



**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**

**Facultad de Medicina**

**Licenciatura en Biomedicina**

**Instituto de Fisiología**

**Laboratorio de Neuroendocrinología**



**Tesis**

Inducción del fenotipo de células madre cancerígenas por IL-1 $\beta$  en la línea celular de glioblastoma humano U87 MG

**Para obtener el grado de:**

Licenciada en Biomedicina

**Presenta:**

Anna Villagrasa I Clemente

**Director de Tesis**

*Eduardo Monjaraz G.*

Dr. Eduardo Monjaraz Guzmán

**Asesores**

Dra. Martha Elena Hernández Caballero

Dr. Rubén Antonio Vázquez Roque

**Puebla de Zaragoza, septiembre 2024**

# ÍNDICE

1. ANTECEDENTES	
1.1 Cáncer.....	3
1.2 Tumores del sistema nervioso central (SNC).....	4
1.3 Glioblastoma multiforme (GBM).....	7
1.3.1 Características y factores asociados.....	8
1.3.2 Fisiopatología.....	10
1.3.3 Tratamiento.....	11
1.4 Células madre cancerígenas (CMC).....	13
1.4.1 Biomarcadores de células madre.....	15
1.4.2 Células madre cancerígenas y glioblastoma.....	18
1.5 IL-1 $\beta$ e inflamación.....	22
1.5.1 IL-1 $\beta$ y cáncer.....	23
1.5.2 IL-1 $\beta$ y glioblastoma multiforme.....	24
1.6 Cultivos celulares.....	28
2. JUSTIFICACION.....	29
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30
4. HIPÓTESIS.....	31
5. OBJETIVOS.....	31
5.1 General.....	31
5.2 Específicos.....	31
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
6.1 Cultivo celular.....	32
6.2 Reactivos.....	32
6.3 Ensayo de expresión génica (RT-PCR de punto final).....	33
6.4 Análisis estadístico.....	37
6.5 Resumen: diagrama de trabajo.....	37
7. RESULTADOS.....	38
8. DISCUSIÓN.....	43
9. CONCLUSIONES.....	50
10. BIBLIOGRAFÍA.....	51

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1 Cáncer**

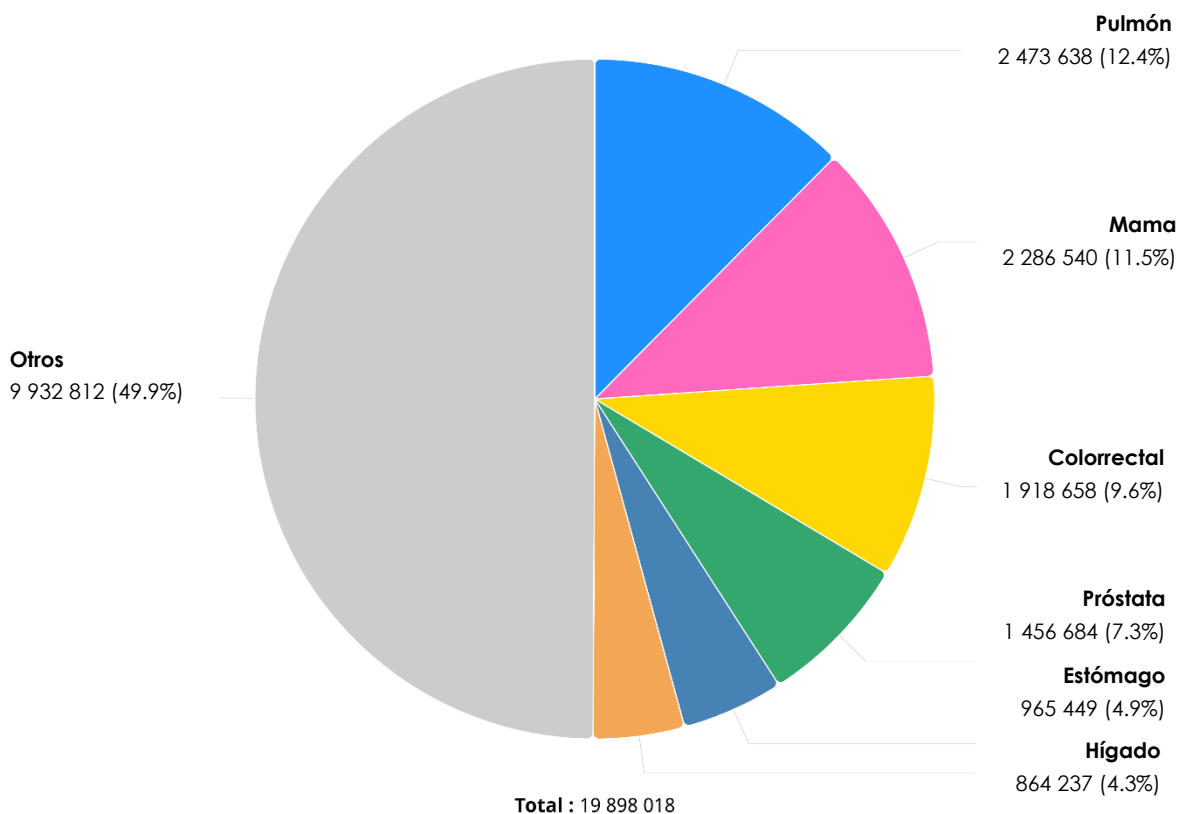
El cáncer, según la Organización Mundial de la Salud (2022), es la principal causa de mortalidad en el mundo y es un término que engloba al conjunto de enfermedades que se caracterizan por la multiplicación anormal y rápida de células que se extienden más allá de sus límites habituales y que pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, en un proceso que se conoce como “metástasis”.

