las células astrogiales.

Típicamente, la respuesta inflamatoria consiste en la activación del sistema inmune luego de una lesión en la que el cuerpo intenta reparar el tejido dañado. Las lesiones pueden ser de tipo mecánico, químico, físico o biológico (presencia de virus o microorganismos). Este proceso se presenta de forma aguda y crónica (Fundamentals of inflammation, 2010), y es regulada por el sistema inmunitario innato y el adaptativo.

Las interleucinas proinflamatorias, son proteínas secretadas por las células del sistema inmune innato y adquirido en respuesta a microorganismos y otros antígenos, estimulan no solamente el crecimiento y diferenciación de los linfocitos y monocitos, sino también la supervivencia de las células tumorales al favorecer la expresión de proteínas antiapopticas, y reducir la

expresión de proteínas apoptóticas. Es indiscutible la participación del sistema inmune, tanto innato como adaptativo, en la progresión y desarrollo tumoral.

## **Glioblastoma y microambiente tumoral**

El cerebro se conoce como un órgano inmunológico privilegiado debido a: 1) la naturaleza restrictiva de la barrera hematoencefálica (BHE) que impide que las células inmunitarias y los moduladores inmunitarios derivados del suero accedan a él (Wilson *et al.*, 2010), 2) la ausencia de drenaje linfático convencional que restringe el tráfico de antígenos a los ganglios linfáticos (Engelhardt *et al.*, 2016), 3) escasas de células presentadoras de antígenos especializadas y 4) regulación a la baja de la expresión del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) en el parénquima cerebral normal lo que limita la presentación de antígenos (Chandramohan *et al.*, 2013).

En ausencia de daño patológico las únicas células con funciones inmunes en el parénquima del SNC son la microglía que se activa cuando detecta patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o patrones moleculares asociados a daños (DAM) a través de su unión a receptores de reconocimiento de patrones como receptores similares a Toll (TLR), proteínas del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD) y receptores de lectina de tipo C (Colton, 2009). La microglía activada clásicamente regula al alza la expresión del complejo principal de histocompatibilidad II (CMHII), aumentando así su capacidad de presentación de antígenos para activar a las células T, secretar citocinas proinflamatorias que incluyen al Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8) e Interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y regular al alza la óxido nítrico sintasa (NOS) para producir Óxido nítrico y destruir a los patógenos (Vitek *et al.*, 2006).

El glioblastoma crea un microambiente pro-angiogénico e inflamatorio, lo que conduce a una mayor expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales y reduce las uniones estrechas lo que genera una BHE altamente permeable. Esto ayuda a los leucocitos a salir del flujo sanguíneo al extravasarse a través de la pared endotelial del cerebro e infiltrarse en la masa tumoral (Han *et al.*, 2016). Por lo tanto, las células innatas involucradas en la cascada inflamatoria en los gliomas incluyen a los monocitos infiltrantes, macrófagos, neutrófilos y la microglía residente (Curiel, 2008).

Los macrófagos asociados a tumores (TAM) a menudo se consideran facilitadores del crecimiento tumoral, dentro de las cuales se encuentran las células inmunosupresoras derivadas de mieloides (MDSC) que son un grupo de células heterogéneas, que incluyen macrófagos inmaduros, granulocitos, células dendríticas (CD), entre otras células. La infiltración de MDSC en tejidos de glioma puede ejercer efectos inmunosupresores a través de una variedad de vías y mediar el escape inmune del tumor. Las principales manifestaciones son disminución de la fagocitosis, aumento de la expresión de moléculas inmunosupresoras IL-10, TGF- $\beta$  (Rodrigues *et al.*, 2010) y B7H1 (Chen *et al.*, 2015), inhibición de la diferenciación de células dendríticas, reducción de la citotoxicidad de las células NK e inducción de la apoptosis de las células T. Las MDSC inhiben las células T CD8<sup>+</sup> mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ohl *et al.*, 2018) y la secreción de citocinas inmunitarias, así como la inducción de células T reguladoras (Raychaudhuri *et al.*, 2011). Para las células T CD4<sup>+</sup>, se induce la expresión de PD-1, lo que conduce a su agotamiento (Dubinski *et al.*, 2016).

Las principales citocinas proinflamatorias presentes en el microambiente tumoral y que participan en la progresión y desarrollo del cáncer son: IL-6, IL-8 e IL-1 $\beta$ :

#### **a) IL-6**

En el microambiente tumoral la IL-6 es producida por células malignas como respuesta a estímulos externos o factores intrínsecos como mutaciones oncogénicas, así como también a citocinas proinflamatorias maestras IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  que activan varias vías de señalización que dan como resultado la estabilización del ARNm de IL-6 y el aumento de su biosíntesis (Tanabe *et al.*, 2010). La transducción de señales de IL-6 canónica se inicia mediante su unión a complejos heterométricos de receptores de membrana plasmática formados por el receptor de IL-6 (IL-6R) y la glicoproteína 130 (gp130), es importante destacar que ambas proteínas se encuentran expresados en tejidos GBM (Krona *et al.*, 2005), alternativamente la vía no canónica de IL-6 se desencadena por la interacción de IL-6 con la forma soluble de IL-6R $\alpha$  y la posterior unión de este complejo a gp130 unida a la membrana. En ambas vías, tras la activación del receptor los miembros de la familia JAK propagan la señal intracelular lo que conduce a la activación del factor de transcripción STAT3 y se ha observado que su activación por IL-6 promovió la invasión y migración en células de glioblastoma U251, T98G y U87MG (Liu *et al.*, 2010) y se correlaciona con una mayor expresión y secreción de MMP-2. Además, la IL-6 derivada de la microglía estimula fuertemente la invasión de las células GBM (Zhang

*et al.*, 2012).

### **b) IL-8**

Entre los diferentes tipos de tumores, se ha informado que la IL-8 promueve la invasión tumoral a través de NF- $\kappa$ B (Kosmopoulos *et al.*, 2018). La unión de IL-8 a CXCR2 desencadenó con mayor eficacia la redistribución de E-cadherina desde la unión de las células endoteliales. Por lo tanto, la permeabilidad vascular aumenta y los vasos sanguíneos son susceptibles a la invasión y metástasis transmitidas por la sangre (Dwyer *et al.*, 2012). Finalmente, la IL-8 participa en el reordenamiento del citoesqueleto, y el eje de señalización IL-8-NF- $\kappa$ B promueve la polimerización de actina F y media la transición epitelial-mesenquimatosa (EMT), promoviendo el crecimiento y la invasión del tumor (Kahlert *et al.*, 2013).

### **c) IL-1 $\beta$**

La principal fuente de esta interleucina son los macrófagos, los neutrófilos, las células epiteliales y las células endoteliales. La producción de IL-1 suele precisar dos señales distintas, una que activa la transcripción génica y la producción de un precursor polipeptídico de 33 kDa pro IL-1 $\beta$  el cual es inducido principalmente por la activación de los receptores tipo Toll (TLR), del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) y del receptor de la propia IL-1 (IL1-R1) (Doblado *et al.*, 2018; Jarosz *et al.*, 2017) y una segunda señal que activa el inflamósoma NLRP3 para que escinda mediante proteólisis al precursor para generar la proteína madura de 17 kDa IL-1 $\beta$  (Abbas, 2015). Al ser liberada ejerce su acción sobre las células T induciendo en ellas la liberación del IL-2 que estimula la maduración y proliferación de las células B, además está involucrada en la respuesta febril y por lo tanto se le conoce como pirógeno endógeno (Abbas, 2015).

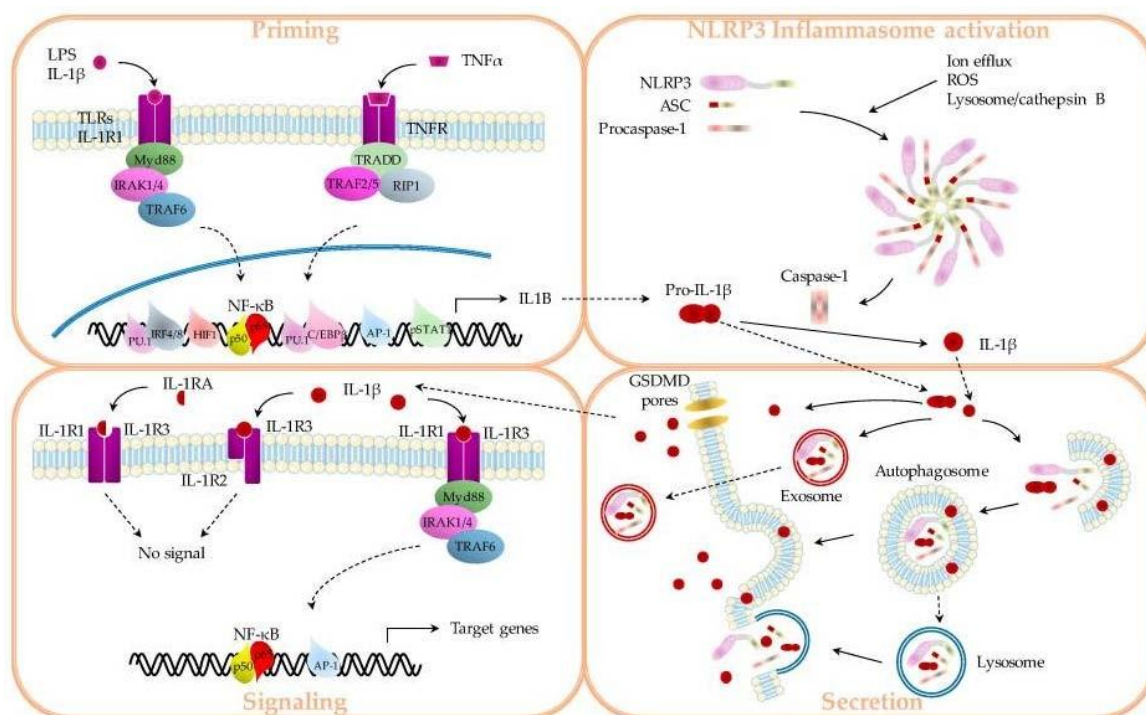
## **IL-1 $\beta$ en cáncer**

La IL-1 $\beta$  juega un papel particularmente importante en la activación de las células de glioma (Basu *et al.*, 2004) así como el inicio de la cascada neuroinflamatoria (Simi *et al.*, 2007). Es importante recalcar que las células de glioblastoma humano son sumamente sensibles a la estimulación con IL-1 $\alpha$  y estas a su vez son capaces de secretar IL-1 $\beta$  (0.1 pg/ml desencadenó la producción de IL-1 $\beta$ ) lo que representa una sensibilidad aproximadamente dos órdenes de

magnitud mayor que los astrocitos humanos (Tarassishin *et al.*, 2011) además de que la cantidad de secreción de IL-1 $\beta$  se ha visto relacionada con el grado de malignidad del glioma (Tarassishin *et al.*, 2014).

### Señalización de IL-1 $\beta$

IL-1 $\beta$  activa puede unirse a IL-1-R1 o a IL-1-R2 estos receptores presentan tres dominios de Ig extracelulares y están asociados con la proteína accesoria de IL-1R altamente homóloga (IL-1RAcP o IL-1R3). Sin embargo, la transmisión de una señal tras la unión de IL-1 $\beta$  a sus receptores no es un asunto sencillo. De hecho, IL-1R2 no tiene dominio TIR y actúa como un



**Figura 5|** Diferentes pasos para la producción y señalización de IL-1 $\beta$ . a) Priming o cebado: corresponde a la transcripción del gen IL-1 $\beta$  y es inducido principalmente por la activación de los receptores tipo Toll (TLR); b) activación, secreción y señalización del inflammasoma; c) secreción de IL-1 $\beta$  y d) vía de señalización activada por la unión IL-1 $\beta$  a sus receptores (Imagen tomada de Rébé & Ghiringhelli, 2020).

receptor señuelo. Además, el antagonista IL-1Ra también puede unirse a IL-1R1 sin inducir una señal activadora, ocupando el lugar de IL-1 $\beta$  (Doblado *et al.*, 2018). Por lo tanto, solo IL-1 $\beta$ /IL-1R1/IL-1RAcP permitirá la transmisión de una señal. Esto plantea la cuestión no solo de la cantidad de IL-1 $\beta$  producida, sino también del nivel de expresión de IL-1R en las células diana y el nivel de IL-1Ra. Una vez activado, IL-1R/IL-1RAcP puede reclutar Myd88 a través de dominios TIR presentes en el dominio intracelular de IL-1R y en el dominio C-terminal de

Myd88. Luego, MyD88 se asocia con IRAK 4, IRAK1 y/o IRAK2, para permitir su asociación con TRAF6 que sirve como una plataforma para reclutar y activarla cinasa 1 activada por el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TAK1) quien a su vez activará p38 y a la cinasa N-terminal c-Jun (JNK), lo que lleva a la activación del factor de transcripción AP-1, o el complejo IKK que cataliza la fosforilación y la posterior degradación de I $\kappa$ B, liberando a NF- $\kappa$ B (es decir, p50/p65) para translocarse del citosol al núcleo y activar genes dependientes de NF- $\kappa$ B (Loiarro *et al.*, 2010) (figura 5).

Se ha demostrado que NF- $\kappa$ B se activa constitutivamente en gliomas (Zhao *et al.*, 2011) asociándose con el mal pronóstico de la enfermedad y resistencia a la apoptosis (Angileri *et al.*, 2008). Además de que se ha evidenciado que este factor de transcripción regula al alza la expresión de proteínas anti-apoptóticas como lo son: survivina, Bcl-2, Bcl-xL y BIRC3 en una línea celular de GBM (Zhao *et al.*, 2011). Por otro lado, en un trabajo realizado por Mendoza *et al.*, en el año 2017 demostraron que la IL-1 $\beta$  induce la regulación positiva de genes implicados en la supervivencia celular, como; CDKN1A (un regulador de la progresión del ciclo celular), TP63 (regulador de la progresión del ciclo celular, la apoptosis y la reparación del ADN) y particularmente BIRC3 (un inhibidor de la apoptosis) en un clon (6D) de células MCF7 (Perez-Yepey *et al.*, 2014), que además presentaban una mayor resistencia a la doxorubicina cuando las células eran tratadas con IL-1 $\beta$ , sugiriendo una correlación entre la quimiorresistencia y la regulación positiva de la expresión de la proteína inhibidora de la apoptosis BIRC3 (Mendoza *et al.*, 2017).

Con base a la evidencia disponibles se cree que IL-1 $\beta$  puede funcionar como una molécula central que conecta e impacta en varias facetas importantes de la progresión del glioma, la vigilancia inmunológica y la evasión de la apoptosis.

## Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada evolutivamente conservada que puede originarse a partir de perturbaciones demasiado intensas o prolongadas del microambiente intracelular o extracelular que son excesivas para generar respuestas adaptativas y restaurar la homeostasis celular (Galluzzi *et al.*, 2016). Este proceso se encuentra fuertemente regulado

por cascadas de señalización complejas en múltiples puntos, si este proceso es inadecuado debido a la interferencia con esta red reguladora se pueden tener múltiples efectos que están asociados con muchas neoplasias malignas humanas, enfermedades neurodegenerativas, trastornos autoinmunes y cáncer (Elmore, 2007).

### **Mecanismo de apoptosis**

Las caspasas son fundamentales para que se lleve a cabo la apoptosis, ya que son tanto las iniciadoras como las ejecutoras de la muerte celular. Hay tres vías por las que se pueden activar: la vía intrínseca (o mitocondrial), la vía extrínseca (o de receptor de muerte) y la vía común (O'Brien & Kirby, 2008) (figura 6).

#### **▪ Vía del receptor de muerte o vía extrínseca**

La vía extrínseca de la apoptosis comienza cuando los ligandos de muerte se unen a un receptor de muerte correspondiente, aunque se han descrito varios de estos receptores los más conocidos son, el receptor del Factor de Necrosis Tumoral 1 (TNF1) y una Proteína relacionada llamada Fas (CD95) y sus ligandos denominados TNF y Ligando Fas (FasL) respectivamente (Kaufmann *et al.*, 2001). Estos receptores de muerte tienen un dominio de muerte intracelular que recluta proteínas adaptadoras como el dominio de muerte asociado al receptor de TNF (TRADD) y el dominio de muerte asociado a Fas (FADD), así como la caspasa 8 (Schneider & Tschopp, 2000) La unión del ligando al receptor de muerte da como resultado la formación de un sitio de unión para una proteína adaptadora y todo el complejo de proteína del adaptador ligando-receptor-adaptador se conoce como el complejo de señalización inductora de muerte (DISC) (O'Brien & Kirby, 2008). Luego, DISC inicia el ensamblaje y la activación de la pro-caspasa 8 (Karp G, 2008).

#### **▪ Vía intrínseca o mitocondrial**

Como su nombre lo indica, la vía intrínseca se inicia dentro de la célula, los estímulos internos, como el daño genético irreparable, hipoxia, las concentraciones extremadamente altas de  $Ca^{+2}$  citosólico y el estrés oxidativo severo son algunos factores desencadenantes del inicio de la vía mitocondrial intrínseca (Karp, 2008).

Esta vía está estrechamente regulada por un grupo de proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2 (Tsujimoto *et al.*, 1984): las proteínas pro-apoptóticas (por ejemplo, Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim y Hrk) y las proteínas anti-apoptóticas (por ejemplo, Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 y Mcl-1). Mientras que las proteínas anti-apoptóticas regulan la apoptosis al bloquear la liberación mitocondrial de citocromo-c y por lo tanto la permeabilidad de la membrana mitocondrial, las proteínas pro-apoptóticas actúan promoviendo dicha liberación. No es la cantidad absoluta sino el equilibrio entre las proteínas pro y anti-apoptóticas lo que determina si se iniciará la apoptosis (Semin Hematol. 1997). Otros factores apoptóticos que se liberan del espacio intermembrana mitocondrial al citoplasma incluyen el factor inductor de apoptosis (AIF), el segundo activador derivado de mitocondrias de la caspasa (Smac), la proteína de unión directa a IAP con bajo pI (DIABLO) y la proteína Omi / temperatura alta requerida A (HtrA2) (Kroemer *et al.*, 2008). La liberación citoplasmática del citocromo c activa la caspasa 3 a través de la formación de un complejo conocido como apoptosoma que está formado por el citocromo c, Apaf-1 y la caspasa 9 (Kroemer *et al.*, 2008).

#### ▪ **Vía común**

La caspasa 9 y 8 activas en la vía intrínseca y extrínseca respectivamente convergen en la caspasa 3, esta caspasa escinde el inhibidor de la desoxirribonucleasa activada por caspasa, que es responsable de la apoptosis nuclear. Además, las caspasas posteriores inducen la escisión de las proteínas cinasas, de algunas proteínas del citoesqueleto, proteínas de reparación del ADN y las subunidades inhibidoras de la familia de las endonucleasas (Ghobrial *et al.*, 2005).