Cuando una célula normal desarrolla mutaciones o alteraciones es capaz de activar su propia muerte celular, pero las células tumorales malignas presentan mutaciones que no pueden ser reparadas y pierden esa capacidad de autodestrucción. Esto induce que las células tumorales puedan seguir con los procesos de proliferación continua, migración e invasión de otros tejidos, llegando a la metástasis que es la principal causa de muerte por esta enfermedad.

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2022, el cáncer representó la primera causa de muerte ya que se atribuyeron a esta enfermedad casi 10 millones de defunciones (cerca de 1 de cada 6 muertes registradas). De hecho, en los últimos 20 años el número de tumores diagnosticados ha crecido de manera constante debido a factores como; el aumento poblacional, el aumento de la esperanza de vida y las técnicas de detección precoz. Tan solo en la Región de las Américas, el número de casos de cáncer se estimó en más de 4 millones en 2022 y se estima que aumentará hasta los 6 millones en el año 2040. Pero a pesar de que ha aumentado el riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer, el riesgo de mortalidad por esta enfermedad ha ido disminuyendo de manera importante en las últimas décadas.

Dentro de la categoría de “otros tipos de cáncer” del Observatorio General de Cáncer, de la Organización Mundial de la Salud, se encuentran aquellos que constituyeron el 49.9% de nuevos casos en 2022 (Figura 1). Concretamente, entre estos se encuentran los tumores en el cerebro y el sistema nervioso central que tuvieron una incidencia de 321.731 casos. Este tipo de tumores destacan por su alta tasa de mortalidad, ya que causaron un total de 248.500 muertes, es decir, más de una tercera parte de los casos diagnosticados, ocupando así el doceavo lugar dentro de

los tipos de cáncer más mortales. Entre los tumores del sistema nervioso central se encuentran los gliomas y sobre todo el glioblastoma multiforme (GBM) que es la forma más común y agresiva de cáncer cerebral primario. (IARC, 2022)



*Figura 1. Epidemiología del cáncer a nivel mundial (Modificada de IARC, GLOBOCAN, 2022)*

## **1.2 Tumores del sistema nervioso central**

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) representan el 2% de todas las neoplasias y constituyen un grupo heterogéneo de tumores que tienen en común una morbimortalidad considerable. Parecen ser cada vez más frecuentes e incluyen desde lesiones bien diferenciadas y benignas, como los meningiomas, hasta lesiones altamente invasivas y poco diferenciadas, como el GBM. (Alegría, M.A., et al. 2017)