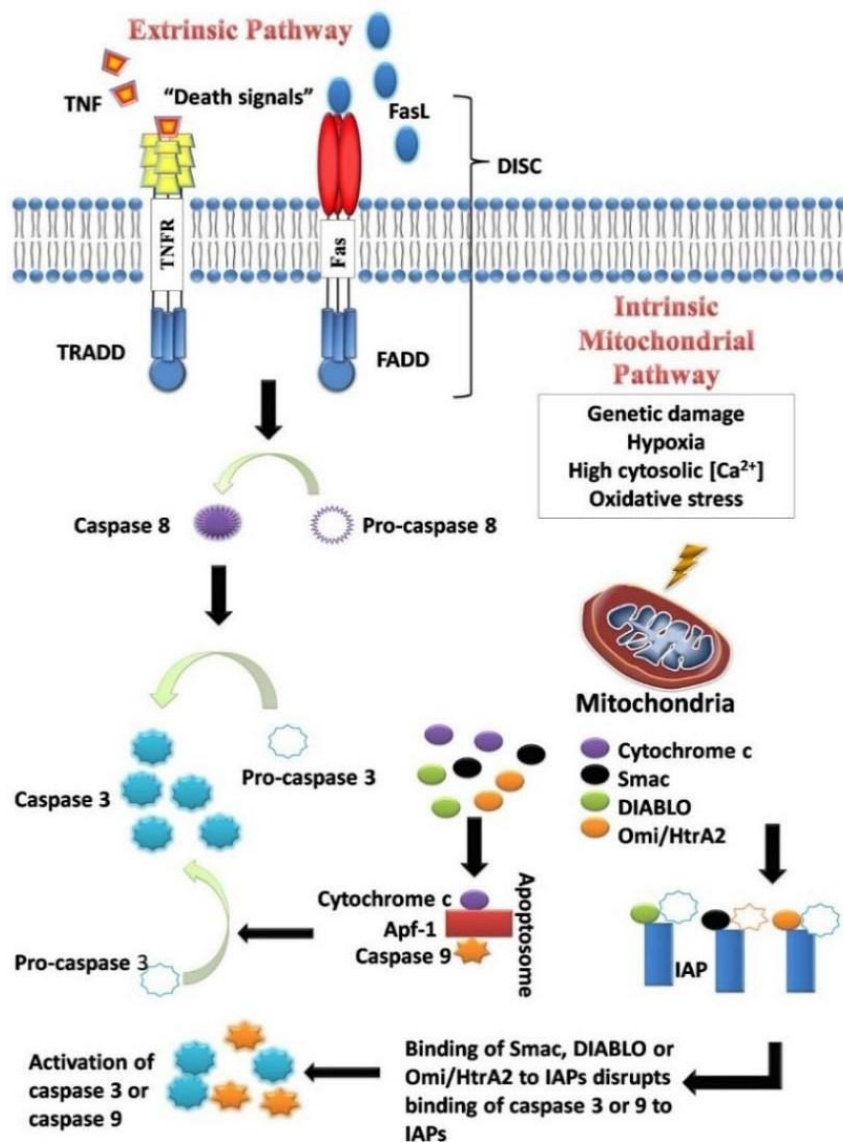
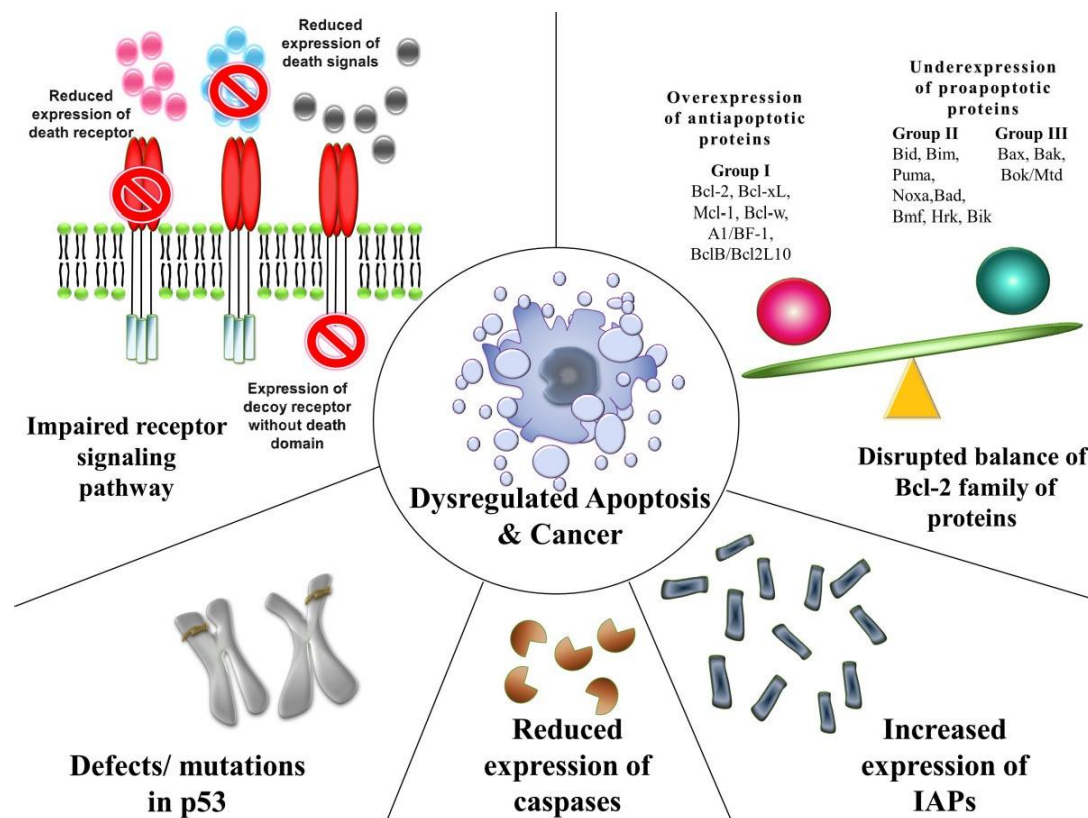


Figura 6| Vía intrínseca, extrínseca y común de la apoptosis (Imagen tomada de Wong, 2011).

La evasión de la muerte celular es uno de los cambios esenciales que sufren las células durante la transformación maligna (Hanahan & Weinberg, 2000). Hay muchas formas en que una célula maligna puede adquirir una reducción o resistencia a la apoptosis, generalmente los mecanismos por los cuales se produce pueden dividirse ampliamente en: 1) Desequilibrio entre proteínas pro y anti-apoptóticas, 2) incremento en la expresión de proteínas inhibidoras

de la apoptosis (IAP), 3) función reducida de las caspasas, 4) defectos/ mutaciones en p53 y 5) señalización deteriorada de los receptores de muerte (Wong, 2011).



**Figura 7| Mecanismo que contribuyen a la evasión de la apoptosis y la carcinogénesis.** En diferentes tipos de cáncer se han observado varios mecanismos que participan en la evasión de la apoptosis dentro de los cuales están: desequilibrio de la familia de proteínas Bcl-2, incremento de la expresión de IAP, reducción de la expresión de caspasas, defectos/mutaciones en p53 y señalización deteriorada de los receptores de muerte (Imagen tomada de Wong, 2011).

## Proteínas inhibidoras de la apoptosis

Las proteínas inhibidoras de la apoptosis, conocidas como IAP (por sus siglas en inglés) son un grupo de proteínas similares estructural y funcionalmente que se creía que operaban principalmente regulando a las caspasas (Varfolomeev *et al.*, 2007) sin embargo, también influyen en una multitud de otros procesos celulares, como los procesos de señalización

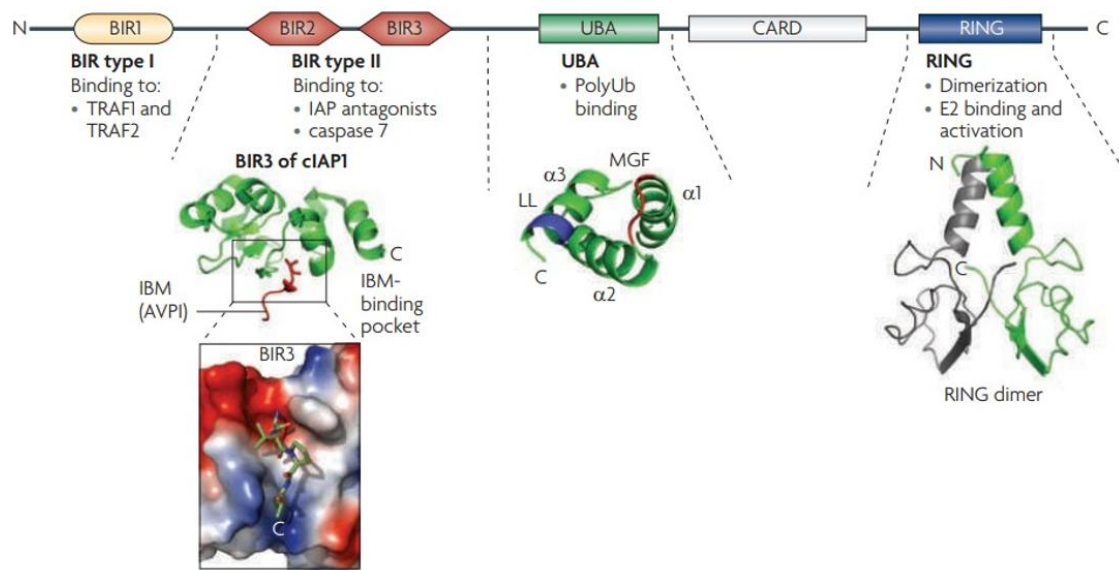
dependientes de ubiquitina (Ub) que regulan la activación de factores de transcripción como NFκB y de las proteínas cinasa activadas por mitógenos (MAPK). Además, se informa que las IAP modulan los eventos de señalización que promueven la activación de las cinasas de motilidad celular y la metástasis (Mehrotra *et al.*, 2010; Dogan *et al.*, 2008). Muchos de estos procesos celulares se desregulan con frecuencia en el cáncer y contribuyen directa o indirectamente al inicio de la enfermedad, el mantenimiento y/o progresión del tumor (LaCasse, 2008; Hunter *et al.*, 2007).

Actualmente, se han identificado ocho IAP's, conocidas como: NAIP (BIRC1), c-IAP1 (BIRC2), c-IAP2 (BIRC3), IAP ligado al cromosoma X (XIAP, BIRC4), Survivina (BIRC5), Apollon (BRUCE, BIRC6), Livin / ML-IAP (BIRC7) y proteína similar a IAP 2 (BIRC8) (Vucic & Fairbrother, 2007).

### ***Dominio BIR***

La característica definitoria de una proteína IAP es la presencia del dominio de repetición IAP de baculovirus (BIR), un pliegue de unión a zinc de aproximadamente 70 residuos de aminoácidos de gran tamaño que contienen la secuencia característica CX 2, CX 16, HX 6, C (C=cisteína, H= histidina, X= cualquier aminoácido) que se pliegan como laminas betas de tres cadenas rodeadas por cuatro hélices alfa, las cuales se empaquetan fuertemente para formar un núcleo hidrófobo, en el centro del cual se encuentra un átomo de zinc coordinado por tres cisteínas y una histidina que media las interacciones proteína-proteína (Hinds *et al.*, 1999 (Birnbaum *et al.*, 1994; Hinds *et al.*, 1999). Los BIR pueden estar presentes en una sola copia o en un conjunto de dos o tres repeticiones en la porción N- terminal de la IAP (Eckelman *et al.*, 2006). Es importante señalar que los dominios BIR individuales poseen características de unión específica sobre la base de la presencia de un surco profundo de unión a péptidos, pueden agruparse en grupos de tipo I y de tipo II. Los tipo I carecen de un surco de unión a péptidos o poseen solo una bolsa poco profunda, que en el caso de las c-IAP median la unión al factor 1 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF1) y TRAF2 mientras que BIR1 de XIAP media la interacción con la proteína de unión a la cinasa activada por el factor de crecimiento transformante β (TAB1) (Rothe *et al.*, 1995; Uren *et al.*, 1996). Los BIR de tipo II tienen una hendidura hidrofóbica distintiva a través de la cual se une a tetrapéptidos

terminales denominados motivos de unión a IAP (IBM) (Lin *et al.*, 2007), presente en el extremo amino-terminal de la subunidad de caspasa 9. En las caspasas no activas, este motivo está oculto, pero queda expuesto después de la activación mediada por escisión de la caspasa 3 y la caspasa 7 (Riedl *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2005). Otros IAP como c-IAP1 y c-IAP2 son ineficaces para inhibir directamente las caspasas *in vitro* (Deveraux *et al.*, 1993; Trapp *et al.*, 2003). Por lo tanto, los BIR tipo II de estas IAP se unen a los motivos IBM presentes en inhibidores de IAP como Smac / DIABLO en mamíferos (Vince *et al.*, 2007). Los cambios sutiles en la ranura de unión a péptidos de los dominios BIR de tipo II alteran la preferencia por IBM particulares (Yoo *et al.*, 2002).



**Figura 8| Estructura de las proteínas IAP.** Los dominios BIR de las IAP se pueden agrupar en dominios BIR tipo I (amarillo) y tipo II (rojo) en función de la presencia o ausencia de un surco profundo de unión a péptidos. Las proteínas como las caspasas y los antagonistas de IAP interactúan con los dominios BIR de tipo II, mientras que TRAF1 y TRAF2 interactúan con los dominios BIR I. Se muestra la estructura del surco de unión al péptido cIAP1-BIR3 unido a la porción N-terminal del antagonista de IAP Smac (AVPI; rojo). El dominio UBA que se une a la poliubiquitina (poliUb). Se desconoce la función del dominio de reclutamiento de caspasa (CARD), que generalmente sirve como superficie de interacción de proteínas. El dominio RING es necesario para la actividad de la ligasa Ub y es una interfaz de dimerización y un sitio de acoplamiento para las enzimas E2. Se muestra la estructura de un dímero RING cIAP2; las estructuras gris y verde representan dos moléculas cIAP2 respectivas (Imagen tomada de Gyrd-Hansen & Meier, 2010).

### ***Dominio RING***

El dominio RING se encuentra en el extremo C- terminal de las proteínas inhibidoras de la apoptosis que les proporciona actividad de ligasa E3 el cual promueve la transferencia de

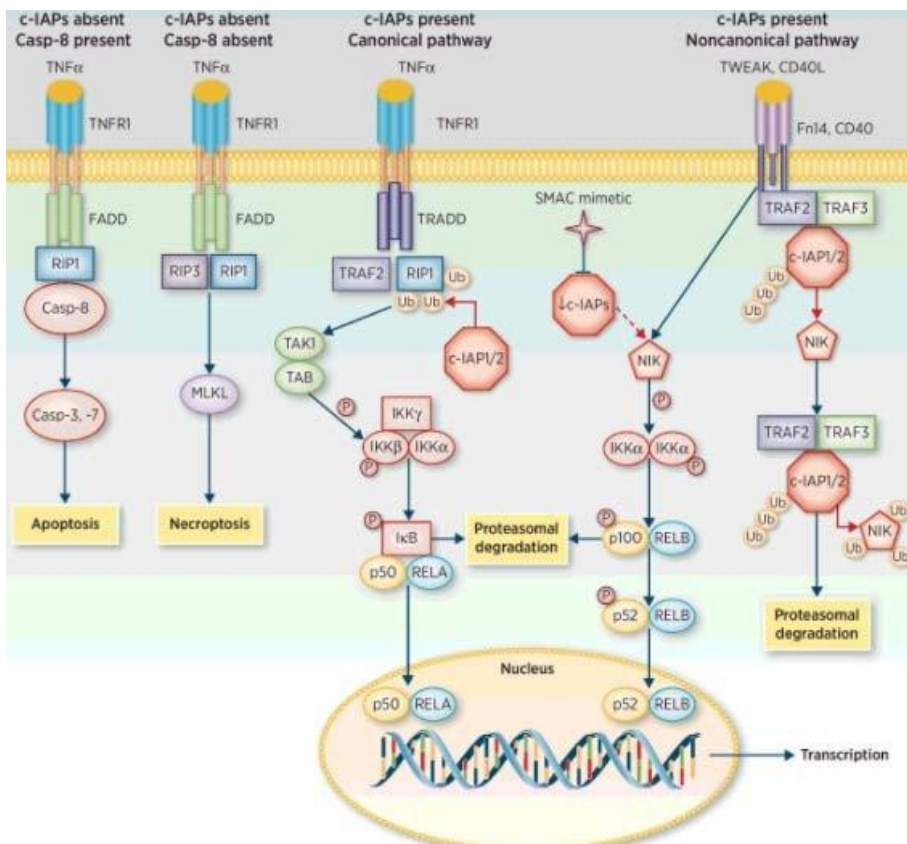
Ubiquitina (Ub) a proteínas diana (Komander, 2009). La regulación de las vías de apoptosis por c-IAP1 y c-IAP2 se centra en este dominio. La dimerización del dominio RING potencia la actividad de la ubiquitina ligasa, lo que permite la autoubiquitilación y la ubiquitinación cruzada de otras proteínas IAP (Mace *et al.*, 2008; Silke *et al.*, 2005). Por ejemplo, c-IAP1 puede mediar la ubiquitinación de c-IAP2 y XIAP (Conze *et al.*, 2005; Silke *et al.*, 2005; Varfolomeev *et al.*, 2007). Estas proteínas también pueden ubiquitinar a RIP1–4 (proteína que interactúa con el receptor) (Bertrand *et al.*, 2011; Damgaard *et al.*, 2012), NIK (factor nuclear  $\kappa$ B o NF- $\kappa$ B quinasa inductora de  $\kappa$ B) (Varfolomeev *et al.*, 2007), caspasas (Choi *et al.*, 2009), TRAF2 (Li *et al.*, 2002), TRAF3/6 (Mao *et al.*, 2010), SMAC (Hu & Yang, 2003), y C-RAF (Dogan *et al.*, 2008), modulando las vías de señalización mediadas por sus sustratos (Longchuan *et al.*, 2014).

Estas proteínas también albergan dominios adicionales, como el dominio de asociación a ubiquitina (UBA) a través del cual interactúan con proteínas ubiquitiladas (Hansen *et al.*, 2008). Finalmente, c-IAP1 y c-IAP2 contienen un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) que se cree que puede actuar inhibiendo la actividad de la ligasa E3 (Dueber *et al.* 2011).

### **Funciones de las IAP en la muerte celular, la supervivencia celular y la interacción con la vía NF $\kappa$ B**

NF $\kappa$ B es una familia de factores de transcripción que constan de RELA (también conocido como p65) RELB y c-REL y el precursor de las proteínas que contienen repeticiones de anquirina NF $\kappa$ B1 (p105, que se procesa para generar p50) y NF $\kappa$ B2 (p100, que se procesa para generar p52) (Perkins, 2007). Dependiendo del mecanismo que conduce la activación de NF $\kappa$ B, la transducción de señales se puede clasificar en la vía canónica y la vía no canónica (Bonizzi *et al.*, 2004). Es importante destacar que ambas vías son cascadas de transducción de señales dependientes de Ub en las que las ligasas de Ub, los receptores de Ub y las enzimas desubiquilantes (DUBA), acumulan, reconocen y eliminan señales de Ub, lo que permite el ensamblaje controlado temporalmente de complejos de proteínas que conducen a la activación de cinasas que regulan NF $\kappa$ B (Bianchi & Meier, 2009).

El papel fundamental de los c-IAP en la regulación de la apoptosis se destaca por el reclutamiento y el ensamblaje del complejo de activación de señalización río arriba de NFκB en varios receptores de la superfamilia de TNF (Vacic *et al.*, 2011) (figura 9). Por ejemplo, la unión de TNF a TNFR1 estimula el reclutamiento y la formación de un complejo multiproteico que contiene TRADD, RIP1, TRAF2 y cIAP (Varfolomeev *et al.*, 2012). En este complejo, la proteína cIAP promueve la poliubiquitilación ligada a K63 de RIP1 (Varfolomeev *et al.*, 2008; Bertrand *et al.*, 2008) que sirve como plataforma de señalización para el reclutamiento del complejo IKK, complejo TAK (TAK1 y TAB1/2) y LUBAC (cadena de ubiquitina lineal complejo de ensamblaje), lo que conduce a la activación río abajo de las vías NF-κB y MAPK (Jin *et al.*, 2009). Por el contrario, la ausencia de cIAP da como resultado que TNFR1 actúe como un receptor de muerte inductor de apoptosis activada por caspasa 8 (Schütze *et al.*, 2008). Alternativamente cuando la actividad de la caspasa 8 esta reducida o ausente se activa la vía de muerte celular por necroptosis (Pasparakis & Vandenabeele, 2015). Además de regular positivamente la señalización canónica de NF-κB, las proteínas cIAP también son reguladores negativos clave de la señalización no canónica



**Figura 9| Papel de las IAP en la muerte celular y las vías de señalización de NFκB.** Esquema sobre las posibles vías que puede tomar la activación de los receptores de muerte en presencia y ausencia de cIAP1/2 (Imagen tomada de Derakhshan *et al.*, 2017).

de NF- $\kappa$ B. En reposo, los cIAP controlan la estabilidad de NIK a través de su ubiquitinación y, por lo tanto, evitan la activación de IKK $\alpha$  río abajo (Derakhshan *et al.*, 2017).

## **BIRC3 en cáncer**

BIRC3 miembro de la familia de proteínas inhibidoras de las apoptosis se ha demostrado que está involucrado en múltiples procesos biológicos incluido la proliferación celular, la migración (Fu *et al.*, 2018), la transición epitelio-mesenquima (Jo *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2018) y la apoptosis (Smolewski *et al.*, 2011). Además de que se encontró una alta expresión de esta IAP en una variedad de tumores malignos como el cáncer de pulmón de células no pequeñas (Yang *et al.*, 2016), cáncer de vesícula biliar (Jiang *et al.*, 2017), cáncer de cuello uterino (Imoto *et al.*, 2002) y glioblastoma (Tchoghandjian *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016) correlacionándose negativamente con la supervivencia de los pacientes. Por otro lado, se ha informado que BIRC3 acelera la transformación maligna de gliomas de bajo grado a gliomas de alto grado, considerándose como un facilitador de la transformación en este tipo de cáncer (Gressot *et al.*, 2016).

La resistencia terapéutica es un sello distintivo del GBM que hace que la recurrencia a la enfermedad sea inevitable. A pesar de los avances en las estrategias multimodales de resección quirúrgica, radioterapia y quimioterapia con temozolamida (TMZ), la mediana de supervivencia de los pacientes sigue siendo de tan solo 14 meses (Stupp *et al.*, 2005). Wang *et al.*, encontraron que BIRC3 podría ser en parte responsable de esta quimiorresistencia ya que la regulación positiva de esta proteína resultaba en la evasión de la apoptosis y la resistencia a TMZ en glioblastoma tanto *in vivo* como *in vitro* (Wang *et al.*, 2016). Asimismo, el grupo de Zhao confirmó que BIRC3 es un objetivo transcripcional de NF $\kappa$ B p65 y que como consecuencia de los niveles reducidos de BIRC3 y p65 los niveles de poliubiquitinación de RIP1 se ven reducidos siendo más sensibles a los efectos citotóxicos de TNF- $\alpha$  (Zhao *et al.*, 2013).

## Tratamientos contra glioblastoma

El tratamiento estándar de GBM se inicia mediante resección quirúrgica. Sin embargo, el potencial curativo de la cirugía citorreductora se ve muy comprometido por el patrón de crecimiento difuso e infiltrativo de los GBM, que hace que la resección completa del tumor sea casi imposible. La extensión de la resección esta influenciada por el tamaño y la ubicación del tumor y las características del paciente (p.ej., edad y estado funcional) (Stummer *et al.*, 2006).

- **Cirugía**

Generalmente se recomienda la resección total macroscópica (RTM), si es factible. Los análisis retrospectivos han indicado que la RTM puede mejorar los resultados de supervivencia, incluso en pacientes de edad avanzada (Noorbakhsh *et al.*, 2014).

- **Radioterapia**

Actualmente la radioterapia convencional después de la cirugía se administra 60 Gy en fracciones de Gy durante 6 semanas en combinación con TMZ (Stupp *et al.*, 2005). El riesgo de necrosis por radiación con la quimioterapia simultánea, según el volumen de cerebro irradiado y la dosis a las estructuras críticas, son consideraciones importantes.

- **Temozolamida**

La temozolamida, quimioterapéutico de primera línea utilizado en GBM, es un agente alquilante lipofílico pequeño (94 Da) de la clase de la imidazotetrazina que es estable a pH ácido, lo que permite la dosificación oral e intravenosa y puede atravesar la barrera hematoencefálica (Zhang *et al.*, 2012; Thomas *et al.*, 2017). Después de la absorción, TMZ sufre una descomposición no enzimática espontánea a pH fisiológico para formar 5-(3 metiltiazin-1-il)imidazol-4-carboxamida (MTIC) (Denny *et al.*, 1994), que luego reacciona con agua para producir 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC) y un catión de metil diazonio altamente reactivo (Zhang *et al.*, 2012).

El catión metil diazonio es altamente reactivo y metila el ADN en la posición N7 de la guanina (N7-MeG, 70%), la posición N3 de la adenina (N3-MeA, 9%) y la posición O6 de la guanina (O6-MeG, 6%). Aunque son más prevalentes, N7-MeG y N3-MeA se reparan rápidamente mediante la vía de reparación por escisión de la base y no son mediadores primarios de la toxicidad de la TMZ, aunque las lesiones de N3-MeA son letales si no se reparan. En comparación, la reparación de O6-MeG requiere la acción de la enzima suicida metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT), que elimina el grupo metilo para restaurar la guanina. Si no es reparado por MGMT, el O6-MeG se empareja mal con la timina, lo que activa la vía de reparación de errores de emparejamiento del ADN (MMR) que elimina la timina (no el O6-MeG), lo que da como resultado ciclos inútiles de reparación y roturas eventuales de la cadena de ADN que conducen a la apoptosis (Thomas *et al.*, 2017).

El objetivo actual de la terapia adyuvante en GBM es prolongar la supervivencia del paciente en buenas condiciones clínicas, ya que la erradicación de la enfermedad sigue siendo poco probable, por lo que se sugiere utilizar miméticos de Smac para restaurar los procesos apoptóticos en estas células cancerosas (Frazzi, 2021) que como se describió anteriormente ha tenido efectos positivos sobre la sensibilización de las células tumorales a los tratamientos.

## Miméticos de Smac

Las proteínas IAP pueden ser antagonizadas por sus antagonistas endógenos, como SMAC/DIABLO (Du *et al.*, 2000), Omi/HtrA2 (Van Loo *et al.*, 2002), ARTS (proteína relacionada con la apoptosis en la vía de señalización de TGF $\beta$ ) (Gottfried *et al.*, 2004) y XAF1 (factor asociado a XIAP) (Liston *et al.*, 2001). SMAC, el antagonista natural mejor estudiado de las proteínas IAP, se libera de las mitocondrias al citosol tras la estimulación apoptótica (Du *et al.*, 2000). SMAC tiene una secuencia dirigida a mitocondrias de 55 residuos en su extremo N- terminal, que se elimina proteolíticamente tras su liberación de las mitocondrias, para exponer su motivo tetrapeptídico Ala-Val-Pro-Ile (AVPI) para unirse a XIAP, cIAP1 y cIAP2 (Verhagen *et al.*, 2000). Smac escindido se dimeriza y se une a los dominios BIR2 y BIR3 de XIAP a través de su motivo de unión IAP (IBM) e interfiere con la interacción de XIAP con caspasas (Liu *et al.*, 2000). SMAC también se une al dominio BIR3 de cIAP1 y

cIAP2 a través de su motivo de unión AVPI (Hu & Yang, 2003).

Los antagonistas de IAP rara vez inducen la degradación de XIAP. Sin embargo, en muchos casos, promueven la autoubiquitilación de cIAP y la degradación proteosomal (Vince *et al.*, 2007), mediante la dimerización de su dominio RING a través de la liberación de BIR3 (Feltham *et al.*, 2011). Esta activación de la función de ligasa E3 de cIAP por un antagonista de IAP también puede resultar en la ubiquitilación del antagonista, pero la importancia fisiológica de esto no está clara (Wu *et al.*, 2000). La degradación de cIAP inducida por antagonistas de IAP previene la ubiquitilación mediada por estas proteínas de los componentes en la vía de señalización de TNF y, por lo tanto, convierte la señalización de TNFR1 de pro-supervivencia a pro-apoptótica (Micheau & Tschopp, 2003).

#### ▪ **Desarrollo de los miméticos de Smac**

Después de que se observó que los pacientes que expresaban niveles aumentados de Smac tenían un pronóstico más favorable, con tasas de remisión más altas y una supervivencia general más larga (Fulda & Vucic, 2012) y que la expresión exógena de Smac en células de neuroblastoma resistente las sensibilizaba a la apoptosis inducida por TRAIL (Fulda *et al.*, 2002) proporcionó una prueba del principio para dirigirse a los IAP. Estudios posteriores que usaron oligonucleótidos antisentido contra XIAP o péptidos Smac sintéticos, mostraron que estos también sensibilizaron a las células cancerosas a la quimioterapia (Carter *et al.*, 2003). Junto con otros estudios, esto impulsó el desarrollo farmacéutico de miméticos de Smac similares a péptidos de molécula pequeña, denominados miméticos de Smac (SM). Los SM imitan el tetrapéptido N-terminal (NH<sub>2</sub>-AVPI), que constituye una parte importante de IBM (Silke *et al.*, 2000). Muchos de estos compuestos miméticos han mostrado efectos anticancerígenos *in vitro* e *in vivo*, validando el desarrollo de SM clínicos (Fulda & Vucic, 2012).

Smac endógeno se homodimeriza a través de una amplia interfaz hidrofóbica y es bivalente (Chai *et al.*, 2000). Se han desarrollado para la clínica SM bivalentes potentes y selectivos, así como compuestos monovalentes. Los SM monovalentes tienen un motivo de unión

similar a AVPI, mientras que los SM bivalentes tienen dos. Hasta la fecha los SM que han entrado en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer son cinco compuestos monovalentes, GDC-0152, CUDC-427 (GDC-0917), Debio 1143 (AT-406), LCL161 y BI 891065, y tres compuestos bivalentes, birinapant (TL32711), APG-1387, HGS1029 (AEG40826) (Morrish *et al.*, 2020).

## Miméticos de Smac en combinación con quimioterapia

La quimioterapia sigue siendo el tratamiento de primera línea para una variedad de cánceres, lo que racionaliza la exploración de emparejar SM con quimioterapias para el tratamiento combinado. Debido a estos antecedentes, se investigó la combinación de LCL161 (un mimético de Smac) con paclitaxel en tumores de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP). La adición de LCL161 a la terapia con paclitaxel aumentó la expresión de TNF, la degradación de cIAP1/2 y la activación de la señalización apoptótica dependiente de caspasa-8, sensibilizando las células cancerosas de CPCNP al tratamiento *in vitro* (Yang *et al.*, 2016). En líneas celulares de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC) el tratamiento del mimético de Smac birinapant más docetaxel resultó más efectivo que cualquiera de los tratamientos solos (Eytan *et al.*, 2015). Por otro lado, los resultados experimentales de Darding *et al.*, indicaron que la degradación de BIRC2 mediada por SM provoca una activación no canónica de NFκB que da como resultado la inducción de la expresión del gen BIRC3, mientras que en ausencia de BIRC2, BIRC3 sintetizado *de novo* es resistente a SM y suprime la expresión de TNFα (Darding *et al.*, 2011). Además, el mimético BV6 mejora profundamente la apoptosis inducida por Drozitumab en cultivos de glioblastoma primarios y células similares a células madre de glioblastoma (Cristofanón *et al.*, 2015).

## JUSTIFICACIÓN

El glioblastoma multiforme es el tumor cerebral primario maligno más común en los adultos, que se caracteriza por su alta agresividad y baja supervivencia de los pacientes, siendo esta en promedio de 14.6 meses, una vez. Las células tumorales, independientemente del tipo de cáncer, presentan una capacidad exacerbada de resistencia a la muerte (anti-apoptosis), lo que favorece su desarrollo y progresión. La identificación de los elementos moleculares anti-apoptóticos, así como la señal y los mecanismos intracelulares que regulan su expresión, se ha convertido en uno de los principales objetivos de muchos grupos de investigación, ya que pueden ser considerados y propuestos como potenciales blancos farmacológicos para un tratamiento más eficiente del cáncer.

Estudios recientes muestran que las células derivadas de glioblastoma son capaces de secretar IL-1 $\beta$ , y responder además de manera autocrina a dicha citocina proinflamatoria. IL-1 $\beta$  al unirse a su receptor de membrana, favorece la translocación al núcleo del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual induce la transcripción de genes relacionados con la progresión y desarrollo tumoral.

El propósito general del presente proyecto es evaluar si la presencia crónica de IL-1 $\beta$  exagera, por un lado, la capacidad anti-apoptótica de las células de glioblastoma U87MG mediante un aumento en la expresión de la proteína inhibidora de la apoptosis, BIRC3 y, por otro lado, si incrementa la quimiorresistencia de células U87MG al tratamiento con temozolamida. Los resultados obtenidos nos permitirán proponer marcadores moleculares que pudieran ser considerados como blancos terapéuticos para el tratamiento del glioma grado IV, y de esta forma mejorar el pronóstico y calidad de vida del paciente.

## HIPÓTESIS

H1. IL-1 $\beta$  exacerba la capacidad anti-apoptótica de las células de glioblastoma multiforme U87MG aumentando la expresión de la proteína anti-apoptótica BIRC3.

H2. IL-1 $\beta$  reduce el efecto citotóxico inducido por temozolamida en las células de glioblastoma multiforme U87MG.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto que ejerce IL-1 $\beta$  sobre la expresión de la proteína anti-apoptótica BIRC3 en células de glioblastoma multiforme U87MG, así como sobre la capacidad de quimiorresistencia a temozolamida.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Investigar si la presencia de IL-1 $\beta$  influye sobre el nivel de expresión del ARNm que codifica para BIRC3
- Determinar si el efecto que ejerce IL-1 $\beta$  sobre el nivel de expresión del ARNm que codifica para BIRC3 depende de la concentración, así como de la duración del tratamiento.
- Evaluar si la IL-1 $\beta$  influye sobre la capacidad de supervivencia de las células U87MG
- Investigar si el pretratamiento de las células U87MG con IL-1 $\beta$  reduce el efecto citotóxico que ejerce la temozolamida.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## Modelo celular U87MG

la línea celular de glioblastoma humano U87MG es una de las líneas celulares de glioblastoma más utilizadas. Fue establecida en 1966 por un investigador de la Universidad de Uppsala, Suecia, utilizando tejidos de un paciente con glioblastoma de 44 años. Los tejidos se mantuvieron en un depósito de células y luego se transfirieron a ATCC (Allen *et al.*, 2016). Las células U87MG se sembraron en matraces de cultivo de poliestireno de 25 cm<sup>2</sup> de superficie, con medio de cultivo *DMEM* (Gibco, EUA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L-Glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico-antimicótico (25 µg/ml de anfotericina B, 10,000 µg/ml de estreptomina y 10,000 unidades/ml de penicilina). Se mantuvieron dentro de una incubadora a 37° C con una atmósfera húmeda del 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire. El medio de cultivo se renovó cada 48 horas y cada 4 días las células se cosecharon. La cosecha de células consistió en los siguientes pasos: retirar el medio de cultivo y lavar 2 veces con 5 ml de PBS 1X estéril, adicionar 2 ml de tripsina y dejar reposar por 5 min, posteriormente se mezcló con 4 ml de medio de cultivo, de la suspensión celular obtenida se transfirió a un tubo cónico y se centrifugó a 1500 rpm por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla celular que quedó en el tubo se resuspendió con medio de cultivo fresco, a partir del cual, se tomaron alícuotas para regenerar el cultivo madre y lo demás se utilizó para sembrar las células que se utilizaron para experimentos posteriores. Para realizar los experimentos, las células se sembraron en placas de 6 pozos a las cuales se les dio tratamientos a distintas concentraciones y a diferentes tiempos según sea necesario en 1.5 ml de medio de cultivo por pozo. Para ello las células sembradas debieron tener una confluencia del más del 50 por ciento para dar comienzo a cada uno de los tratamientos dependiendo del tiempo en el que se mantuvieron las células, se realizaron recambios de medio cada 24 horas agregando en cada recambio el mismo tratamiento. Todo esto en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

## Reactivos

Para los diferentes tratamientos, se utilizó IL-1 $\beta$  recombinante humana (*Invitrogen*) diluido en 10 ml de BSA al 1% en PBS para genera una solución stock 2  $\mu$ g/ml. Se realizaron experimentos con distintas concentraciones de IL-1 $\beta$  (1, 5, 10, 20 y 40 ng/ml) a diferentes tiempos (8, 12, 24 y 96 horas), para después realizar los experimentos de RT-PCR y de supervivencia celular.

La temozolamida se obtuvo de Sigma-Aldrich en una presentación de 25 mg con un peso molecular de 194.15 g/mol. Se diluyó en 3 ml de DMSO para obtener una solución stock 43 mM.

El mimético de Smac AZD5582, también se obtuvo de Sigma-Aldrich en una presentación de 5 mg con un peso molecular de 1015.29 g/mol. Se diluyó en 4.42 ml de PBS para obtener una solución stock de AZD5582 1 mM, la cual fue posteriormente diluida para preparar la solución de trabajo AZD5582 3.75  $\mu$ M.

## Ensayo de RT-PCR de punto final

### a) Extracción de ácido ribonucleico total (ARN<sub>T</sub>)

Las células se sembraron en placas de 6 pozos, una vez que alcanzaron la confluencia esperada, se recambio el medio de cultivo y se dio inicio al tratamiento correspondiente, con recambio de medio cada 24 horas. Una vez considerado el tiempo respectivo al tratamiento se procedió a realizar la extracción del RNA total haciendo uso de un kit comercial FavorPrep TM, Tissue Total RNA Mini (*Favorgene, Biotech Corp., China*), siguiendo las instrucciones del fabricante: se retiró el medio de cultivo de las placas, se realizaron 2 lavados con PBS 1X, se preparó el buffer de lisis suplementado con 1% de  $\beta$ - mercapto-etanol y se agregó 350  $\mu$ L de buffer de lisis por pozo, con ayuda de una micropipeta se resuspendió y se transfirió el homogenado celular a la columna FARB que contenía el filtro blanco, se centrifugo a 12000 rpm por 2 min, se desechó la columna FARB y lo que quedo en el tubo colector se pasó a un tubo eppendorf de 2 ml, se agregaron 350  $\mu$ L de etanol al 70% en cada tubo. Se coloco en otra

columna los filtros rojos y se les añadió lo obtenido en el tubo eppendorf, se centrifugó a 12000 rpm por 2 min y se retiró el sobrenadante, se realizó 1 lavado con buffer de lavado uno y 2 lavados con buffer de lavado dos. Tras cada lavado, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 2 min. Por último, las columnas se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril y se agregaron 30 µL de agua libre de RNAsas. Se dejó reposar la muestra por 3 minutos a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos para obtener el RNA total.

### **b) Cuantificación de ARN**

Posterior a la extracción, se cuantificó la concentración y la calidad de ARN extraído mediante espectrofotometría. Para ello se empleó una dilución con 4 µL de la muestra y 196 µL de agua inyectable, para obtener un volumen final de 200 µL; la concentración se evaluó a una longitud de onda de 260 nm y la integridad del ARN se evaluó como el cociente obtenido entre las longitudes de onda 260 nm y 280 nm (A260/A280). El valor del cociente obtenido debió ubicarse en un rango de 1.8-2.0 para considerarse como una muestra de ARN de buena calidad y poder ser empleado en los ensayos de RT-PCR.

### **c) Síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario (cADN)**

Para la síntesis de la cadena de Ácido Desoxirribonucleico complementario al ARN (ADNc) extraído, se empleó el kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystem, EUA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se hizo un “master mix” (mezcla de componentes) como se muestra en la tabla de abajo del cual se añadió 10 µL de forma común a todas las muestras.

REACTIVO	VOLUMEN
<b>Buffer RT</b>	4 µL
<b>Random</b>	2 µL
<b>dNTP's</b>	1 µL
<b>Agua</b>	2.5 µL
<b>Retrotranscriptasa</b>	0.5 µL

Para cada tubo de reacción se empleó un volumen final de 20 µL, por lo que el volumen restante (10 µL) se complementó con la muestra de ARN más agua. La cantidad de ARN por tubo de reacción fue de 4 µg.

Se empleo un termociclador *Mastercycler S50* (Eppendorf) para realizar el siguiente protocolo: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C, 5 minutos a 85°C y finalmente la temperatura de los tubos se llevó a 4°C, para ser almacenados en congelación hasta su empleo.

#### d) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir del ADN complementario obtenido en la retro-transcripción se realizó reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el Kit comercial *DreamTaq PCR Master Mix* (Thermo Scientific, EUA), siguiendo las indicaciones del proveedor, con un volumen total de reacción mínimo de 20 µL.

REACTIVO	VOLUMEN
<b>Green Dream Taq</b>	10 µL
<b>Primer Forward</b>	1 µL
<b>Primer Reverse</b>	1 µL
<b>Agua</b>	6 µL
<b>ADNc</b>	2 µL

Se empleo un termociclador *Mastercycler S50* (Eppendorf) para realizar el siguiente protocolo: 5 minutos a 94 °C, 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la temperatura media del oligonucleótido a utilizar, 1 minuto a 72°C, 10 minutos a 72°C y finalmente la temperatura de los tubos se llevó a 4°C para ser almacenados en congelación hasta su empleo.

Los oligonucleótidos utilizados para la PCR de punto final se muestran en la siguiente tabla:

Primer	Sentido	Secuencia	Temperatura media	Amplicón (pb)
BIRC3	Forward	CACTCATTACTTCCGGGTACAG	62.7°C	420 pb
	Reverse	AACACTAGAGGGCCAGTTAAAG	60.7°C	

IL-1 $\beta$	Forward	CTCTCACCTCTCCTACTCACTT	58.7°C	248 pb
	Reverse	GAGAGCACACCAGTCCAAAT	62.3°C	
IL-6	Forward	AAAGAGGCACTGGCAGAAAA	64.2°C	259 pb
	Reverse	CAGGGGTGGTTATTGCATCT	64°C	
Survivina	Forward	GTGAATTTTTGAAACTGGACAG	60.5°C	243 pb
	Reverse	CCTTTCCTAAGACATTGCTAAG	59.1°C	
IL-1R1	Forward	GATTCAGGACATTACTATTGCG	60.5°C	462 pb
	Reverse	CTGGGATCCCAAGTCTACTTCC	65.1°C	
$\beta$ - actina	Forward	CAAGAGATGGCCACGGCTGCT	71.9°C	275 pb
	Reverse	TCCTTCTGCATCCTGTCCGCA	73.8°C	

### e) Separación electroforética de los productos de PCR

A partir de los productos de PCR se procedió a la separación electroforética, utilizando geles de agarosa al 1.2% 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 se calentó por tiempos intermitentes de 30 segundos hasta un tiempo total de 1:30 minutos, se añadió 4  $\mu$ L de bromuro de etidio y se vertió en la cámara de electroforesis dejando gelificar por 30 minutos a temperatura ambiente.

El gel se cargó con 9  $\mu$ L de cada muestra. Como marcador de peso molecular se empleó el patrón de ADN comercial *Gene Ruler 100 pb DNA Laddery* junto con el con buffer *6X DNA Loading Dye* (ambos de Thermo Scientific, EUA).

La separación electroforética se llevó a cabo en buffer TAE 1X a 65 Voltios durante 80 minutos; finalmente, se obtuvieron tres micrografías de cada uno de los geles en el fotodocumentador de geles AXYGEN.

## **f) Densitometría**

Se realizó el análisis densitométrico de las bandas presentes en las imágenes obtenidas en el fotodocumentador utilizando el software *ImageJ* que es proporcionado gratuitamente por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América (De sus siglas en inglés, NIH)

## **Conteo celular**

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 cambió el medio de cultivo y se dio inicio al tratamiento de las células. Al finalizar el tiempo requerido del tratamiento, se obtuvo la suspensión celular para realizar el conteo celular empleando una cámara de Neubauer. El procedimiento fue el siguiente: 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 500 µl de Tripsina-EDTA 0.25% y se dejó incubar por 5 minutos; d) se añadieron 700 µl de medio de cultivo; e) la suspensión celular fue transferida a un tubo tipo eppendorf y centrifugado a 2,000 rpm por 5 minutos; f) el sobrenadante fue descartado y la pastilla celular fue resuspendida en 1 ml de medio de cultivo; g) se combinaron en un tubo tipo eppendorf 20 µl de la suspensión celular con 80 µl de azul de tripano (colorante vital); h) se resuspendió por varias veces la suspensión celular y se depositaron 10 µl de la mezcla en cada una de las cámaras de Neubauer, posteriormente se procedió a realizar el conteo de las células no teñidas de azul (células vivas) en un microscopio de campo claro, el conteo celular se expresó en células/ml.