Actualmente, la tasa de incidencia global de los tumores primarios del sistema nervioso central (TPSNC) es de 10.82 por cada 100.000 personas al año y la mortalidad de estos aumenta a

medida que incrementa la edad en la que son diagnosticados. En países desarrollados solamente el 14% de los pacientes diagnosticados con tumores del SNC tienen una supervivencia de más de 10 años y solo el 1% de ellos es prevenible. Los meningiomas son los tumores cerebrales primarios más comunes (36.4% de todos los casos), seguidos por los gliomas, (constituyen el 27%). Los gliomas son más frecuentes en adultos, con una incidencia de 14.07 por cada 100.000 personas. (*Alegría, M.A., et al. 2017*)

A partir de 1979, la Organización Mundial de la Salud (OMS) desarrolló un sistema de clasificación de los tumores primarios del sistema nervioso central (TPSNC) basado en la célula de origen del proceso tumoral y características morfológicas asociadas al pronóstico como proliferación vascular, mitosis, pleomorfismo y necrosis, entre otras. Considerando estos fenómenos, los TPSNC se clasifican en: (*Sinning, M. 2017*)

- Grado I: Tumores circunscritos, de lento crecimiento y bajo potencial de conversión a un tumor de mayor malignidad.
- Grado II: Tumores de borde difuso, lento crecimiento y, algunos, con tendencia a progresar a tumores de mayor malignidad.
- Grado III: Tumores infiltrantes con células atípicas o anaplásicas y mayor número de mitosis.
- Grado IV: Tumores de rápido crecimiento con alta tasa mitótica, pudiendo presentar vasos de neoformación y áreas de necrosis.

Los TPSNCs de grado I pueden ser removidos en su totalidad a través de neurocirugía, mientras que los tumores de grado II, III y IV, al presentar un borde difuso su cirugía suele ser incompleta, por lo que requieren seguimiento de imagen y, especialmente en los de grado III y IV tratamiento oncológico como radioterapia y quimioterapia. (*Sinning, M. 2017*)

No obstante, los avances recientes en los mecanismos oncogénicos responsables del desarrollo de estos tumores han dado lugar a nuevos sistemas de clasificación, los cuales, a su vez, permiten un mejor diagnóstico y una mejor planificación terapéutica. El sistema de clasificación de tumores del SNC más completo y actualizado es el de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2016, y se basa en diversas alteraciones genéticas y epigenéticas que determinan subgrupos de tumores con diferente evolución (marcadores moleculares pronósticos) y subgrupos con diferente respuesta a tratamientos (marcadores moleculares predictivos).

Entre estas alteraciones están la co-delección 1p/19q (LOH), la mutación de la proteína IDH1 y la mutación del promotor del gen ATRX, como parte de la evaluación obligatoria de los gliomas (OMS, 2016):

Tabla 1. Clasificación de tumores del sistema nervioso central (OMS, 2016)

GLIOMAS DE BAJO GRADO	DIAGNÓSTICO OMS 2016	GRADO OMS
Astrocitoma difuso	Astrocitoma difuso IDH mutado	Grado II
	Astrocitoma difuso IDH nativo	Grado II
	Astrocitoma difuso NOS	Grado II
Oligodendroglioma	Oligodendroglioma IDH mutado y 1p/19q codeletado	Grado II
	Oligodendroglioma NOS	Grado II
Oligoastrocitoma	Oligoastrocitoma NOS	Grado II
<b>GLIOMAS ALTO GRADO</b>		
Astrocitoma anaplásico	Astrocitoma anaplásico IDH mutado	Grado III
	Astrocitoma anaplásico IDH nativo	Grado III
	Astrocitoma anaplásico NOS	Grado III
Oligodendroglioma anaplásico	Oligodendroglioma anaplásico IDH mutado y 1p/19q codeletado	Grado III
	Oligodendroglioma anaplásico NOS	Grado III
Oligoastrocitoma anaplásico	Oligoastrocitoma NOS	Grado III
Glioblastoma	Glioblastoma IDH mutado	Grado IV
	Glioblastoma IDH nativo	Grado IV
	Glioblastoma NOS	Grado IV
<b>MEDULOBLASTOMA</b>		
Meduloblastoma genéticamente definido	Meduloblastoma SHH activado y p53 mutado	Grado IV
	Meduloblastoma SHH activado y p53 nativo	Grado IV
	Meduloblastoma no WNT no SHH	Grado IV
Meduloblastoma histológicamente definido	Meduloblastoma clásico	Grado IV
	Meduloblastoma desmoplástico/nodular	Grado IV
	Meduloblastoma con nodularidad extensa	Grado IV
	Meduloblastoma de células grandes/anaplásico	Grado IV
	Meduloblastoma NOS	Grado IV