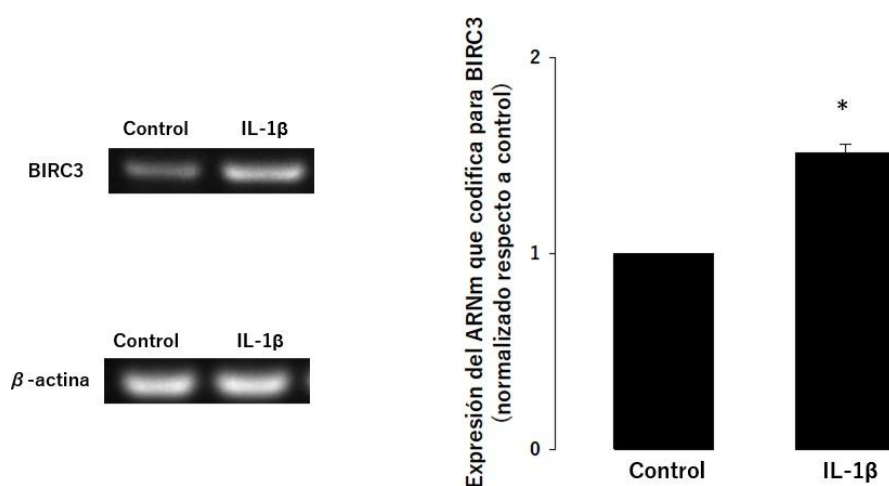
## **Análisis estadístico**

El análisis estadístico y las gráficas se realizaron con el programa SigmaPlot 12.5 (*Jandel Corporation, EUA*). Se utilizó la prueba t-Student para evaluar la diferencia entre los grupos, con un valor de significancia menor a 0.05 ( $p < 0.05$ ).

# RESULTADOS

## 1. IL-1 $\beta$ estimula la expresión del ARNm que codifica para la proteína anti-apoptótica BIRC3

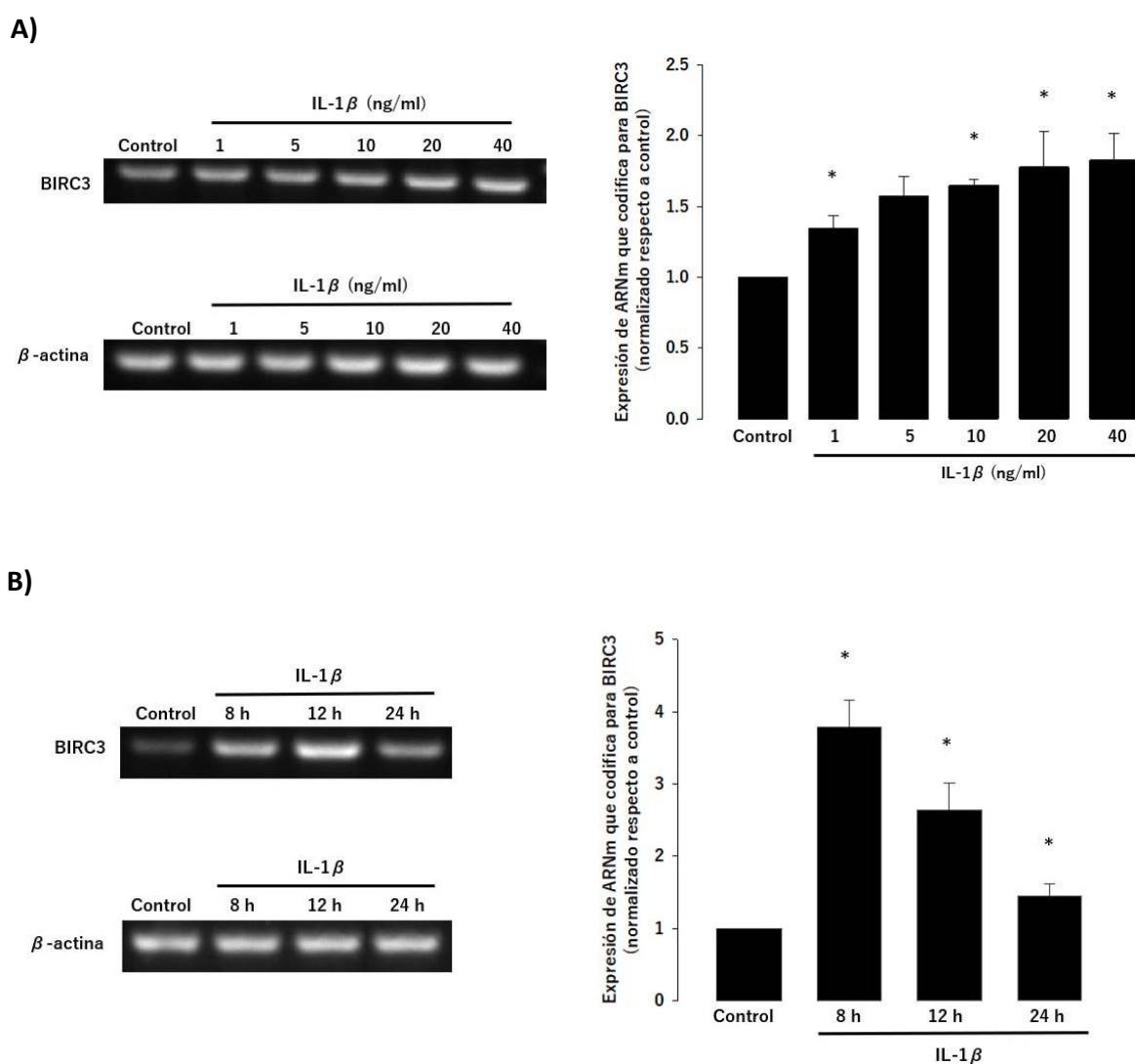
La IL-1 $\beta$  está sobre-expresada en muchos tumores sólidos, incluyendo melanoma, colon, pulmón y glándula mamaria, entre otros, cuyo nivel de expresión se asocia positivamente con un mal pronóstico de supervivencia (Rebe *et al.*, 2020). La presencia de IL-1 $\beta$  modula la expresión y síntesis de citocinas proinflamatorias, la adhesión, migración y supervivencia celular, la angiogénesis y la respuesta inmune, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Rebe *et al.*, 2020). Por lo que, de manera inicial, se decidió investigar si la presencia de IL-1 $\beta$  incide sobre la capacidad apoptótica de las células derivadas de glioblastoma multiforme humano U87MG, a través de cambios en los niveles de expresión de la proteína inhibidora de la apoptosis BIRC3. Las células fueron tratadas con 10 ng/ml de IL-1 $\beta$  por 24 horas, al finalizar el periodo de tratamiento, se aisló y purificó el ARN total, a partir del cual se realizaron los ensayos de RT-PCR de punto final. La figura 11 muestra que la presencia de IL-1 $\beta$  induce un aumento del 50% en los niveles de expresión del ARNm que codifica para BIRC3 en comparación a la condición control mientras que la presencia de IL-1 $\beta$  no afecta el nivel de expresión de  $\beta$ -actina, lo cual valida su uso como control interno en los subsiguientes experimentos.



**Figura 11| Efecto de IL-1 $\beta$  sobre el nivel de expresión del ARNm de BIRC3.** Las células U87MG fueron tratadas con 10 ng/ml de IL-1 $\beta$  por 24 horas, se muestra una imagen representativa del resultado de RT-PCR de punto final para BIRC3 y el grafico respectivo obtenido al haber realizado la densitometría. Los valores graficados se expresan normalizados respecto a  $\beta$ - actina y la condición control, así como el error estándar, n= 3 experimentos independientes. \* Valor de p <0.05.

## **2. El efecto que ejerce IL-1 $\beta$ sobre el nivel de expresión del ARNm que codifica para BIRC3 depende tanto de la concentración como de la duración del tratamiento**

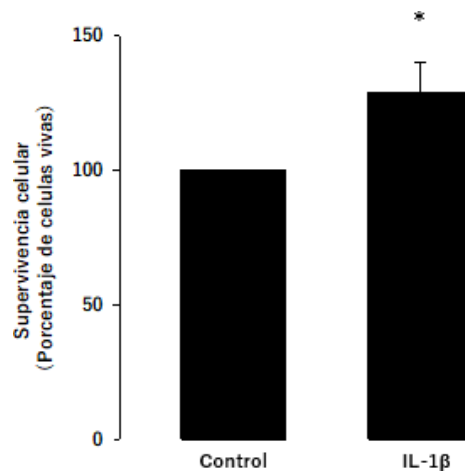
Una vez que se demostró que IL-1 $\beta$  a una concentración de 10 ng/ml por 24 horas, ejerce un efecto estimulador sobre la expresión del ARNm que codifica para BIRC3, se procedió a determinar si este efecto depende de la concentración de esta citocina, así como de la duración del tratamiento. Para realizar la curva dosis-efecto, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de IL-1 $\beta$ : 1, 5, 10, 20 y 40 ng/ml por 24 horas. Al finalizar el tratamiento, se aisló y purificó el ARN total para los ensayos de RT-PCR de punto final. El apartado A de la figura 12 muestra que a partir de la concentración de 1 ng/ml se observa un incremento significativo en los niveles de expresión del ARNm que codifica para BIRC3, alcanzándose el efecto máximo a partir de la concentración de 10 ng/ml (160% con respecto a la condición control), manteniéndose hasta la concentración de 40 ng/ml. A partir de este resultado, se decidió utilizar la concentración de 10 ng/ml para la realización del curso temporal. Las células fueron mantenidas en presencia de 10 ng/ml de IL-1 $\beta$  a diferentes tiempos: 8, 12 y 24 horas. Interesantemente se observó, que en las primeras 8 horas de tratamiento, se incrementó casi tres veces la expresión del ARNm en comparación a la condición control, y que este nivel de expresión disminuía conforme aumentaba la duración del tratamiento con IL-1 $\beta$ , alcanzando a las 24 horas de tratamiento un incremento del 50%, muy parecido al observado en los experimentos iniciales (figura 12B).



**Figura 12| El efecto que IL-1β ejerce sobre ARNm de BIRC3 depende tanto de la concentración como del tiempo. A)** Se muestra una imagen representativa del resultado de la RT-PCR de punto final así como el grafico obtenido al haber realizado la densitometría y normalización de los datos experimentales para BIRC3, las células fueron tratadas por 24 horas a diferentes concentraciones de IL-1β: 1, 5 10, 20 y 40 ng/ml. **B)** Se muestra una imagen representativa del resultado de la RT-PCR, así como el grafico obtenido de la curva temporal después de tratar a las células U87MG a diferentes tiempos con 10 ng/ml de IL-1β: 8, 12 y 24 horas. Los valores graficados son el promedio con su error estándar de tres experimentos independientes, (\*) el valor de *p* es menor de 0.05. La normalización se realizó con respecto a los niveles de expresión del ARNm que codifica para β-actina, el cual es considerado como control.

### 3. IL-1 $\beta$ estimula la capacidad de supervivencia de las células U87MG

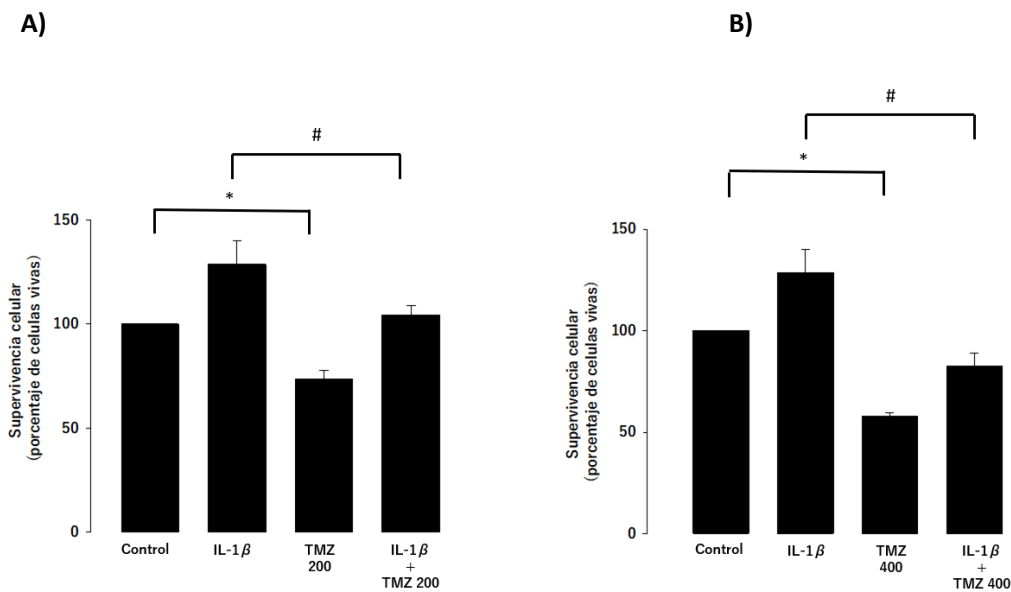
Una vez demostrado que IL-1 $\beta$  estimula de manera significativa la expresión del ARNm que codifica para la proteína inhibidora de la apoptosis BIRC3, se decidió evaluar si este efecto se ve reflejado como un aumento sobre la capacidad de supervivencia de las células U87MG. Las células se mantuvieron por 96 horas en presencia de 10 ng/ml de IL-1 $\beta$ , al finalizar el tiempo requerido, las células fueron cosechadas y a partir de la suspensión celular obtenida, se tomaron alícuotas para realizar el conteo de células vivas en una cámara de Neubauer. La figura 13 muestra que la presencia de IL-1 $\beta$  induce un aumento significativo del 27% sobre la viabilidad celular en comparación con las células control.



**Figura 13| IL-1 $\beta$  incrementa la supervivencia de las células U87MG.** Las células fueron mantenidas por 96 horas en presencia de 10 ng/ml de IL-1 $\beta$  para posteriormente ser contadas en cámara de Neubauer. Los valores graficados son el promedio con su error estándar de cuatro experimentos independientes normalizados con respecto a la condición control. (\*) el valor de  $p$  es menor de 0.05.

#### **4. IL-1 $\beta$ reduce el efecto citotóxico inducido por temozolamida sobre las células U87MG**

La temozolamida (TMZ) es un agente alquilante oral que se ha usado ampliamente como un quimioterapéutico eficaz de primera línea para el tratamiento de pacientes con glioblastoma multiforme, sin embargo, los pacientes comúnmente, durante el tratamiento llegan a desarrollar resistencia a TMZ, lo cual reduce de manera significativa la efectividad del tratamiento y con ello la supervivencia del paciente. Hasta el momento se ha observado que la presencia de IL-1 $\beta$  aumenta el porcentaje de células viables, muy probablemente debido a una reducción en su capacidad apoptótica, por la sobre-expresión de la proteína BIRC3. Considerando esta información, se propuso investigar si la presencia de IL-1 $\beta$  pudiera estar reduciendo la sensibilidad de las células U87MG al efecto citotóxico de TMZ. En otras palabras, se propuso determinar si la IL-1 $\beta$  es capaz de exacerba la capacidad de quimiorresistencia de las células derivadas de glioblastoma a TMZ. Para resolver el cuestionamiento, las células U87MG fueron pre-tratadas con 10 ng/ml de IL-1 $\beta$  por 48 horas, posteriormente se adicionaron diferentes concentraciones de TMZ: 200 y 400  $\mu$ M, ya sea en ausencia o presencia de IL-1 $\beta$  por 48 horas adicionales. Al finalizar el periodo de tratamiento, se realizó el conteo de las células viables para obtener el porcentaje de supervivencia en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  y TMZ respectivamente. La figura 14 muestra que la viabilidad de las células tratadas con 200  $\mu$ M (A) y 400  $\mu$ M de TMZ (B) disminuyó un 30% y un 40% respectivamente, en comparación con las células control, dejando en claro el efecto citotóxico de TMZ. Sin embargo, también se observó de manera interesante, que el pre-tratamiento de las células U87MG con IL-1 $\beta$  reduce de manera significativa el efecto citotóxico de TMZ, reflejándose como un aumento en la capacidad de supervivencia celular. La presencia de IL-1 $\beta$  previene por completo el efecto citotóxico de 200  $\mu$ M de TMZ (figura 14A), mientras que a la concentración de 400  $\mu$ M de TMZ en presencia de IL-1 $\beta$ , se reduce el efecto citotóxico del 40% a solo el 15% (figura 14B). Estos resultados dejan en claro que IL-1 $\beta$  reduce la sensibilidad de las células U87MG al efecto citotóxico de TMZ, es decir, estimula su capacidad de quimio-resistencia.

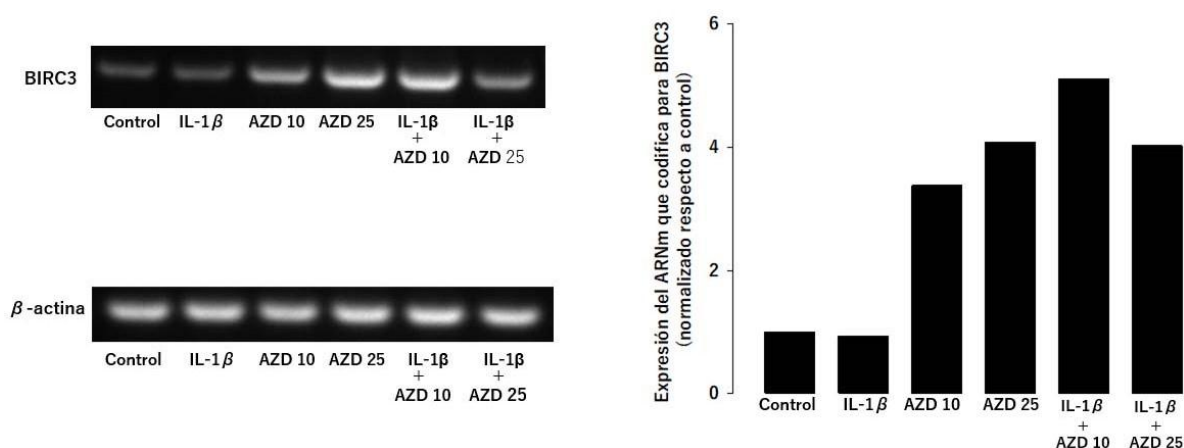


**Figura 14| IL-1 $\beta$  estimula la quimiorresistencia a temozolamida en las células U87MG.** Las células U87MG fueron tratadas con **A)** 10 ng/ml de IL-1 $\beta$  por 96 horas, TMZ 200  $\mu$ M por 48 horas y finalmente se realizó un pre-tratamiento de 48 horas con 10 ng/ml de IL-1 $\beta$  más 48 horas adicionales de TMZ 200  $\mu$ M en presencia de IL-1 $\beta$ . **B)** 10 ng/ml de IL-1 $\beta$  por 96 horas, TMZ 400  $\mu$ M por 48 horas y finalmente se realizó un pre- tratamiento con 10 ng/ml de IL-1 $\beta$  por 48 horas más 48 horas adicionales de TMZ 400  $\mu$ M. Una vez finalizados los tratamientos, las células viables fueron contadas en cámara de Neubauer. Los valores graficados son el promedio con su error estándar de cuatro experimentos independientes normalizados con respecto a la condición control. (\*), n=4, el valor de *p* es menor de 0.05.

## 5. AZD5582, mimético de Smac, incrementa la expresión del ARNm que codifica para BIRC3

Los miméticos de Smac, como es el AZD5582, se han empleado en el tratamiento del cáncer, sensibilizando las células tumorales al efecto de la quimioterapia, aumentando la expresión de proteínas apoptóticas, y reduciendo la de proteínas anti-apoptóticas. La expresión de BIRC3 y BICR5 en algunos tumores sólidos y hematológicos se ha visto reducida por la presencia de miméticos de Smac. Por lo tanto, se decidió investigar si la presencia de AZD5582 influye sobre los niveles de expresión del ARNm que codifica para BIRC3, ya sea solo o en presencia de IL-1 $\beta$ , ya que como se demostró anteriormente, dicha citocina favorece la supervivencia de

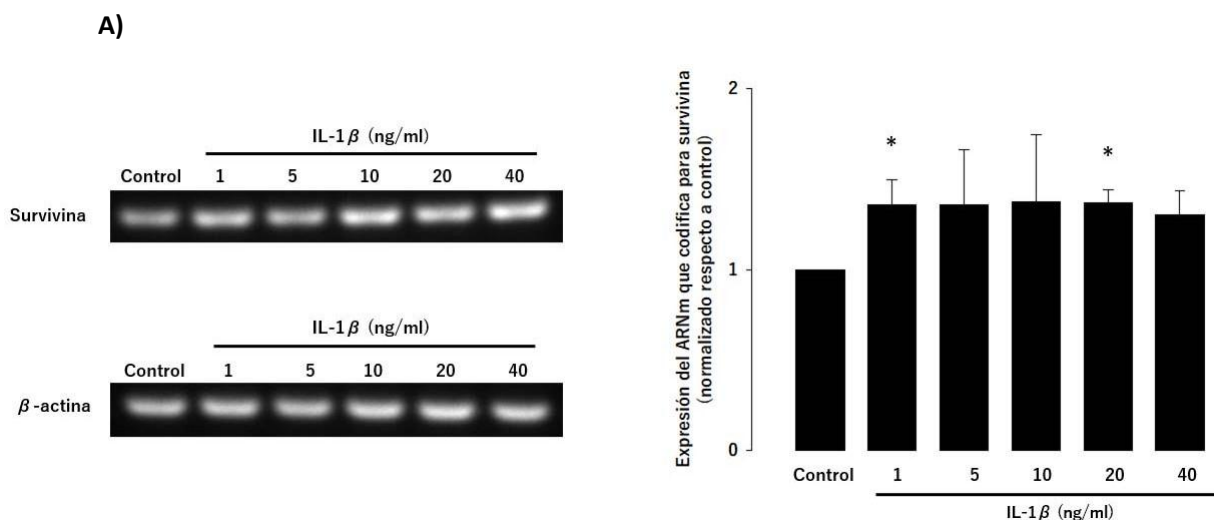
las células U87MG en presencia de temozolamida. Las células U87MG fueron mantenidas con 10 y 25  $\mu\text{M}$  de AZD5582 por 24 horas, en presencia o ausencia de 10ng/ml de IL-1 $\beta$ . Al finalizar el tratamiento se aisló y purificó el ARN total para los ensayos de expresión génica. La figura 15 muestra, contrario a lo que se esperaba, que el AZD5582 en las dos concentraciones evaluadas (10 y 25  $\mu\text{M}$ ), induce un incremento en los niveles de expresión del ARNm que codifica para BIRC3, tres y cuatro veces respectivamente, comparándolo con la condición control. La presencia conjunta de AZD5582 10  $\mu\text{M}$  y de IL- 1 $\beta$ , exacerba aún más los niveles de expresión de BIRC3, alcanzando un incremento de 5 veces, mientras que no se observa cambio alguno cuando se combina IL-1 $\beta$  con de 25  $\mu\text{M}$  de AZD5582. Estos resultados permiten sugerir que la célula tumoral puede desarrollar una respuesta compensatoria anti-apoptótica para contrarrestar el efecto apoptótico inducido por AZD5582, y que en presencia de IL-1 $\beta$  se ve potenciado.