NOS: no especificado, se utiliza en aquellos casos en los que el estudio molecular no se ha realizado.

Los tumores cerebrales primarios conocidos como gliomas se denominan así porque las células precursoras muestran una morfología y expresión génica similares a las del tejido glial. Entre ellos se encuentran los astrocitomas, oligodendrogliomas y el glioblastoma multiforme, que es

el glioma maligno de mayor grado (IV), el más agresivo y, además, el más común del cerebro y del sistema nervioso central. (Grochans, S., et al. 2022).

### **1.3 Glioblastoma Multiforme (GBM)**

El glioblastoma multiforme es el tumor cerebral primario maligno más frecuente en los adultos, representa aproximadamente el 69% de todos los gliomas y el 50.8 % de todos los tumores malignos primarios del sistema nervioso central (SNC). Se caracteriza por su malignidad y mal pronóstico ya que, el promedio de supervivencia de los enfermos por glioblastoma es menor a 18 meses y la calidad de vida del paciente durante estos se va deteriorando rápida y progresivamente. (Witthayanuwat, S. et al. 2018; Biserova, K., et al. 2021)

Dado que la tasa de incidencia es más alta en ancianos y debido al aumento de la longevidad de las personas en los países desarrollados, en las últimas décadas la mediana de edad de GBM ha aumentado a los 64 años. Además, el glioblastoma es 1,58 veces más frecuente en hombres que en mujeres y en términos de raza o etnia la incidencia es más alta en blancos no hispanos y más baja en indios americanos o nativos de Alaska (40% menor). A nivel mundial, la incidencia de glioblastoma es más alta en América del Norte, Australia y el norte y oeste de Europa. (Alexander, B. M., & Cloughesy, T. F. 2017)

En cuanto a la presentación clínica, los signos y síntomas del paciente se suelen confundir con accidentes cerebrovasculares, pues ambos se caracterizan por el aumento de la presión intracraneal que causa un subsecuente dolor de cabeza, náuseas y vómitos. También pueden presentarse signos neurológicos focales, convulsiones y alteraciones del estado mental que lleguen a afectar la personalidad. La herramienta diagnóstica principal es la resonancia magnética de contraste (RM), la cual permite obtener gran información estructural en relación con el tamaño y la ubicación del tumor. (Rodríguez, M. P., et al. 2022)

Actualmente, existen hasta cuatro tipos de glioblastoma multiforme, según la última clasificación de gliomas de la OMS de 2016 (se puede ver en la Tabla 1): (Grochans, S., et al. 2022)

- **Glioblastoma, isocitrato deshidrogenasa (IDH) normal:** representa el 90% de los casos. Este se desarrolla de *novo* alrededor de los 60 años de edad.
- **Glioblastoma, IDH mutante:** constituye el 10% de los casos y es un GBM de tipo secundario que generalmente se desarrolla en pacientes más jóvenes con gliomas de mayor diferenciación (grados I-III de la OMS). Tiene un pronóstico significativamente mejor que el GBM IDH normal.
- **Glioblastoma no especificado (NOS),** se da cuando no se puede determinar el estado de la mutación de IDH debido a la falta de material histológico o molecular para la prueba.
- **Glioblastoma no clasificado en otra parte (NEC),** en esta cuarta categoría que se ha añadido en los últimos años, se incluyen aquellos casos en los que se han realizado las determinaciones necesarias en cuanto a la clasificación del tumor, pero los resultados no permiten equiparar el tumor con ninguna de las categorías antes mencionadas de la división de la OMS de 2016. Esta situación puede ocurrir en caso de discrepancias entre las características clínicas, histológicas, inmunohistológicas y genéticas del tumor. También existe la posibilidad de que exista una subunidad GBM con una combinación desconocida de características que aún no está clasificada en la división de la OMS.