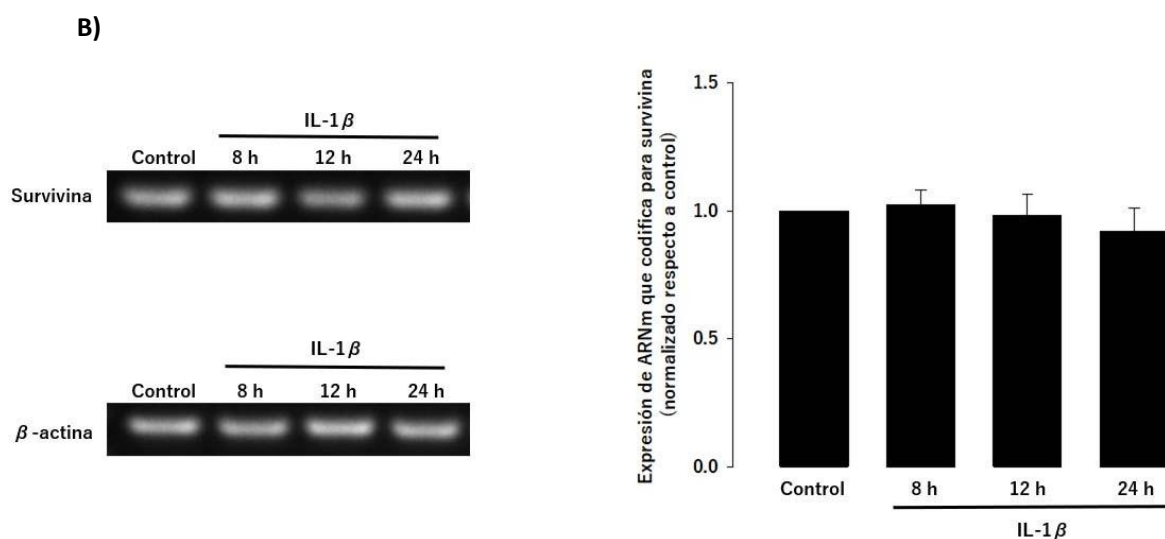


**Figura 15| EL mimético de Smac AZD5582 genera una tendencia al alza sobre el nivel de expresión del ARNm que codifica para BIRC3.** Se mantuvieron a las células U87MG en diferentes condiciones: 10  $\mu\text{M}$  de IL-1 $\beta$ , 10  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{M}$  de AZD5582 así como también una combinación de IL-1 $\beta$  con las diferentes concentraciones de AZD5582 durante 24 horas, posteriormente se procedió a realizar una densitometría de las imágenes obtenidas durante la electroforesis de dichos productos, se muestra una imagen representativa del gel de agarosa así como su grafico respectivo. n=2.

## 6. IL-1 $\beta$ estimula la expresión del ARNm que codifica para Survivina

Las evidencias científicas indican la sobre-expresión de survivina (BIRC5) en los estadios avanzados del cáncer, esta proteína inhibe la vía apoptótica, favoreciendo la supervivencia y proliferación de las células tumorales. El aumento en los niveles de expresión de survivina pronostica una supervivencia más corta en pacientes con glioma de alto grado. Debido a que se demostró previamente, que IL-1 $\beta$  favorece la expresión de BIRC3 en las células U87MG, se decidió evaluar, si la citocina actúa de la misma manera sobre la expresión del ARNm que codifica para survivina (BIRC5), las cuales pudieran actuar de manera coordinada para reducir la capacidad apoptótica de las células tumorales y favorecer su supervivencia. Las células U87MG fueron incubadas a diferentes concentraciones de IL-1 $\beta$ : 1, 5, 10, 20 y 40 ng/ml por 24 horas. Al finalizar el tratamiento se aisló y purificó al ARN total para los ensayos de RT-PCR de punto final. La figura 16A muestra que IL-1 $\beta$  induce una tendencia al alza sobre los niveles de expresión del ARNm que codifica para survivina, encontrándose un aumento significativo a las concentraciones de 1 y 20 ng/ml de IL-1 $\beta$ . La duración del tratamiento: 8, 12 y 24 horas a una concentración constante de 10 ng/ml de IL-1 $\beta$ , no modifica el nivel de expresión de survivina, siendo necesario realizar otros ensayos de curso temporal, usando diferentes concentraciones de la citocina pro-inflamatoria (figura 16B).



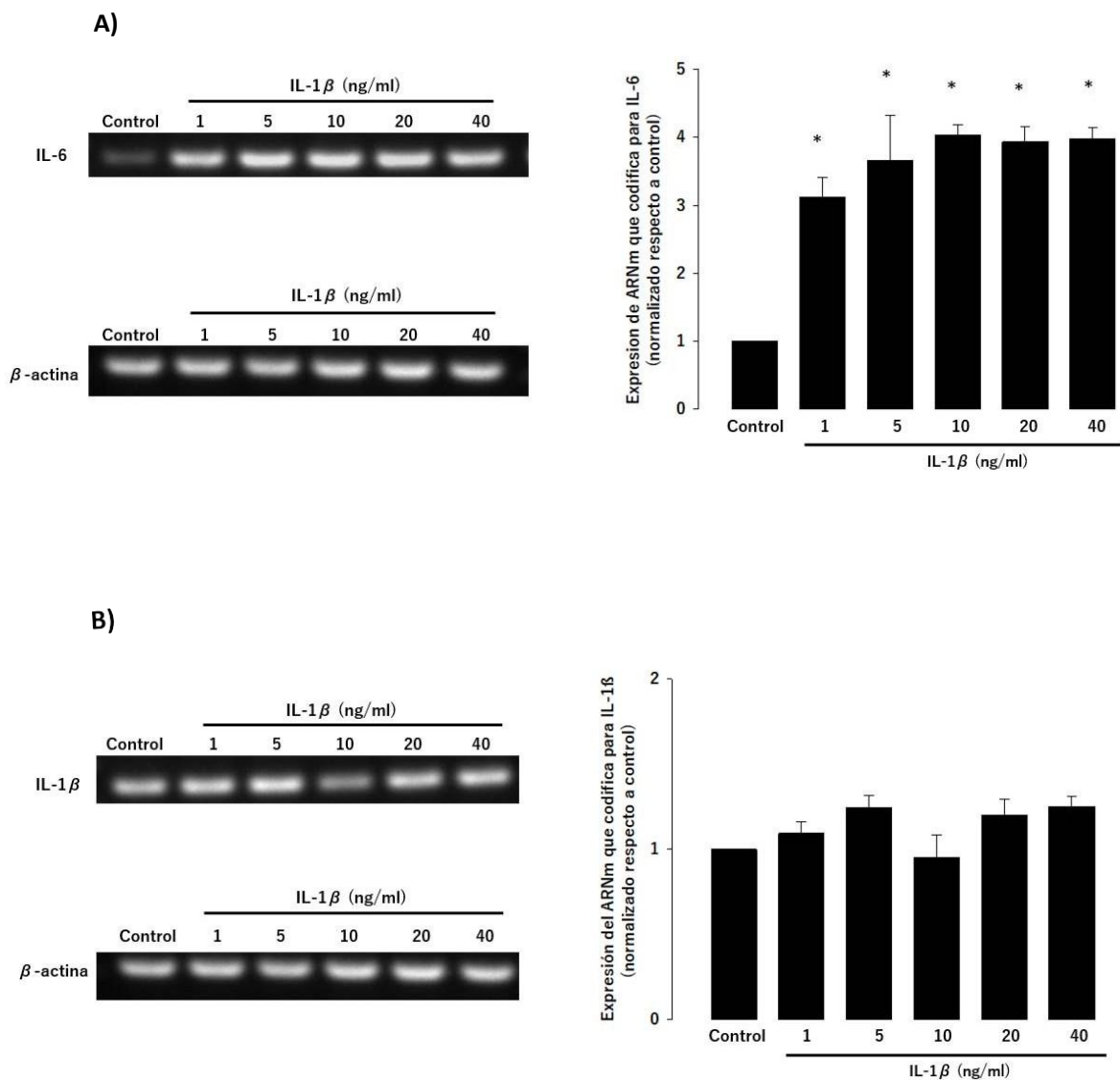


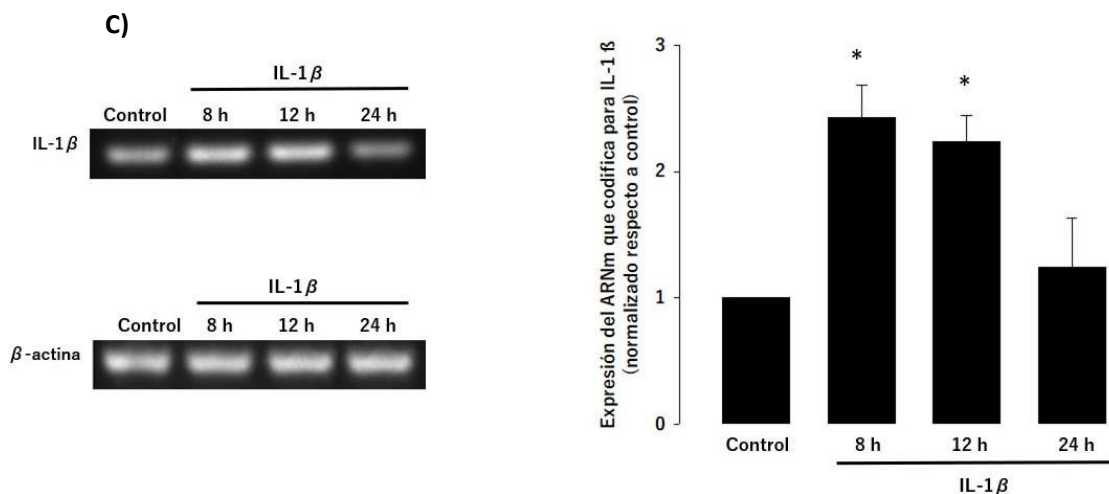
**Figura 16| 1 y 20 ng/ml de IL-1 $\beta$  aumentan el nivel de expresión del ARNm de Survivina.** Se cultivaron a las células **A)** con diferentes concentraciones de IL-1 $\beta$  (1, 5, 10, 20 y 40 ng/ml) durante 24 horas. **B)** con 10 ng/ml de IL-1 $\beta$  durante 8, 12 y 24 horas. Transcurrido ese tiempo se realizó RT-PCR de punto final para determinar el nivel de expresión del ARNm que codifica para survivina. Se muestra una imagen representativa para cada condición. Los valores graficados se expresan normalizados respecto a  $\beta$ -actina y la condición control, así como el error estándar, n= 3 experimentos independientes. \* Valor de p <0.05.

## 7. El tratamiento de IL-1 $\beta$ regula la expresión de IL-1 $\beta$ y de IL-6

Las células del sistema inmune como respuesta a la presencia de citocinas pro-inflamatorias, sintetizan y producen más citocinas como un mecanismo de retroalimentación positivo. Hay suficientes evidencias en la literatura que confirman que las células tumorales pueden llegar a actuar como células del sistema inmune: a) responder a citocinas pro-inflamatorias y, b) producir sus propias citocinas, para que estas puedan actuar de manera autocrina y paracrina en el microambiente tumoral. Con esta información, se propuso investigar, si la presencia de IL-1 $\beta$  modifica la expresión de su propio ARNm y de la citocina pro-inflamatoria IL-6. Las células U87MG fueron incubadas a diferentes concentraciones de IL-1 $\beta$ : 1, 5, 10, 20 y 40 ng/ml por 24 horas. Al finalizar el tratamiento se aisló y purificó al ARN total para los ensayos de RT-PCR de punto final. La figura 17A muestra que IL-1 $\beta$  induce un incremento significativo sobre los niveles de expresión del ARNm que codifica para IL-6, a partir de la

concentración de 1 ng/ml, manteniéndose su efecto máximo hasta la concentración de 40 ng/ml, casi cuatro veces con respecto a la condición control. La presencia de IL-1 $\beta$  regula su propia expresión de manera más moderada, observándose solamente un incremento significativo a las concentraciones de 5 y 40 ng/ml de IL-1 $\beta$  (figura 17B). La duración del tratamiento: 8, 12 y 24 horas a una concentración constante de 10 ng/ml de IL-1 $\beta$ , no modifica su nivel de expresión (figura 17C).

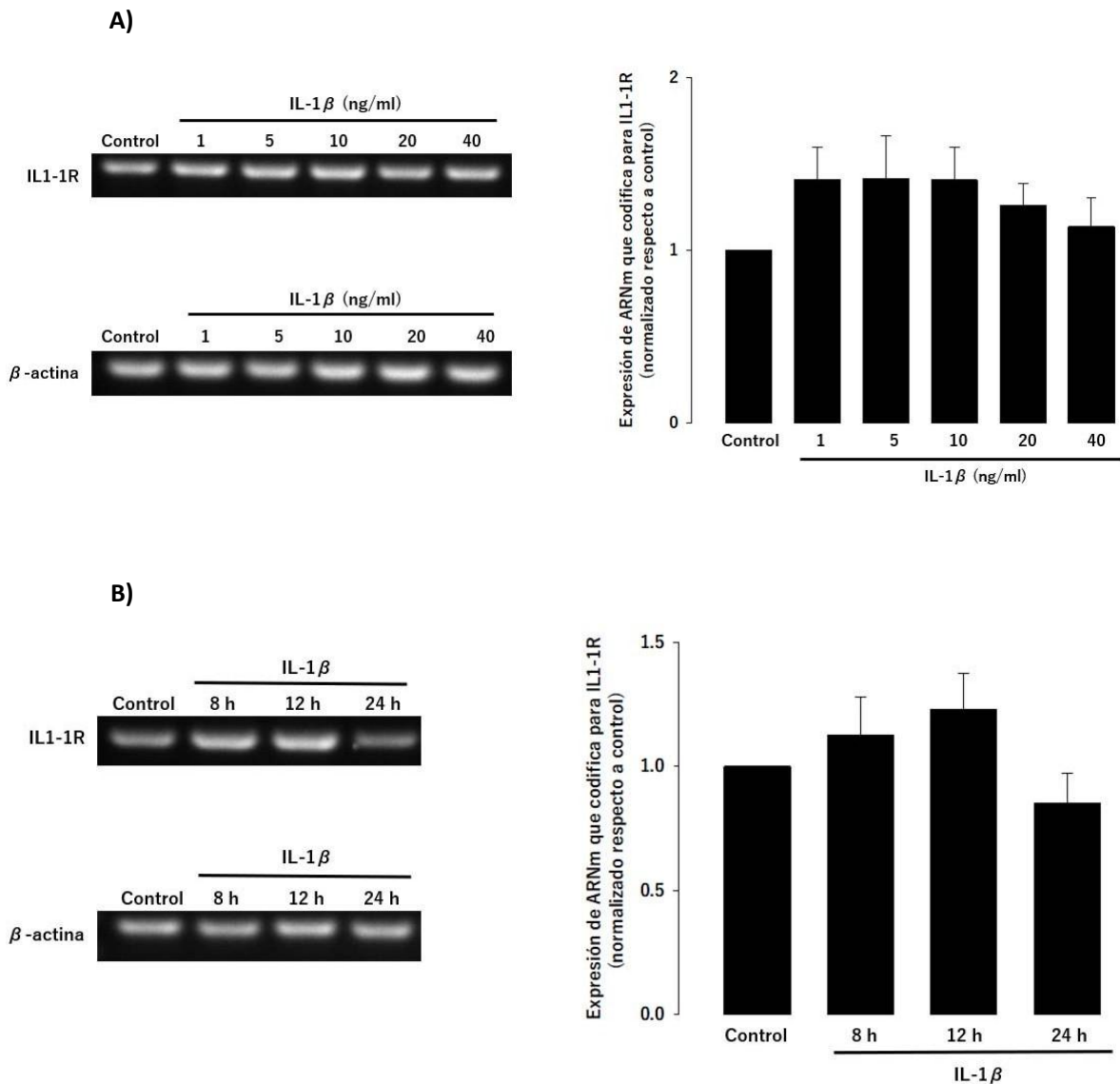




**Figura 17| Efecto de IL-1 $\beta$  sobre el nivel de expresión del ARNm que codifica para citocinas proinflamatorias.** Las células U-87-MG se mantuvieron **A)** y **B)** en presencia de diferentes concentraciones de IL-1 $\beta$  (1, 5, 10, 20 y 40 ng/ml) por 24 horas, en **A)** se midió el efecto sobre IL-6 y en **B)** sobre la propia IL-1 $\beta$ . Se muestran imágenes representativas de los geles de agarosa de IL-6 e IL-1 $\beta$  respectivamente. **C)** se trataron a las células con 10 ng/ml de IL-1 $\beta$  a diferentes tiempos (8, 12 y 24 horas) y se midió el nivel de expresión del ARNm que codifica para IL-1 $\beta$ . Los valores graficados son el promedio con su error estándar de tres experimentos independientes, (\*) el valor de *p* es menor de 0.05. La normalización se realizó con respecto a los niveles de expresión del ARNm que codifica para  $\beta$ -actina, el cual es considerado como control.

## 8. IL-1 $\beta$ no regula la expresión del ARNm que codifica para el receptor de IL-1

Una característica común de los receptores de moléculas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , es que pueden ser regulados por su propio ligando, por lo que se decidió evaluar si ocurría lo mismo en las células U87MG. La figura 18 muestra que el nivel de expresión del ARNm que codifica para IL-1 (IL-1R) no depende de la concentración de IL-1 $\beta$  y tampoco de la duración del tratamiento.



**Figura 18** Las células U87MG expresan el ARNm que codifica para el receptor de IL-1. Las células U-87 MG se mantuvieron en condiciones de cultivo control, cuando alcanzaron una confluencia del 80% se procedió a tratar a las células **A)** con diferentes concentraciones de IL-1β (1, 5, 10, 20 y 40 ng/ml) y **B)** con 10 ng/ml de IL-1β a diferentes tiempos: 8, 12 y 24 horas. Se aisló y purificó el ARN total y por RT-PCR de punto final (35 ciclos) se determinó la presencia del ARN que codifica para la isoforma IL-1R1. Los valores graficados son el promedio con su error estándar de tres experimentos independientes, (\*) el valor de *p* es menor de 0.05. La normalización se realizó con respecto a los niveles de expresión del ARNm que codifica para β-actina, el cual es considerado como control.

## DISCUSIÓN

La resistencia terapéutica es un sello distintivo del glioblastoma multiforme (GBM) que hace que la recurrencia de la enfermedad sea inevitable. A pesar de los avances en las estrategias multimodales de resección quirúrgica, radioterapia y quimioterapia con temozolamida (TMZ), la mediana de supervivencia de los pacientes recién diagnosticados ronda los 14 meses (Stupp *et al.*, 2005). Además, el pronóstico es marcadamente sombrío para los pacientes con GBM recurrente, donde a menudo se obtiene una mediana de supervivencia de 3 a 9 meses utilizando quimioterapia estándar con bevacizumab un anticuerpo monoclonal que se une a VEGF (Wong *et al.*, 1999; Yung *et al.*, 2000) y tasas de supervivencia libres de progresión a 6 meses del 15 a 16% (Lamborn *et al.*, 2008).

La evasión de la apoptosis y el microambiente tumoral es fundamental para los diferentes tipos de cáncer en general y su resistencia a los tratamientos (Hanahan & Weinberg, 2011) y GBM no es una excepción. La progresión del glioma se ha relacionado con el microambiente tumoral que está influenciado por múltiples células inflamatorias infiltrantes, las vías de señalización entre estos diversos tipos de células son complejas e involucran numerosas citocinas que funcionan tanto de manera paracrina como autocrina, tal es el caso de la IL-1 $\beta$  (Fossati *et al.*, 1999; Murat *et al.*, 2009). En el presente trabajo describimos la participación de la IL-1 $\beta$  sobre la expresión de la proteína inhibidora de la apoptosis (IAP) BIRC3, así como su posible papel en la quimiorresistencia a TMZ de las células de glioblastoma multiforme humano U87MG.