### **1.3.1 Características y factores asociados**

Para la mayoría de los pacientes con glioblastoma, no existe una causa conocida de la enfermedad. Una minoría de pacientes (< 5 %) tiene una alteración crítica de la línea celular germinal, lo que los predispone a muchos tipos de tumores (incluido GBM) y menos del 20 % de los pacientes con GBM tienen antecedentes familiares importantes de cáncer. (Alexander, B. M., & Cloughesy, T. F. 2017)

Por lo tanto, hay pocos factores de riesgo conocidos para este tipo de cáncer, aunque la exposición a la radiación ionizante es el factor más fuerte que puede asociarse con esta enfermedad y el único que puede ser modificable. También se ha identificado una asociación entre el glioblastoma multiforme y antecedentes de atopía, alergias y otras afecciones que están relacionadas con el sistema inmunitario, aunque no se han descifrado las razones biológicas subyacentes exactas. Por otro lado, hay síndromes genéticos poco comunes que se han asociado



con el glioblastoma, como es el síndrome de Li-Fraumeni y el síndrome de Lynch, pero se han presentado en menos del 1% de los casos. (Tan, A. C. 2020).

Los glioblastomas se reportan como primarios y secundarios en función de si aparecen de *novo*, sin un diagnóstico previo de otro tumor (GBM primario), o si aparecen a partir de la progresión de tumores astrocíticos u oligodendrocíticos de bajo grado (GBM secundario). Esta clasificación en uno u otro es difícil ya que son clínicamente indistinguibles y también cuesta diferenciarlos por los métodos de histopatología, por lo que se recurre a marcadores moleculares específicos para poder llegar a clasificarlos. Las diferentes alteraciones moleculares encontradas en ellos se dan en un orden secuencial: hay una suma de alteraciones genéticas que son las responsables de la iniciación y progresión de los gliomas, explicando así la heterogeneidad genética que tienen. Para el GBM primario se ha observado principalmente una amplificación o mutación del receptor del factor de crecimiento endotelial (EGFR), siendo la más común la que ocurre en la variante III (EGFRvIII), mientras que para el GBM secundario se han observado otros cambios, como las mutaciones en el gen supresor de tumores TP53 y en los genes IDH1 y 2. Los glioblastomas pediátricos, en comparación con los de los adultos, expresan diferentes mutaciones genéticas: mutaciones en el gen H3F3A que codifica para la histona H3.3 (en el 30% de casos analizados) y la mutación en el complejo ATRX–DAXX que media el depósito de estos en las regiones teloméricas. (Mullins, C.S., et al. 2013; González, T. F., et al. 2014).

Los avances en investigación han permitido crear el Atlas del Genoma en Cáncer (TCGA) que es la base que propuso una clasificación complementaria a la histológica para los glioblastomas (GBMs) en los subtipos proneural, neural, clásico y mesenquimal. (Sinning, M. 2017). Las características de cada uno son:

- **Glioblastoma proneural:** es la variante más frecuente en glioblastomas secundarios, es decir, aquellos que provienen de gliomas grado II y III. Su alteración más frecuente es la mutación del IDH1 e IDH2 y PDGFRA. Es la variante de mejor pronóstico.
- **Glioblastoma neural:** presenta marcadores de expresión neuronal como el NEFL, GABRA1, SYT1, and SLC12A5.
- **Glioblastoma clásico:** presenta amplificación del cromosoma 7 y pérdida del cromosoma 10, así como amplificación del EGFR en el 97% de ellos.

- **Glioblastoma mesenquimal:** presenta delección 17q11.2, región que codifica en gen NF1, así como marcadores mesenquimales. Este último es el subtipo de peor pronóstico.