Los gliomas *in vivo* crecen en un microambiente altamente complejo. La microglía y los astrocitos se encuentran entre las células cerebrales implicadas en facilitar el crecimiento, la invasión, la angiogénesis y la vigilancia antitumoral del glioma (Charles *et al.*, 2011; Heimberger & Sampson, 2011). De los mediadores solubles que produce la microglía activada, IL-1 juega un papel particularmente importante en la activación de las células de glioma y en el inicio de la cascada neuroinflamatoria en el SNC (Basu *et al.*, 2004; Mrak *et al.*, 2001; Simi *et al.*, 2007). Además, la alta expresión de BIRC3 se ha correlacionado con una disminución de la supervivencia libre de progresión en pacientes con glioma de alto grado (Gressot *et al.*, 2017), así como en pacientes con GBM (Wang *et al.*, 2016) e incluso se ha sugerido a BIRC3 como un indicador pronóstico para pacientes con carcinoma hepatocelular (Cao *et al.*, 2018).

Por ello consideramos como primer paso investigar el efecto que la molécula proinflamatoria

IL-1 $\beta$  tiene sobre el nivel de expresión del ARNm que codifica para BIRC3 y encontramos que esta interleucina aumenta aproximadamente un 50% la expresión de BIRC3, estos datos son concordantes con los encontrados por el grupo de Mendoza *et al.*, quienes demostraron en una línea celular de cáncer de mama que IL-1 $\beta$  induce la expresión de genes relacionados con la quimiorresistencia dentro de los cuales se encuentra BIRC3 (Mendoza *et al.*, 2017). Posteriormente quisimos determinar si tanto la concentración como la duración del tratamiento con IL-1 $\beta$  en nuestro modelo experimental, las células U87MG alteraba el nivel de expresión de BIRC3, y encontramos al igual que el grupo de Cheung que a pesar de que ellos midieron el nivel de expresión a nivel de proteína y nosotros a nivel de ARNm que existía un aumento significativo de BIRC3 desde la concentración de 1ng/ml (Cheung *et al.*, 2010), sin embargo observamos que el efecto máximo se daba en la concentración de 10 ng/ml y que el aumento de la expresión dependía también del tiempo del tratamiento ya que durante las primeras 8 horas se observó un aumento de hasta casi 4 veces mientras que a las 24 horas el aumento se reducía a un 50%. Es importante aclarar que las células de glioblastoma humano son sumamente sensibles a la estimulación con IL-1 (Tarassishin & Lee, 2013) lo cual puede explicar porque desde una concentración baja (1 ng/ml) encontramos un efecto sobre el nivel de expresión del ARNm de BIRC3.

Se sabe que las proteínas inhibidoras de la apoptosis ejercen un control crítico sobre el segmento terminal de la apoptosis que conduce a la evasión de la apoptosis (Wang *et al.*, 2016) y promueven la supervivencia celular en diferentes tipos de cáncer (Altieri, 2010) por ello una vez que demostramos que IL-1 $\beta$  aumentaba la expresión de BIRC3 investigamos si esta citocina era capaz de modificar la supervivencia de las células U87MG, para ello incubamos a las células en presencia de 10 ng/ml de IL-1 $\beta$  por 96 horas y al realizar conteo celular de las células viables observamos que las células tratadas aumentaron un 27% la supervivencia en comparación de las células control.

El tratamiento con TMZ y radioterapia (RT) son el paradigma de atención estándar actualmente establecido para todos los pacientes con GBM recién diagnosticado (Stupp *et al.*, 2005), sin embargo, también se han propuestos otros métodos como lo son las nitrosoureas que han demostrado la capacidad de destruir células de glioma *in vitro*; sin embargo, la vida media breve (~20 minutos) y la toxicidad sistémica de estas sustancias químicas limitan su uso clínico. Como alternativa, se ha utilizado la implantación de obleas de polímero impregnadas de carmustina (3-bis (2-cloroetilo)-1-nitrosourea) (oblas Gliadel®) dentro de la cavidad quirúrgica para liberar lentamente el agente quimioterapéutico localmente durante un período

de 2 a 3 semanas (Brem *et al.*, 1995). Los ensayos de fase III han demostrado que la implantación de oblea Gliadel® después de la resección es un método seguro y eficaz para tratar los GBM recién diagnosticados y recurrentes (Westphal *et al.*, 2003).

Wang y colaboradores identificaron a BIRC3 como un sustituto de pronóstico sólido para la resistencia al tratamiento con TMZ y RT en pacientes con GBM y demostraron que estos mismos tratamientos inducen una regulación positiva de la expresión del gen BIRC3 (Wang *et al.*, 2016). El grupo de Wagner evaluó la viabilidad celular de diferentes líneas de glioma tras el tratamiento con varios medicamentos contra el cáncer, encontrando que el efecto que ejerce TMZ sobre la viabilidad de las células U87MG es dependiente de la dosis y que a partir de concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  existe una disminución del 20% de la viabilidad en comparación con las células control y con la concentración de 600  $\mu\text{M}$  la viabilidad disminuía un 40% (Wagner *et al.*, 2013). A partir de estos datos utilizamos TMZ a concentraciones de 200 y 400  $\mu\text{M}$  para tratar a nuestras células y determinar el efecto que tenía sobre la viabilidad celular, los resultados que obtuvimos fueron similares ya que la viabilidad celular se redujo un 25% y un 40% para las concentraciones de 200 y 400  $\mu\text{M}$  de TMZ respectivamente, cabe recalcar que el grupo de Wargner trato a sus células por 144 horas con este fármaco mientras que nosotros solo lo hicimos por 48 horas. Algo novedoso que reportamos es que cuando las células fueron pretratadas con IL-1 $\beta$  y posteriormente tratadas con una combinación de TMZ e IL-1 $\beta$  por 48 horas más, la viabilidad celular no se vio tan afectada por la citotoxicidad del fármaco, inclusive a una concentración de 200  $\mu\text{M}$  con 10 ng/ml de IL-1 $\beta$  la viabilidad se recuperó a un nivel igual que las células control que no fueron tratadas con ningún fármaco, lo que nos indica que IL-1 $\beta$  de alguna manera genera una quimiorresistencia a TMZ y que podría estar relacionado con la sobreexpresión de BIRC3.

Los compuestos miméticos de Smac (SM) son una clase de tratamientos experimentales contra el cáncer que se dirigen contra cIAP-1/2 y XIAP (LaCasse *et al.*, 2008; Flygare & Fairbrother, 2010). El modo de acción de los miméticos en células cancerosas sensibles implica la unión de SM a los motivos BIR de las cIAP, lo que induce la activación de los dominios ligasa E3 de las cIAP, generando su autoubiquitilación y posterior degradación proteosomal (Gaither *et al.*, 2007; Vince *et al.*, 2007). Diversos estudios han demostrado que los SM disminuyen la quimiorresistencia de las células tumorales a los quimioterapéuticos, por ejemplo, BV6 sensibilizo a las células de glioblastoma a Drozitumab esto a través de la inhibición de las proteínas IAP (Cristofanon *et al.*, 2015), este mismo SM es capaz de sensibilizar a las células de GMB a la citotoxicidad inducida por TMZ (Wegber *et al.*, 2012), mientras que el SM

AEG40730 que se une a cIAP1/2, facilita su autoubiquitilación y degradación proteosomal mejorando de esta manera la apoptosis celular (Bertrand *et al.*, 2008). De manera complementaria utilizamos al SM AZD5582 tanto en presencia como ausencia de IL-1 $\beta$  durante 24 horas, nuestros resultados preliminares indican que el mimético de Smac no interfiere con la transcripción de BIRC3 y que al contrario estimula la sobreexpresión del ARNm que codifica para BIRC3 con un mínimo de 3 veces a diferencia de las células no estimuladas, sorprendentemente cuando las células son cotratadas con IL-1 $\beta$  y AZD5582 a una concentración de 10  $\mu$ M se potencia el efecto sobre la expresión de BIRC3 a comparación de las células que solo fueron tratadas con el SM, a partir de estos datos nuestra propuesta es que como SM AZD5582 se une a la proteína BIRC3 y genera su degradación, las células tumorales generan más ARNm que codifica para esta proteína como mecanismo de defensa para evitar su muerte celular.

Survivina al igual que BIRC3 es otra IAP involucrada en la inhibición de la apoptosis y la regulación del ciclo celular, estos atributos hacen que survivina sea una proteína única que exhibe funciones divergentes, es decir regula la proliferación y la muerte celular (Himani *et al.*, 2016) de la misma manera muchos de los tejidos tumorales sobre-expresan survivina en comparación con tejidos sanos controles (Velculescu *et al.*, 1999) y esta sobreexpresión se correlaciona con la progresión del tumor, resistencia a los medicamentos, periodos de supervivencia más cortos y mal pronóstico (Li, 2013; Wu *et al.*, 2005). De acuerdo con nuestros experimentos encontramos que IL-1 $\beta$  a una concentración de 1 y 20 ng/ml aumenta la expresión del ARNm que codifica para survivina, siendo uno de los primeros grupos en reportar que IL-1 $\beta$  es capaz de aumentar la expresión de esta otra IAP.

La activación de la familia de NF $\kappa$ B inducen rápidamente la regulación positiva de genes inflamatorios y antiapoptóticos, incluidos BIRC3, IL-6 e IL-1 $\beta$  (Wang *et al.*, 1998). Las citocinas proinflamatorias maestras IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  activan varias vías de señalización que dan como resultado la estabilización de IL-6 y el aumento de la biosíntesis de IL-6 (Spooren *et al.*, 2011). El papel crucial de la IL-6 en el desarrollo del glioma fue demostrado de manera convincente por Weissenberger *et al.*, quienes observaron que los ratones transgénicos que expresaban el oncogen src en astrocitos no desarrollaron GBM en un entorno deficiente de IL-6 (Weissenberger *et al.*, 2014). La activación de STAT3 mediada por IL-6 fomenta la proliferación e inhibe la apoptosis de las células GBM (Rahaman *et al.*, 2002) incluidas las células madre GBM donde STAT3 se identificó como un mediador posterior de la señalización

de IL-6 pro-supervivencia (Wang *et al.*, 2009). Ya que IL-1 $\beta$  al unirse a su receptor es capaz de activar al factor de transcripción NF $\kappa$ B y regular positivamente la transcripción de genes como IL-6, medimos el nivel de expresión del ARNm que codifica para esta interleucina a partir de varias concentraciones de IL-1 $\beta$  y al igual que el grupo de Tanabe observamos que desde una concentración de 1 ng/ml de IL-1 $\beta$  existe una estabilización del ARNm que codifica para IL-6 tres veces en comparación a la células control y que este aumento llega a su máximo en la concentración de 10 ng/ml donde aumenta hasta 4 veces. La evidencia también respalda que las células de glioma in vivo e in vitro son capaces de producir IL-1 (Lu *et al.*, 2007; Sasaki *et al.*, 1998) y que la propia IL-1 es un potente inductor de la producción de IL-1 en células mieloides y en células de glioma humano (Lee *et al.*, 1993; John *et al.*, 2003). Estos antecedentes nos llevaron a investigar si en nuestro modelo celular la IL-1 $\beta$  era capaz de regular a la alza su propia transcripción encontrando que solo a las concentraciones de 5 y 40 ng/ml se aumentaba su expresión de manera significativa, esto a las 24 horas, sin embargo, al realizar un curso temporal con la concentración de 10 ng/ml concentración a la cual no existía un aumento en las transcripción de esta molécula a las 24 horas encontrábamos una respuesta positiva a las 12 y 8 horas de tratamiento ya que la expresión aumentaba un poco más de 2 veces en comparación de las células que no estaban tratadas, esta demostración nos ayuda a afirmar que las células de glioblastoma humano son capaces de producir su propia IL-1 $\beta$ . Finalmente reportamos en el presente trabajo que IL-1 $\beta$  no tiene ningún efecto sobre la expresión de su propio receptor, sin embargo, existe una tendencia al aumento pero deberán realizarse más experimentos para confirmar los resultados. Los antecedentes demuestran que al igual que nosotros se han observado la expresión de IL-1R en células U87MG y que este receptor también se encuentra en tejido y células de GBM (Sharma *et al.*, 2011; Yeung *et al.*, 2013).

Hasta el momento no se utilizan inhibidores de IL-1 $\beta$  para el tratamiento contra el cáncer sin embargo existen diferentes propuestas de fármacos que se encuentran ya en ensayos clínicos y que inhiben a diferentes niveles a esta interleucina por ejemplo, dado que la IL-1 $\beta$  se somete a un mecanismo distinto de procesamiento y secreción, la modulación del eje de la IL-1 no solo puede lograrse a través de estrategias convencionales como antagonistas del receptor, anticuerpos bloqueadores del receptor (Anakinra) y anticuerpos neutralizantes (Canakinumab y Xilonix) si no que puede también lograrse mediante la inhibición del procesamiento de IL-1 $\beta$  mediado por inflamosoma (Schuh *et al.*, 2019) dentro de los cuales esta OLT1177, un inhibidor potente y específico de NLRP3 que ha mostrado hasta ahora buenos perfiles de

seguridad (Marchetti *et al.*, 2018) Sin embargo, actualmente no hay ensayos clínicos que evalúen los efectos potenciales de la inhibición del inflamasoma en el cáncer.

La promiscuidad de los receptores de ligandos de la familia IL-1 abre la puerta a otro enfoque de tratamiento más generalizado. La proteína accesoria del receptor de IL-1 (IL-1RAcP, también denominada IL-1R3), por ejemplo, está críticamente involucrada en la mediación de las funciones no solo de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , sino también de IL-33 y las diferentes IL-36 (IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$ , IL-36 $\gamma$ ) (Garlanda *et al.*, 2013). El tratamiento con anticuerpos monoclonales dirigidos a IL-1RAcP puede inhibir la función de todas las citoquinas mencionadas (Højen *et al.*, 2019). CAN04, un anticuerpo totalmente humanizado para IL-1RAcP se encuentra actualmente bajo investigación para el tratamiento de diferentes tumores sólidos (Millrud *et al.*, 2020). Optar por alguno de estos fármacos nos ayudaría a comprender mejor el efecto que IL-1 $\beta$  tiene sobre la quimiorresistencia en las células U87MG.

## CONCLUSIONES

- IL-1 $\beta$  estimula la expresión del ARNm que codifica para la proteína anti-apoptótica BIRC3 y este efecto depende tanto de la concentración como de la duración del tratamiento
- IL-1 $\beta$  altera la capacidad apoptótica de las células U87MG, aumentando su capacidad de supervivencia.
- El pretratamiento de las células U87MG con IL-1 $\beta$  reduce el efecto citotóxico que ejerce temozolamida
- El mimético de Smac AZD5582 incrementa el ARNm que codifica para BIRC3 y este efecto se ve potenciado cuando las células son co-tratadas con IL-1 $\beta$
- IL-1 $\beta$  estimula la expresión del ARNm que codifica para Survivina, IL-6 y para la propia IL-1 $\beta$
- Las células U87MG expresan el ARNm del receptor de IL-1R1

# BIBLIOGRAFIA

Adrain, C. (2001). Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *The EMBO Journal*, 20(23), 6627-6636. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.23.6627>

Abbas, A. K. (2015). *INMUNOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR* (8a. ed.). BARCELONA: ELSEVIER.

Aguirre-Cruz, L., Rangel-López, E., de la Cruz-Aguilera, D. L., Rodríguez-Pérez, C. E., Ruano, L., Velásquez-Pérez, L., ... & Sotelo, J. (2016). Distribución histórica de neoplasias del sistema nervioso central en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México. *Salud Pública de México*, 58(2), 171-178.

Aguirre-Cruz, L., Rodríguez-Pérez, C. E., de la Cruz-Aguilera, D. L., Acosta-Castillo, G. I., Ruano-Calderón, L., Martínez-Moreno, M., & Sotelo, J. (2020). Descriptive epidemiology and frequency variations of astrocytic tumors in the National Institute of Neurology and Neurosurgery of Mexico. *Salud Pública de México*, 62(3), 255-261.

Al-kharboosh, R., ReFaey, K., Lara-Velazquez, M., Grewal, S. S., Imitola, J., & Quiñones-Hinojosa, A. (2020). Inflammatory Mediators in Glioma Microenvironment Play a Dual Role in Gliomagenesis and Mesenchymal Stem Cell Homing: Implication for Cellular Therapy. *Mayo Clinic Proceedings: Innovations, Quality & Outcomes*, 4(4), 443-459. <https://doi.org/10.1016/j.mayocpiqo.2020.04.006>

Altieri, D. C. (2010). Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochemical Journal*, 430(2), 199-205. <https://doi.org/10.1042/BJ20100814>

Arora, A., & Somasundaram, K. (2019). Glioblastoma vs temozolomide: Can the red queen race be won? *Cancer Biology & Therapy*, 20(8), 1083-1090. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1599662>

Atkins, R. J., Ng, W., Stylli, S. S., Hovens, C. M., & Kaye, A. H. (2015). Repair mechanisms help glioblastoma resist treatment. *Journal of Clinical Neuroscience*, 22(1), 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2014.09.003>

Basu, A., Krady, J. K., & Levison, S. W. (2004). Interleukin- 1: a master regulator of neuroinflammation. *Journal of neuroscience research*, 78(2), 151-156. <https://doi.org/10.1002/jnr.20266>

Brandes, A. A., Franceschi, E., Tosoni, A., Benevento, F., Scopece, L., Mazzocchi, V., ... & Ermani, M. (2009). Temozolomide concomitant and adjuvant to radiotherapy in elderly patients with glioblastoma: correlation with MGMT promoter methylation status. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 115(15), 3512-3518.

Benetatos, C. A., Mitsuuchi, Y., Burns, J. M., Neiman, E. M., Condon, S. M., Yu, G., Seipel, M. E., Kapoor, G. S., LaPorte, M. G., Rippin, S. R., Deng, Y., Hendi, M. S., Tirunahari, P. K., Lee, Y.-H., Haimowitz, T., Alexander, M. D., Graham, M. A., Weng, D., Shi, Y., ... Chunduru, S. K. (2014). Birinapant (TL32711), a Bivalent SMAC Mimetic, Targets TRAF2-Associated cIAPs, Abrogates TNF-Induced NF- $\kappa$ B Activation, and Is Active in Patient-Derived Xenograft Models. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(4), 867-879. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0798>

Berger, R., Jennewein, C., Marschall, V., Karl, S., Cristofanon, S., Wagner, L., Vellanki, S. H., Hehlhans, S., Rödel, F., Debatin, K.-M., Ludolph, A. C., & Fulda, S. (2011). NF- $\kappa$ B Is Required for Smac Mimetic-Mediated Sensitization of Glioblastoma Cells for  $\gamma$ -Irradiation-Induced Apoptosis. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(10), 1867-1875. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0218>

Bertrand, M. J. M., & Vandenabeele, P. (2011). The Ripoptosome: Death Decision in the Cytosol. *Molecular Cell*, 43(3), 323-325. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.007>

Bianchi, K., & Meier, P. (2009). A Tangled Web of Ubiquitin Chains: Breaking News in TNF-R1 Signaling. *Molecular Cell*, 36(5), 736-742. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.11.029>

Birnbaum, M. J., Clem, R. J., & Miller, L. K. (1994). An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *Journal of Virology*, 68(4), 2521-2528. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.4.2521-2528.1994>

Bonizzi, G., & Karin, M. (2004). The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology*, 25(6), 280-288. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.03.008>

- Bondy, M. L., Scheurer, M. E., Malmer, B., Barnholtz- Sloan, J. S., Davis, F. G., Il'Yasova, D., ... & Brain Tumor Epidemiology Consortium. (2008). Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer*, 113(S7), 1953-1968.
- Braganza, M. Z., Kitahara, C. M., Berrington de Gonzalez, A., Inskip, P. D., Johnson, K. J., & Rajaraman, P. (2012). Ionizing radiation and the risk of brain and central nervous system tumors: A systematic review. *Neuro-Oncology*, 14(11), 1316-1324. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos208>
- Bremnes, R. M., Al-Shibli, K., Donnem, T., Sirera, R., Al-Saad, S., Andersen, S., ... & Busund, L. T. (2011). The role of tumor-infiltrating immune cells and chronic inflammation at the tumor site on cancer development, progression, and prognosis: emphasis on non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 6(4), 824-833.
- Cao, J., Qiu, J., Wang, X., Lu, Z., Wang, D., Feng, H., Li, X., Liu, Q., Pan, H., Han, X., Wei, J., Liu, S., & Wang, L. (2018). Identification of microRNA-124 in regulation of Hepatocellular carcinoma through BIRC3 and the NF- $\kappa$ B pathway. *Journal of Cancer*, 9(17), 3006-3015. <https://doi.org/10.7150/jca.25956>
- Carter, B. Z., Milella, M., Tsao, T., McQueen, T., Schober, W. D., Hu, W., Dean, N. M., Steelman, L., McCubrey, J. A., & Andreeff, M. (2003). Regulation and targeting of antiapoptotic XIAP in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 17(11), 2081-2089. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403113>
- Central Brain Tumor Registry of the United States. 2010. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2004-2006.
- Chai, J., Du, C., Wu, J.-W., Kyin, S., Wang, X., & Shi, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*, 406(6798), 855-862. <https://doi.org/10.1038/35022514>
- Charles, N. A., Holland, E. C., Gilbertson, R., Glass, R., & Kettenmann, H. (2011). The brain tumor microenvironment. *Glia*, 59(8), 1169-1180.
- Chi, A., & Komaki, R. (2010). Treatment of Brain Metastasis from Lung Cancer. *Cancers*, 2(4), 2100-2137. <https://doi.org/10.3390/cancers2042100>
- Choi, Y. E., Butterworth, M., Malladi, S., Duckett, C. S., Cohen, G. M., & Bratton, S. B. (2009). The E3 Ubiquitin Ligase cIAP1 Binds and Ubiquitinates Caspase-3 and -7 via Unique Mechanisms at Distinct Steps in Their Processing. *Journal of Biological Chemistry*, 284(19), 12772-12782. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807550200>
- Chu, Q., Vincent, M., Logan, D., Mackay, J. A., & Evans, W. K. (2005). Taxanes as first-line therapy for advanced non-small cell lung cancer: A systematic review and practice guideline. *Lung Cancer*, 50(3), 355-374. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2005.06.010>
- Cohen, S., Bruchim, I., Graiver, D., Evron, Z., Oron-Karni, V., Pasmanik-Chor, M., Eitan, R., Bernheim, J., Levavi, H., Fishman, A., & Flescher, E. (2013). Platinum-resistance in ovarian cancer cells is mediated by IL-6 secretion via the increased expression of its target cIAP-2. *Journal of Molecular Medicine*, 91(3), 357-368. <https://doi.org/10.1007/s00109-012-0946-4>
- Colton, C. A. (2009). Heterogeneity of Microglial Activation in the Innate Immune Response in the Brain. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 4(4), 399-418. <https://doi.org/10.1007/s11481-009-9164-4>
- Conte, D., Holcik, M., Lefebvre, C. A., LaCasse, E., Picketts, D. J., Wright, K. E., & Korneluk, R. G. (2006). Inhibitor of Apoptosis Protein cIAP2 Is Essential for Lipopolysaccharide-Induced Macrophage Survival. *Molecular and Cellular Biology*, 26(2), 699-708. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.2.699-708.2006>
- Conze, D. B., Albert, L., Ferrick, D. A., Goeddel, D. V., Yeh, W.-C., Mak, T., & Ashwell, J. D. (2005). Posttranscriptional Downregulation of c-IAP2 by the Ubiquitin Protein Ligase c-IAP1 In Vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 25(8), 3348-3356. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.8.3348-3356.2005>
- Cristofanon, S., Abhari, B. A., Krueger, M., Tchoghandjian, A., Momma, S., Calaminus, C., Vucic, D., Pichler, B. J., & Fulda, S. (2015). Identification of RIP1 as a critical mediator of Smac mimetic-mediated sensitization of glioblastoma cells for Drozitumab-induced apoptosis. *Cell Death & Disease*, 6(4), e1724-e1724. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.592>
- Curran, C. S., & Bertics, P. J. (2012). Eosinophils in glioblastoma biology. *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-11>
- Damgaard, R. B., Nachbur, U., Yabal, M., Wong, W. W.-L., Fiil, B. K., Kastirr, M., Rieser, E., Rickard, J. A., Bankovacki, A., Peschel, C., Ruland, J., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Kaufmann, T., Strasser, A., Walczak, H., Silke,

- J., Jost, P. J., & Gyrd-Hansen, M. (2012). The Ubiquitin Ligase XIAP Recruits LUBAC for NOD2 Signaling in Inflammation and Innate Immunity. *Molecular Cell*, 46(6), 746-758. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.04.014>
- Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell Death. *Cell*, 116(2), 205-219. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00046-7)
- Darding, M., Feltham, R., Tenev, T., Bianchi, K., Benetatos, C., Silke, J., & Meier, P. (2011). Molecular determinants of Smac mimetic induced degradation of cIAP1 and cIAP2. *Cell Death & Differentiation*, 18(8), 1376-1386. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.10>
- Day, C. L., Hinds, M. G., Norton, R. S., & Vaux, D. L. (1999). [No title found]. *Nature Structural Biology*, 6(7), 648-651. <https://doi.org/10.1038/10701>
- DiDonato, J. A., Mercurio, F., & Karin, M. (2012). NF- $\kappa$ B and the link between inflammation and cancer: NF- $\kappa$ B links inflammation and cancer. *Immunological Reviews*, 246(1), 379-400. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01099.x>
- Dogan, T., Harms, G. S., Hekman, M., Karreman, C., Oberoi, T. K., Alnemri, E. S., Rapp, U. R., & Rajalingam, K. (2008). X-linked and cellular IAPs modulate the stability of C-RAF kinase and cell motility. *Nature Cell Biology*, 10(12), 1447-1455. <https://doi.org/10.1038/ncb1804>
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., & Wang, X. (2000). Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition. *Cell*, 102(1), 33-42. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00008-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00008-8)
- Dueber, E. C., Schoeffler, A. J., Lingel, A., Elliott, J. M., Fedorova, A. V., Giannetti, A. M., Zobel, K., Maurer, B., Varfolomeev, E., Wu, P., Wallweber, H. J. A., Hymowitz, S. G., Deshayes, K., Vucic, D., & Fairbrother, W. J. (2011). Antagonists Induce a Conformational Change in cIAP1 That Promotes Autoubiquitination. *Science*, 334(6054), 376-380. <https://doi.org/10.1126/science.1207862>
- Eckelman, B. P., Salvesen, G. S., & Scott, F. L. (2006). Human inhibitor of apoptosis proteins: Why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Reports*, 7(10), 988-994. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400795>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Engels, E. A. (2008). Inflammation in the development of lung cancer: epidemiological evidence. *Expert review of anticancer therapy*, 8(4), 605-615.
- Feltham, R., Bettjeman, B., Budhidarmo, R., Mace, P. D., Shirley, S., Condon, S. M., Chunduru, S. K., McKinlay, M. A., Vaux, D. L., Silke, J., & Day, C. L. (2011). Smac Mimetics Activate the E3 Ligase Activity of cIAP1 Protein by Promoting RING Domain Dimerization. *Journal of Biological Chemistry*, 286(19), 17015-17028. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.222919>
- Flygare, J. A., & Fairbrother, W. J. (2010). Small-molecule pan-IAP antagonists: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents*, 20(2), 251-267. <https://doi.org/10.1517/13543770903567077>
- Fossati, G., Ricevuti, G., Edwards, S. W., Walker, C., Dalton, A., & Rossi, M. L. (1999). Neutrophil infiltration into human gliomas. *Acta Neuropathologica*, 98(4), 349-354. <https://doi.org/10.1007/s004010051093>
- Fu, P., Hu, B., Ma, X., Yang, Z., Yu, M., Sun, H., Huang, A., Zhang, X., Wang, J., Hu, Z., Zhou, C., Tang, W., Ning, R., Xu, Y., & Zhou, J. (2019). New insight into BIRC3: A novel prognostic indicator and a potential therapeutic target for liver cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(4), 6035-6045. <https://doi.org/10.1002/jcb.27890>
- Fulda, S., Meyer, E., & Debatin, K.-M. (2002). Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene*, 21(15), 2283-2294. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205258>
- Fulda, S., & Vucic, D. (2012). Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(2), 109-124. <https://doi.org/10.1038/nrd3627>
- Fulda, S., Wick, W., Weller, M., & Debatin, K.-M. (2002). Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nature Medicine*, 8(8), 808-815. <https://doi.org/10.1038/nm735>

Fundamentals of inflammation. Edited by Serhan CN, Ward PA and Gilroy DW. Cambridge 2010.

- Galluzzi, L., López-Soto, A., Kumar, S., & Kroemer, G. (2016). Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis. *Immunity*, *44*(2), 221-231. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.020>
- Gaither, A., Porter, D., Yao, Y., Borawski, J., Yang, G., Donovan, J., ... & Zavel, L. (2007). A Smac mimetic rescue screen reveals roles for inhibitor of apoptosis proteins in tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling. *Cancer research*, *67*(24), 11493-11498. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5173>
- Galvão, R. P., & Zong, H. (2013). Inflammation and Gliomagenesis: Bi-Directional Communication at Early and Late Stages of Tumor Progression. *Current Pathobiology Reports*, *1*(1), 19-28. <https://doi.org/10.1007/s40139-012-0006-3>
- Garlanda C., Dinarello C.A., Mantovani A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity*. 2013;39:1003–1018. doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.010
- Ghobrial, I. M., Witzig, T. E., & Adjei, A. A. (2005). Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *55*(3), 178-194. <https://doi.org/10.3322/canjclin.55.3.178>
- Gottfried, Y., Rotem, A., Lotan, R., Steller, H., & Larisch, S. (2004). The mitochondrial ARTS protein promotes apoptosis through targeting XIAP. *The EMBO Journal*, *23*(7), 1627-1635. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600155>
- Gramatzki, D., Roth, P., Rushing, E. J., Weller, J., Andratschke, N., Hofer, S., Korol, D., Regli, L., Pangalu, A., Pless, M., Oberle, J., Bernays, R., Moch, H., Rohrmann, S., & Weller, M. (2018). Bevacizumab may improve quality of life, but not overall survival in glioblastoma: An epidemiological study. *Annals of Oncology*, *29*(6), 1431-1436. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy106>
- Gressot, L. V., Doucette, T., Yang, Y., Fuller, G. N., Manyam, G., Rao, A., ... & Rao, G. (2017). Analysis of the inhibitors of apoptosis identifies BIRC3 as a facilitator of malignant progression in glioma. *Oncotarget*, *8*(8), 12695. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8657>
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, *140*(6), 883-899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>
- Gyrd-Hansen, M., Darding, M., Miasari, M., Santoro, M. M., Zender, L., Xue, W., Tenev, T., da Fonseca, P. C. A., Zvelebil, M., Bujnicki, J. M., Lowe, S., Silke, J., & Meier, P. (2008). IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF- $\kappa$ B as well as cell survival and oncogenesis. *Nature Cell Biology*, *10*(11), 1309-1317. <https://doi.org/10.1038/ncb1789>
- Gyrd-Hansen, M., & Meier, P. (2010). IAPs: From caspase inhibitors to modulators of NF- $\kappa$ B, inflammation and cancer. *Nature Reviews Cancer*, *10*(8), 561-574. <https://doi.org/10.1038/nrc2889>
- Häcker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell and Tissue Research*, *301*(1), 5-17. <https://doi.org/10.1007/s004410000193>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hao, Q., & Tang, H. (2018). Interferon- $\gamma$  and Smac mimetics synergize to induce apoptosis of lung cancer cells in a TNF $\alpha$ -independent manner. *Cancer Cell International*, *18*(1), 84. <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0579-y>
- Hebb, A., Moore, C., Bhan, V., Campbell, T., Fisk, J., Robertson, H., Thorne, M., Lacasse, E., Holcik, M., Gillard, J., Crocker, S., & Robertson, G. (2008). Expression of the inhibitor of apoptosis protein family in multiple sclerosis reveals a potential immunomodulatory role during autoimmune mediated demyelination. *Multiple Sclerosis Journal*, *14*(5), 577-594. <https://doi.org/10.1177/1352458507087468>
- Heimberger, A. B., & Sampson, J. H. (2010). Immunotherapy coming of age: what will it take to make it standard of care for glioblastoma?. *Neuro-oncology*, *13*(1), 3-13. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noq169>
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, *407*(6805), 770-776. <https://doi.org/10.1038/35037710>
- Hennessy, E. J., Adam, A., Aquila, B. M., Castriotta, L. M., Cook, D., Hattersley, M., Hird, A. W., Huntington, C., Kamhi, V. M., Laing, N. M., Li, D., MacIntyre, T., Omer, C. A., Oza, V., Patterson, T., Repik, G., Rooney, M. T., Saeh, J. C., Sha, L., ... Whitston, D. (2013). Discovery of a Novel Class of Dimeric Smac Mimetics as Potent IAP Antagonists Resulting in a Clinical Candidate for the Treatment of Cancer (AZD5582). *Journal of Medicinal Chemistry*, *56*(24), 9897-9919. <https://doi.org/10.1021/jm401075x>
- Hicks, D. G., Short, S. M., Prescott, N. L., Tarr, S. M., Coleman, K. A., Yoder, B. J., Crowe, J. P., Choueiri, T. K., Dawson, A. E., Budd, G. T., Tubbs, R. R., Casey, G., & Weil, R. J. (2006). Breast Cancers With Brain Metastases are

More Likely to be Estrogen Receptor Negative, Express the Basal Cytokeratin CK5/6, and Overexpress HER2 or EGFR: *The American Journal of Surgical Pathology*, 1097-1104. <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000213306.05811.b9>

Holland, E. C. (2000). A Mouse Model for Glioma: Biology, Pathology, and Therapeutic Opportunities. *Toxicologic Pathology*, 28(1), 171-177. <https://doi.org/10.1177/019262330002800122>

Hombach-Klonisch, S., Mehrpour, M., Shojaei, S., Harlos, C., Pitz, M., Hamai, A., Siemianowicz, K., Likus, W., Wiechec, E., Toyota, B. D., Hoshyar, R., Seyfoori, A., Sepehri, Z., Ande, S. R., Khadem, F., Akbari, M., Gorman, A. M., Samali, A., Klonisch, T., & Ghavami, S. (2018). Glioblastoma and chemoresistance to alkylating agents: Involvement of apoptosis, autophagy, and unfolded protein response. *Pharmacology & Therapeutics*, 184, 13-41. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.10.017>

Hu, S., & Yang, X. (2003). Cellular Inhibitor of Apoptosis 1 and 2 Are Ubiquitin Ligases for the Apoptosis Inducer Smac/DIABLO. *Journal of Biological Chemistry*, 278(12), 10055-10060. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207197200>

Humphries, W., Wei, J., Sampson, J. H., & Heimberger, A. B. (2010). The Role of Tregs in Glioma-Mediated Immunosuppression: Potential Target for Intervention. *Neurosurgery Clinics of North America*, 21(1), 125-137. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2009.08.012>

Hunter, A. M., LaCasse, E. C., & Korneluk, R. G. (2007). The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis*, 12(9), 1543-1568. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0087-3>

Hussain, S. F., Yang, D., Suki, D., Aldape, K., Grimm, E., & Heimberger, A. B. (2006). The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses1. *Neuro-Oncology*, 8(3), 261-279. <https://doi.org/10.1215/15228517-2006-008>

Huysentruyt, L. C., Akgoc, Z., & Seyfried, T. N. (2011). Hypothesis: Are Neoplastic Macrophages/Microglia Present in Glioblastoma Multiforme? *ASN Neuro*, 3(4), AN20110011. <https://doi.org/10.1042/AN20110011>

International Agency for Research on Cancer GLOBOCAN 2018, de: <https://www.iarc.fr>

INEGI (2020) Estadísticas de Mortalidad. Cubos dinámicos y CONAPO 2020. Proyecciones de la Población de México 2020-2050.

Jiang, X., Li, C., Lin, B., Hong, H., Jiang, L., Zhu, S., Wang, X., Tang, N., Li, X., She, F., & Chen, Y. (2017). CIAP2 promotes gallbladder cancer invasion and lymphangiogenesis by activating the NF- $\kappa$ B pathway. *Cancer Science*, 108(6), 1144-1156. <https://doi.org/10.1111/cas.13236>

Jiapaer, S., Furuta, T., Tanaka, S., Kitabayashi, T., & Nakada, M. (2018). Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma. *Neurologia Medico-Chirurgica*, 58(10), 405-421. <https://doi.org/10.2176/nmc.ra.2018-0141>

Jin, H.-S., Lee, D.-H., Kim, D.-H., Chung, J.-H., Lee, S.-J., & Lee, T. H. (2009). CIAP1, cIAP2, and XIAP Act Cooperatively via Nonredundant Pathways to Regulate Genotoxic Stress-Induced Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation. *Cancer Research*, 69(5), 1782-1791. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2256>

Jo, S. J., Park, P.-G., Cha, H.-R., Ahn, S. G., Kim, M. J., Kim, H., Koo, J. S., Jeong, J., Park, J. H., Dong, S. M., & Lee, J. M. (2017). Cellular inhibitor of apoptosis protein 2 promotes the epithelial-mesenchymal transition in triple-negative breast cancer cells through activation of the AKT signaling pathway. *Oncotarget*, 8(45), 78781-78795. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20227>

Kaufmann, S. H., & Hengartner, M. O. (2001). Programmed cell death: Alive and well in the new millennium. *Trends in Cell Biology*, 11(12), 526-534. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(01\)02173-0](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(01)02173-0)

Kleihues, P., & Ohgaki, H. (1999). Primary and secondary glioblastomas: From concept to clinical diagnosis. *Neuro-Oncology*, 1(1), 44-51. <https://doi.org/10.1093/neuonc/1.1.44>

Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society Transactions*, 37(5), 937-953. <https://doi.org/10.1042/BST0370937>

Kroemer, G., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Peter, M. E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M. V., Malorni, W., Knight, R. A., Piacentini, M., Nagata, S., & Melino, G. (2005). Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death & Differentiation*, 12(S2), 1463-1467. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401724>

Kullenberg T., Löfqvist M., Leinonen M., Goldbach-Mansky R., Olivecrona H. Long-term safety profile of

- anakinra in patients with severe cryopyrin-associated periodic syndromes. *Rheumatology*. 2016;55:1499–1506. doi: 10.1093/rheumatology/kew208
- Lamborn, K. R., Yung, W. A., Chang, S. M., Wen, P. Y., Cloughesy, T. F., DeAngelis, L. M., ... & Prados, M. D. (2008). Progression-free survival: an important end point in evaluating therapy for recurrent high-grade gliomas. *Neuro-oncology*, 10(2), 162-170.
- Lang, F. F., & Gilbert, M. R. (2006). Diffusely Infiltrative Low-Grade Gliomas in Adults. *Journal of Clinical Oncology*, 24(8), 1236-1245. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.2399>
- Lee, S., Liu, W., Dickson, D. W., Brosnan, C. F., & Berman, J. W. (1993). Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *The Journal of Immunology*, 150(7), 2659-2667.
- Lee, E.-W., & Song, J. (2016). USP11: A key regulator of cIAP2 stability and sensitivity to SMAC mimetics. *Molecular & Cellular Oncology*, 3(3), e1029829. <https://doi.org/10.1080/23723556.2015.1029829>
- Lee, S. Y. (2016). Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes & Diseases*, 3(3), 198-210. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2016.04.007>
- Li, X., Yang, Y., & Ashwell, J. D. (2002). TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature*, 416(6878), 345-347. <https://doi.org/10.1038/416345a>
- Lin, S.-C., Huang, Y., Lo, Y.-C., Lu, M., & Wu, H. (2007). Crystal Structure of the BIR1 Domain of XIAP in Two Crystal Forms. *Journal of Molecular Biology*, 372(4), 847-854. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.07.019>
- Liston, P., Fong, W. G., Kelly, N. L., Toji, S., Miyazaki, T., Conte, D., Tamai, K., Craig, C. G., McBurney, M. W., & Korneluk, R. G. (2001). Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nature Cell Biology*, 3(2), 128-133. <https://doi.org/10.1038/35055027>
- Liu, Z., Sun, C., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Betz, S. F., Oost, T., Herrmann, J., Wu, J. C., & Fesik, S. W. (2000). Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature*, 408(6815), 1004-1008. <https://doi.org/10.1038/35050006>
- Loiarro, M., Ruggiero, V., & Sette, C. (2010). Targeting TLR/IL-1R Signalling in Human Diseases. *Mediators of Inflammation*, 2010, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2010/674363>
- Mace, P. D., Linke, K., Feltham, R., Schumacher, F.-R., Smith, C. A., Vaux, D. L., Silke, J., & Day, C. L. (2008). Structures of the cIAP2 RING Domain Reveal Conformational Changes Associated with Ubiquitin-conjugating Enzyme (E2) Recruitment. *Journal of Biological Chemistry*, 283(46), 31633-31640. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804753200>
- Maher, E. A., Furnari, F. B., Bachoo, R. M., Rowitch, D. H., Louis, D. N., Cavenee, W. K., & DePinho, R. A. (2001). Malignant glioma: Genetics and biology of a grave matter. *Genes & Development*, 15(11), 1311-1333. <https://doi.org/10.1101/gad.891601>
- Marchetti C., Swartzwelter B., Gamboni F., Neff C.P., Richter K., Azam T., Carta S., Tengesdal I., Nemkov T., D'Alessandro A., et al. OLT1177, a  $\beta$ -sulfonyl nitrile compound, safe in humans, inhibits the NLRP3 inflammasome and reverses the metabolic cost of inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018;115:E1530–E1539. doi: 10.1073/pnas.1716095115.
- Mathieu, D., Kondziolka, D., Flickinger, J. C., Niranjan, A., Williamson, R., Martin, J. J., & Lunsford, L. D. (2007). Stereotactic radiosurgery for vestibular schwannomas in patients with neurofibromatosis type 2. *Neurosurgery*, 60(3), 460-470. <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000255340.26027.53>
- McNeill, K. A. (2016). Epidemiology of Brain Tumors. *Neurologic Clinics*, 34(4), 981-998. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.014>
- Mehrotra, S., Languino, L. R., Raskett, C. M., Mercurio, A. M., Dohi, T., & Altieri, D. C. (2010). IAP Regulation of Metastasis. *Cancer Cell*, 17(1), 53-64. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.11.021>
- Mendoza-Rodríguez, M., Arévalo Romero, H., Fuentes-Pananá, E. M., Ayala-Sumuano, J.-T., & Meza, I. (2017). IL-1 $\beta$  induces up-regulation of BIRC3, a gene involved in chemoresistance to doxorubicin in breast cancer cells. *Cancer Letters*, 390, 39-44. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.01.005>
- Messaoudi, K., Clavreul, A., & Lagarce, F. (2015). Toward an effective strategy in glioblastoma treatment. Part I: Resistance mechanisms and strategies to overcome resistance of glioblastoma to temozolomide. *Drug Discovery Today*, 20(7), 899-905. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.02.011>