Dentro de esta clasificación también destaca el hecho de que la mutación en p53, el “guardián del genoma”, ocurre en un 54%, 32%, 21% y 0% de los tumores de los subtipos de glioblastoma proneural, mesenquimatoso, neural y clásico, respectivamente. En general, el gen supresor de tumores p53 suele ser el objetivo más frecuente de alteraciones genéticas en el cáncer humano pero su valor pronóstico no se ha determinado en gliomas. Sin embargo, para continuar estudiando y analizando el estado de este gen, las líneas celulares de glioma se parecen a los tumores originales y, por lo tanto, son adecuadas para determinar los cambios biológicos asociados con las mutaciones de p53 en los tumores gliales. (Hurmuth, K., et al. 2014)

### **1.3.2 Fisiopatología**

El GBM es clasificado según la Organización Mundial de la Salud como una neoplasia de grado IV debido a que se caracteriza por desarrollar una proliferación microvascular y producir necrosis. Sus características histológicas lo definen por estar formado principalmente por astrocitos con núcleos atípicos (que surgen de una elevada actividad mitótica), pleomorfismo celular y trombosis vascular. Además, está infiltrado por células inmunológicas, proteínas y quimiocinas, que en conjunto forman lo que se conoce como microambiente tumoral. Su desarrollo es rápido, sin lesiones previas y sin la presentación de un tumor inicial de menor grado (lo que sería un tumor primario), pero también se pueden presentar glioblastomas secundarios producto de astrocitomas de grado II o III. (Rodríguez, M. P., et al. 2022)

Generalmente, las células de GBM comienzan a invadir la sustancia blanca durante la etapa temprana del desarrollo del tumor, hasta que el tamaño de este suele ser grande al grado que puede ocupar la mayoría de la región donde se presenta y puede ser una lesión unilateral o bien, si se encuentra en el tallo cerebral o cuerpo caloso, puede ser bilateral y simétrica. Esta última característica es producto de la infiltración de células cancerígenas a través de las estructuras mielinizadas del cuerpo caloso, que normalmente se dirigen hacia los fórnix de los lóbulos temporales. Por otra parte, es una neoplasia sin bordes definidos: en la periferia se suelen ubicar las células tumorales, mientras que en la parte central del tumor se presenta la necrosis, la cual suele rodear estructuras cerebrales adyacentes como el cuerpo caloso o el tallo cerebral.

También posee zonas marrones o rojas, que son el resultado de hemorragias, proceso que fomenta la neovascularización típica de este tipo de tumores. (Hide, T., et al. 2018; Rodríguez, M. P., et al. 2022)