- Micheau, O., & Tschopp, J. (2003). Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes. *Cell*, *114*(2), 181-190. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00521-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00521-X)
- Millrud C.R., Von Wachenfeldt K., Falk H.H., Forsberg G., Liberg D. Abstract 2269: The anti-IL1RAP antibody CAN04 increases tumor sensitivity to platinum-based chemotherapy. *Immunology*. 2020;80:2269. doi: 10.1158/1538-7445.am2020-2269
- Mitrus, I., Bryndza, E., Sochanik, A., & Szala, S. (2012). Evolving models of tumor origin and progression. *Tumor Biology*, *33*(4), 911-917. <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0389-0>
- Moon, J.-H., Shin, J.-S., Hong, S.-W., Jung, S.-A., Hwang, I.-Y., Kim, J. H., Choi, E. K., Ha, S.-H., Kim, J.-S., Kim, K.-M., Hong, D.-W., Kim, D., Kim, Y. S., Kim, J. E., Kim, K.-P., Hong, Y. S., Choi, E. K., Lee, J. S., Hattersley, M., ... Kim, T. W. (2015). A novel small-molecule IAP antagonist, AZD5582, draws Mcl-1 down-regulation for induction of apoptosis through targeting of cIAP1 and XIAP in human pancreatic cancer. *Oncotarget*, *6*(29), 26895-26908. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4822>
- Morrish, E., Brumatti, G., & Silke, J. (2020). Future Therapeutic Directions for Smac-Mimetics. *Cells*, *9*(2), 406. <https://doi.org/10.3390/cells9020406>
- Mrak, R. E., & Griffin, W. S. T. (2001). Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, *22*(6), 903-908. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(01\)00287-1](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(01)00287-1)
- Murat, A., Migliavacca, E., Hussain, S. F., Heimberger, A. B., Desbaillets, I., Hamou, M.-F., Rüegg, C., Stupp, R., Delorenzi, M., & Hegi, M. E. (2009). Modulation of Angiogenic and Inflammatory Response in Glioblastoma by Hypoxia. *PLoS ONE*, *4*(6), e5947. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005947>
- Nabors, L. B. (2014). The Role of Bevacizumab in Glioblastoma. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, *12*(9), 1201-1202. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2014.0118>
- Nakada, M., Furuta, T., Hayashi, Y., Minamoto, T., & Hamada, J. (2012). The strategy for enhancing temozolomide against malignant glioma. *Frontiers in Oncology*, *2*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00098>
- Nakamura, M., Konishi, N., Tsunoda, S., Nakase, H., Tsuzuki, T., Aoki, H., ... & Sakaki, T. (2000). Analysis of prognostic and survival factors related to treatment of low-grade astrocytomas in adults. *Oncology*, *58*(2), 108-116.
- Nathan, C., & Ding, A. (2010). Nonresolving Inflammation. *Cell*, *140*(6), 871-882. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.029>
- Neglia, J. P., Robison, L. L., Stovall, M., Liu, Y., Packer, R. J., Hammond, S., ... & Inskip, P. D. (2006). New primary neoplasms of the central nervous system in survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Journal of the National Cancer Institute*, *98*(21), 1528-1537.
- Noorbakhsh, A., Tang, J. A., Marcus, L. P., McCutcheon, B., Gonda, D. D., Schallhorn, C. S., Talamini, M. A., Chang, D. C., Carter, B. S., & Chen, C. C. (2014). Gross-total resection outcomes in an elderly population with glioblastoma: A SEER-based analysis: Clinical article. *Journal of Neurosurgery*, *120*(1), 31-39. <https://doi.org/10.3171/2013.9.JNS13877>
- O'Brien, M. A., & Kirby, R. (2008). Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, *18*(6), 572-585. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2008.00363.x>
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2005). Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathologica*, *109*(1), 93-108. <https://doi.org/10.1007/s00401-005-0991-y>
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2009). Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Science*, *100*(12), 2235-2241. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01308.x>
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2011). Genetic profile of astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Brain Tumor Pathology*, *28*(3), 177-183. <https://doi.org/10.1007/s10014-011-0029-1>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2018. Recuperado el 16 de julio 2016 de <http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2018/np31/en/>
- Park, C.-K., Kim, J. E., Kim, J. Y., Song, S. W., Kim, J. W., Choi, S. H., Kim, T. M., Lee, S.-H., Kim, I. H., & Park, S.-H. (2012). The Changes in MGMT Promoter Methylation Status in Initial and Recurrent Glioblastomas. *Translational Oncology*, *5*(5), 393-IN19. <https://doi.org/10.1593/tlo.12253>

- Pasparakis, M., & Vandenabeele, P. (2015). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, *517*(7534), 311-320. <https://doi.org/10.1038/nature14191>
- Perez-Yepe, E. A., Ayala-Sumuano, J.-T., Lezama, R., & Meza, I. (2014). A novel  $\beta$ -catenin signaling pathway activated by IL-1 $\beta$  leads to the onset of epithelial–mesenchymal transition in breast cancer cells. *Cancer Letters*, *354*(1), 164-171. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.08.015>
- Perkins, N. D. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF- $\kappa$ B and IKK function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(1), 49-62. <https://doi.org/10.1038/nrm2083>
- Pinton, L., Masetto, E., Vettore, M., Solito, S., Magri, S., D'Andolfi, M., Del Bianco, P., Lollo, G., Benoit, J.-P., Okada, H., Diaz, A., Della Puppa, A., & Mandruzzato, S. (2019). The immune suppressive microenvironment of human gliomas depends on the accumulation of bone marrow-derived macrophages in the center of the lesion. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, *7*(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0536-x>
- Rahaman, S. O., Harbor, P. C., Chernova, O., Barnett, G. H., Vogelbaum, M. A., & Haque, S. J. (2002). Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene*, *21*(55), 8404-8413. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206047>
- Réb , C., & Ghiringhelli, F. (2020). Interleukin-1 $\beta$  and Cancer. *Cancers*, *12*(7), 1791. <https://doi.org/10.3390/cancers12071791>
- Riedl, S. J., Renatus, M., Schwarzenbacher, R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S. W., Liddington, R. C., & Salvesen, G. S. (2001). Structural Basis for the Inhibition of Caspase-3 by XIAP. *Cell*, *104*(5), 791-800. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00274-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00274-4)
- Rossi, M. L., Hughes, J. T., Esiri, M. M., Coakham, H. B., & Brownell, D. B. (1987). Immunohistological study of mononuclear cell infiltrate in malignant gliomas. *Acta Neuropathologica*, *74*(3), 269-277. <https://doi.org/10.1007/BF00688191>
- Rothe, M., Pan, M.-G., Henzel, W. J., Ayres, T. M., & V. Goeddel, D. (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell*, *83*(7), 1243-1252. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90149-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90149-3)
- Sasaki, K., Hattori, T., Fujisawa, T., Takahashi, K., Inoue, H., & Takigawa, M. (1998). Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes. *The Journal of Biochemistry*, *123*(3), 431-439. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021955>
- Sadetzki, S., Chetrit, A., Freedman, L., Stovall, M., Modan, B., & Novikov, I. (2005). Long-Term Follow-up for Brain Tumor Development after Childhood Exposure to Ionizing Radiation for Tinea Capitis. *Radiation Research*, *163*(4), 424-432. <https://doi.org/10.1667/RR3329>
- Schile, A. J., García-Fernández, M., & Steller, H. (2008). Regulation of apoptosis by XIAP ubiquitin-ligase activity. *Genes & Development*, *22*(16), 2256-2266. <https://doi.org/10.1101/gad.1663108>
- Schneider, P., & Tschopp, J. (2000). Apoptosis induced by death receptors. En *Pharmacochimistry Library* (Vol. 31, pp. 281-286). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0165-7208\(00\)80030-6](https://doi.org/10.1016/S0165-7208(00)80030-6)
- Schroder, K., & Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. *Cell*, *140*(6), 821-832. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.040>
- Schuh E., Gro  C., Wagner D., Schlüter M., Gro  O., K mpfel T. MCC950 blocks enhanced interleukin-1 $\beta$  production in patients with NLRP3 low penetrance variants. *Clin. Immunol.* 2019;203:45–52. doi: 10.1016/j.clim.2019.04.004.
- Schütze, S., Tchikov, V., & Schneider-Brachert, W. (2008). Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*(8), 655-662. <https://doi.org/10.1038/nrm2430>
- Scott, F. L., Denault, J.-B., Riedl, S. J., Shin, H., Renatus, M., & Salvesen, G. S. (2005). XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: Evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *The EMBO Journal*, *24*(3), 645-655. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600544>
- Sharma, V., Dixit, D., Ghosh, S., & Sen, E. (2011). COX-2 regulates the proliferation of glioma stem like cells. *Neurochemistry International*, *59*(5), 567-571. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.06.018>
- Shao B.-Z., Xu Z.-Q., Han B.-Z., Su D.-F., Liu C. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: A review. *Front.*

*Pharmacol.* 2015;6:262. doi: 10.3389/fphar.2015.00262

Shete, S., Hosking, F. J., Robertson, L. B., Dobbins, S. E., Sanson, M., Malmer, B., ... & Houlston, R. S. (2009). Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nature genetics*, 41(8), 899-904.

Silke, J., Kratina, T., Chu, D., Ekert, P. G., Day, C. L., Pakusch, M., Huang, D. C. S., & Vaux, D. L. (2005). Determination of cell survival by RING-mediated regulation of inhibitor of apoptosis (IAP) protein abundance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(45), 16182-16187. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502828102>

Silke, J., Verhagen, A. M., Ekert, P. G., & Vaux, D. L. (2000). Sequence as well as functional similarity for DIABLO/Smac and Grim, Reaper and Hid? *Cell Death & Differentiation*, 7(12), 1275-1275. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400790>

Simi, A., Tsakiri, N., Wang, P., & Rothwell, N. J. (2007). Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration. *Biochemical Society Transactions*, 35(5), 1122-1126. <https://doi.org/10.1042/BST0351122>

Srinivasula, S. M., & Ashwell, J. D. (2008). IAPs: What's in a Name? *Molecular Cell*, 30(2), 123-135. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.008>

Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O. D., Zanella, F., & Reulen, H.-J. (2006). Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: A randomised controlled multicentre phase III trial. *The Lancet Oncology*, 7(5), 392-401. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(06\)70665-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70665-9)

Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., & Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 987-996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>

Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A., Read, W., Steinberg, D. M., Lhermitte, B., Toms, S., Idbaih, A., Ahluwalia, M. S., Fink, K., Di Meco, F., Lieberman, F., Zhu, J.-J., Stragliotto, G., Tran, D. D., Brem, S., Hottinger, A. F., Kirson, E. D., Lavy-Shahaf, G., ... 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. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.18718>

Spooren, A., Mestdagh, P., Rondou, P., Kolmus, K., Haegeman, G., & Gerlo, S. (2011). IL-1 $\beta$  potently stabilizes IL-6 mRNA in human astrocytes. *Biochemical pharmacology*, 81(8), 1004-1015. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.01.019>

Tarassishin, L., Casper, D., & Lee, S. C. (2014). Aberrant Expression of Interleukin-1 $\beta$  and Inflammation Activation in Human Malignant Gliomas. *PLoS ONE*, 9(7), e103432. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103432>

Tarassishin, L., & Lee, S. C. (2013). Interferon regulatory factor 3 alters glioma inflammatory and invasive properties. *Journal of Neuro-Oncology*, 113(2), 185-194. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1109-3>

Tarassishin, L., Loudig, O., Bauman, A., Shafit-Zagardo, B., Suh, H.-S., & Lee, S. C. (2011). Interferon regulatory factor 3 inhibits astrocyte inflammatory gene expression through suppression of the proinflammatory miR-155 and miR-155\*. *Glia*, 59(12), 1911-1922. <https://doi.org/10.1002/glia.21233>

Tarassishin, L., Suh, H.-S., & Lee, S. C. (2014). LPS and IL-1 differentially activate mouse and human astrocytes: Role of CD14: Species-Dependent Astrocyte Immune Activation. *Glia*, 62(6), 999-1013. <https://doi.org/10.1002/glia.22657>

Tchoghandjian, A., Soubéran, A., Tabouret, E., Colin, C., Denicolaï, E., Jiguet-Jiglaire, C., El-Battari, A., Villard, C., Baeza-Kallee, N., & Figarella-Branger, D. (2016). Inhibitor of apoptosis protein expression in glioblastomas and their in vitro and in vivo targeting by SMAC mimetic GDC-0152. *Cell Death & Disease*, 7(8), e2325-e2325. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.214>

Thakkar, J. P., Dolecek, T. A., Horbinski, C., Ostrom, Q. T., Lightner, D. D., Barnholtz-Sloan, J. S., & Villano, J. L. (2014). Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 23(10), 1985-1996.

Thomas, A., Tanaka, M., Trepel, J., Reinhold, W. C., Rajapakse, V. N., & Pommier, Y. (2017). Temozolomide in the Era of Precision Medicine. *Cancer Research*, 77(4), 823-826. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2983>

Trapp, T., Korhonen, L., Besselmann, M., Martinez, R., Mercer, E. A., & Lindholm, D. (2003). Transgenic mice overexpressing XIAP in neurons show better outcome after transient cerebral ischemia. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 23(2), 302-313. [https://doi.org/10.1016/S1044-7431\(03\)00013-7](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00013-7)

- Uren, A. G., Pakusch, M., Hawkins, C. J., Puls, K. L., & Vaux, D. L. (1996). Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(10), 4974-4978. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.10.4974>
- van Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S. M., Rodriguez, I., Alnemri, E. S., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W., & Vandenabeele, P. (2002). The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death & Differentiation*, *9*(1), 20-26. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400970>
- Vanden Berghe, T., Kaiser, W. J., Bertrand, M. J., & Vandenabeele, P. (2015). Molecular crosstalk between apoptosis, necroptosis, and survival signaling. *Molecular & Cellular Oncology*, *2*(4), e975093. <https://doi.org/10.4161/23723556.2014.975093>
- Varfolomeev, E., Blankenship, J. W., Wayson, S. M., Fedorova, A. V., Kayagaki, N., Garg, P., Zobel, K., Dynek, J. N., Elliott, L. O., Wallweber, H. J. A., Flygare, J. A., Fairbrother, W. J., Deshayes, K., Dixit, V. M., & Vucic, D. (2007). IAP Antagonists Induce Autoubiquitination of c-IAPs, NF- $\kappa$ B Activation, and TNF $\alpha$ -Dependent Apoptosis. *Cell*, *131*(4), 669-681. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.030>
- Vaux, D. L., & Silke, J. (2003). Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *304*(3), 499-504. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00622-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00622-3)
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., & Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins. *Cell*, *102*(1), 43-53. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00009-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00009-X)
- Vince, J. E., Wong, W. W.-L., Khan, N., Feltham, R., Chau, D., Ahmed, A. U., Benetatos, C. A., Chunduru, S. K., Condon, S. M., McKinlay, M., Brink, R., Leverkus, M., Tergaonkar, V., Schneider, P., Callus, B. A., Koentgen, F., Vaux, D. L., & Silke, J. (2007). IAP Antagonists Target cIAP1 to Induce TNF $\alpha$ -Dependent Apoptosis. *Cell*, *131*(4), 682-693. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.037>
- Vitek, M. P., Brown, C., Xu, Q., Dawson, H., Mitsuda, N., & Colton, C. A. (2006). Characterization of NO and Cytokine Production in Immune-Activated Microglia and Peritoneal Macrophages Derived from a Mouse Model Expressing the Human NOS2 Gene on a Mouse NOS2 Knockout Background. *Antioxidants & Redox Signaling*, *8*(5-6), 893-901. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.893>
- Vucic, D., Dixit, V. M., & Wertz, I. E. (2011). Ubiquitylation in apoptosis: A post-translational modification at the edge of life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *12*(7), 439-452. <https://doi.org/10.1038/nrm3143>
- Vucic, D., & Fairbrother, W. J. (2007). The Inhibitor of Apoptosis Proteins as Therapeutic Targets in Cancer. *Clinical Cancer Research*, *13*(20), 5995-6000. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0729>
- Wagner, L., Marschall, V., Karl, S., Cristofanon, S., Zobel, K., Deshayes, K., Vucic, D., Debatin, K.-M., & Fulda, S. (2013). Smac mimetic sensitizes glioblastoma cells to Temozolomide-induced apoptosis in a RIP1- and NF- $\kappa$ B-dependent manner. *Oncogene*, *32*(8), 988-997. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.108>
- Walter, A. W., Gajjar, A., Ochs, J. S., Langston, J. W., Sanford, R. A., Kun, L. E., & Heideman, R. (1998). Carboplatin and etoposide with hyperfractionated radiotherapy in children with newly diagnosed diffuse pontine gliomas: A phase I/II study. *Medical and Pediatric Oncology*, *30*(1), 28-33. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-911X\(199801\)30:1<28::AID-MPO9>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-911X(199801)30:1<28::AID-MPO9>3.0.CO;2-2)
- Wang, D., Berglund, A., Kenchappa, R. S., Forsyth, P. A., Mulé, J. J., & Etame, A. B. (2016). BIRC3 is a novel driver of therapeutic resistance in Glioblastoma. *Scientific Reports*, *6*(1), 21710. <https://doi.org/10.1038/srep21710>
- Weisenberger, D. J. (2014). Characterizing DNA methylation alterations from the cancer genome atlas. *The Journal of clinical investigation*, *124*(1), 17-23. <https://doi.org/10.1172/JCI69740>
- Weller, M., Cloughesy, T., Perry, J. R., & Wick, W. (2013). Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma—Are we there yet? *Neuro-Oncology*, *15*(1), 4-27. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos273>
- Wen, P. Y., & Kesari, S. (2008). Malignant Gliomas in Adults. *New England Journal of Medicine*, *359*(5), 492-507. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0708126>
- Wiemels, J. L., Wiencke, J. K., Sison, J. D., Miike, R., McMillan, A., & Wrensch, M. (2002). History of allergies among adults with glioma and controls. *International Journal of Cancer*, *98*(4), 609-615. <https://doi.org/10.1002/ijc.10239>

- Wilson, E. H., Weninger, W., & Hunter, C. A. (2010). Trafficking of immune cells in the central nervous system. *Journal of Clinical Investigation*, 120(5), 1368-1379. <https://doi.org/10.1172/JCI41911>
- Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 87. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>
- Wong, E. T., Hess, K. R., Gleason, M. J., Jaeckle, K. A., Kyritsis, A. P., Prados, M. D., ... & Yung, W. A. (1999). Outcomes and prognostic factors in recurrent glioma patients enrolled onto phase II clinical trials. *Journal of Clinical Oncology*, 17(8), 2572-2572.
- Wu, G., Chai, J., Suber, T. L., Wu, J.-W., Du, C., Wang, X., & Shi, Y. (2000). Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature*, 408(6815), 1008-1012. <https://doi.org/10.1038/35050012>
- Yang, C., Wang, H., Zhang, B., Chen, Y., Zhang, Y., Sun, X., Xiao, G., Nan, K., Ren, H., & Qin, S. (2016). LCL161 increases paclitaxel-induced apoptosis by degrading cIAP1 and cIAP2 in NSCLC. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35(1), 158. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0435-7>
- Yang, G., Zhang, R., Chen, X., Mu, Y., Ai, J., Shi, C., Liu, Y., Shi, C., Sun, L., Rainov, N. G., Li, H., Yang, B., & Zhao, S. (2011). MiR-106a inhibits glioma cell growth by targeting E2F1 independent of p53 status. *Journal of Molecular Medicine*, 89(10), 1037-1050. <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0775-x>
- Yeung, Y. T., McDonald, K. L., Grewal, T., & Munoz, L. (2013). Interleukins in glioblastoma pathophysiology: implications for therapy. *British journal of pharmacology*, 168(3), 591-606.
- Yoo, S. J., Huh, J. R., Muro, I., Yu, H., Wang, L., Wang, S. L., Feldman, R. M. R., Clem, R. J., Müller, H.-A. J., & Hay, B. A. (2002). Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. *Nature Cell Biology*, 4(6), 416-424. <https://doi.org/10.1038/ncb793>
- Yu, S.-W., Wang, Y., Frydenlund, D. S., Ottersen, O. P., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2009). Outer Mitochondrial Membrane Localization of Apoptosis-Inducing Factor: Mechanistic Implications for Release. *ASN Neuro*, 1(5), AN20090046. <https://doi.org/10.1042/AN20090046>
- Yung, W. K. A., Albright, R. E., Olson, J., Fredericks, R., Fink, K., Prados, M. D., ... & Levin, V. A. (2000). A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *British journal of cancer*, 83(5), 588-593. <https://doi.org/10.1111/bph.12008>
- Zhou, A. Y., Shen, R. R., Kim, E., Lock, Y. J., Xu, M., Chen, Z. J., & Hahn, W. C. (2013). IKKε-Mediated Tumorigenesis Requires K63-Linked Polyubiquitination by a cIAP1/cIAP2/TRAF2 E3 Ubiquitin Ligase Complex. *Cell Reports*, 3(3), 724-733. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.01.031>
- Ziegler, U., & Groscurth, P. (2004). Morphological Features of Cell Death. *Physiology*, 19(3), 124-128. <https://doi.org/10.1152/nips.01519.2004>