### 1.3.3 Tratamiento

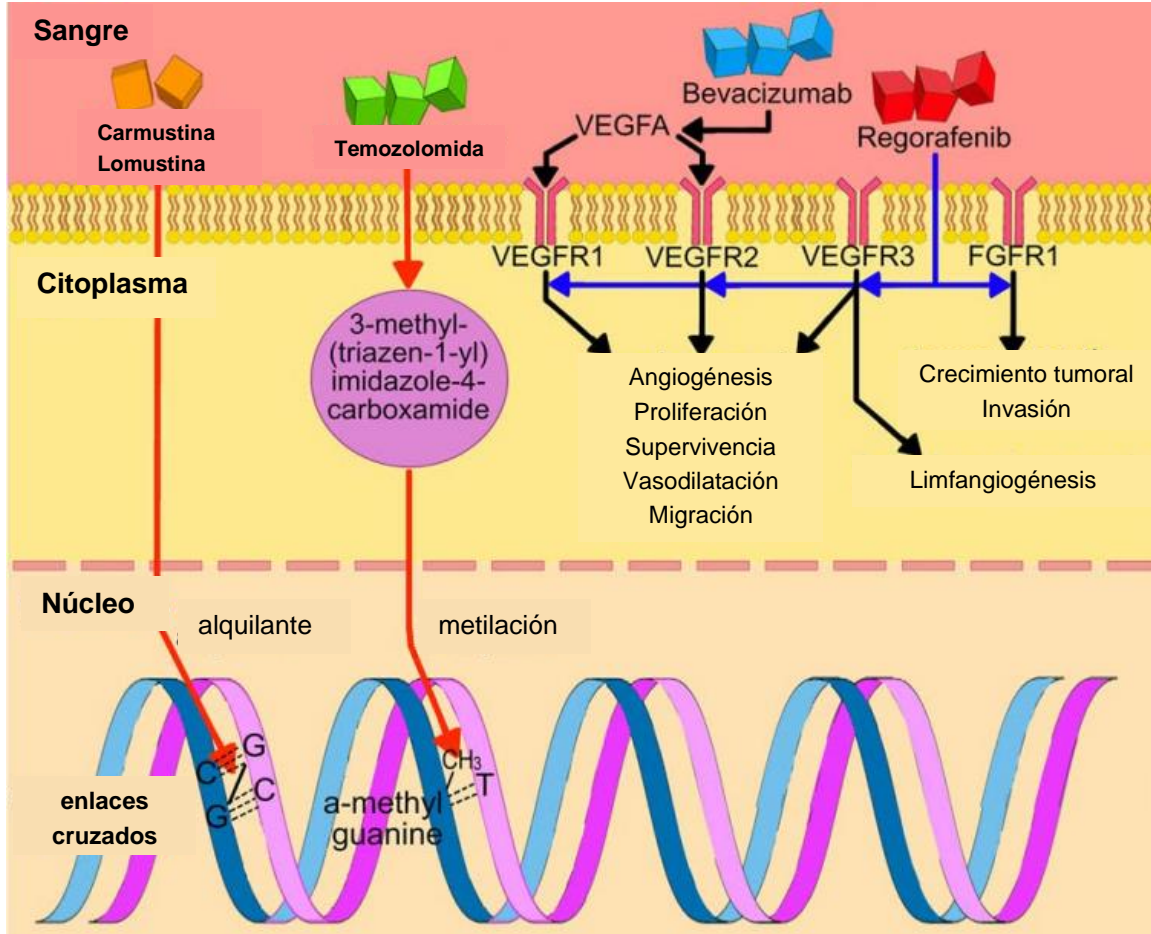
Una vez confirmado el diagnóstico de glioblastoma multiforme, el paciente inicia el tratamiento estándar establecido que consta, en primer lugar, de resección quirúrgica reductora máxima, procedimiento que tiene como objetivo remover la mayoría de masa tumoral macroscópica sin afectar estructuras cerebrales con funciones vitales. Posteriormente, se continúa el proceso con radioterapia y quimioterapia con *Temozolamida* concomitante como agente alquilante. Sin embargo, debido a la naturaleza invasiva del tumor, su alta capacidad proliferativa, la infiltración difusa en tejidos adyacentes, los focos de necrosis, su elevada angiogénesis y una fuerte resistencia a la apoptosis, los glioblastomas no pueden resecarse por completo. (Rodríguez, M. P., et al. 2022; Kumari, S., et al. 2023)

La *Temozolomida* (TMZ) es el fármaco de quimioterapia de primera línea usado contra el glioblastoma (GBM), un agente alquilante que se administra por vía oral y que causa la apoptosis de las células tumorales al generar roturas en una o en las dos cadenas del ADN. Concretamente, es un profármaco que actúa convirtiéndose en un compuesto activo de vida corta, MTIC. La citotoxicidad de la MTIC metilasa da como resultado la metilación de áreas del ADN ricas en guanina, lo que conduce a la inhibición de la replicación del ADN y la apoptosis. Si el promotor MGMT no está metilado, la proteína MGMT elimina el grupo alquilo de la base guanina del ADN, pero si el promotor MGMT está metilado, entonces no existe una proteína MGMT activa para poder repararlo. Es decir, que las células tumorales con MGMT metilada son más susceptibles a los efectos citotóxicos de la TMZ que las células con MGMT no metilada. En cuanto al tratamiento con TMZ, este fármaco se suele administrar en una dosis de 75 mg/m<sup>2</sup> al día, durante la radioterapia, y luego otros 6 ciclos seguidos con una dosis de 150-200 mg/m<sup>2</sup> en los días 1-5 (cada 28 días). Los efectos adversos comunes de este tratamiento incluyen náuseas y mielosupresión, especialmente trombocitopenia y neutropenia, y ocurren más comúnmente durante el período de terapia adyuvante (Figura 2). (Rodríguez, S.M., et al. 2022; Tan, A. C. 2020; Khabibov, M., et al. 2022)

Por otro lado, las opciones de tratamiento en la situación de recaída o recurrencia incluyen la resección quirúrgica adicional, re-irradiación, terapias sistémicas como *Lomustina*, *Carmustina* o *Bevacizumab*, enfoques combinados o únicamente atención de apoyo. Dentro de todas estas, la re-irradiación puede ser una opción adecuada para pacientes más jóvenes, que tienen un buen estado funcional. (Tan, A.C. 2020) La *Carmustina* (o también llamada BCNU) es un agente alquilante pequeño y un compuesto nitrogenado que hace que las bases de guanina y citosina en el ADN formen enlaces cruzados entre cadenas, mientras que la *Lomustina* es una terapia alquilante oral que tiene eficacia contra el GBM gracias a su propiedad de ser altamente lipofílico y de pequeño tamaño, lo que facilita el cruce de la BHE. Por otro lado, el mecanismo de acción de *Bevacizumab* consiste en unirse al VEGF-A (factor de crecimiento proangiogénico) y prevenir su interacción con sus receptores tirosina quinasa de la superficie de las células endoteliales, para así lograr la inhibición de la angiogénesis, la proliferación, la supervivencia y la migración de las células. Por último, *Regorafenib* también es un agente terapéutico que puede utilizarse en algunos casos como inhibidor multiquinasa (receptores tirosin-quinasa) (Figura 2). (Khabibov, M., et al. 2022)

Otras causas de recurrencia complejas incluyen la ausencia de un margen tumoral claro para una resección completa, la presencia de células cancerígenas con la capacidad de migrar hacia al tejido normal adyacente, células con un alto índice proliferativo, la resistencia a la quimioterapia y radioterapia que presentan las células madre cancerígenas o cancerosas (CSC) o la diseminación del líquido cefalorraquídeo (LCR). (Rodríguez, S.M., et al. 2022)

Las CSC constituyen una subpoblación muy importante de células del glioblastoma, pues presentan múltiples mutaciones que hacen que el GBM sea un tumor muy heterogéneo y resistente a todos los enfoques terapéuticos. Precisamente, como la mayoría de las CSC de glioblastoma se encuentran en áreas hipóxicas y necróticas que son difíciles de penetrar con los fármacos de quimioterapia, la resistencia es común. Algunos de los diferentes mecanismos de resistencia a la quimioterapia inducidos por las CSC incluyen; la inactivación metabólica de los fármacos, la disminución del influjo y la sobreexpresión de las bombas de eflujo de los mismos, la disminución en la velocidad de división, la inhibición de la conversión de profármacos en fármacos bioactivos y el aumento de la reparación de la doble cadena de ADN (Figura 2). (Rodríguez, S.M., et al. 2022)



*Figura 2. Fármacos empleados para el tratamiento de glioblastoma multiforme (Modificada de: Khabibov, et al. 2022).*

#### **1.4 Células madre cancerígenas (CSC)**

Los tumores malignos están formados por subpoblaciones heterogéneas de células cancerígenas y células no cancerígenas. El objetivo de las terapias principales (quimioterapia y radioterapia) es destruir a todas las células que forman el carcinoma, no obstante, en muchos tumores existe una subpoblación de células que se caracteriza por su capacidad de autorrenovarse y sobrevivir incluso después de recibir el tratamiento citotóxico. Estas células se conocen como células madre cancerígenas (CSC) o células iniciadoras de tumores (TIC). (Skvortsova, I. 2021)

Las células madre cancerígenas pueden impulsar el crecimiento de un tumor maligno desde el inicio (TIC) o bien provocando una recaída después de recibir la terapia antitumoral (CSC). Cuando ocurre al inicio del tumor, se puede dar a partir de dos condiciones diferentes: a partir de células diferenciadas que son transformadas por mutaciones (sobreexpresión de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores) en células desdiferenciadas o por células madre residentes en tejidos adultos que se encuentran en regeneración fisiológica y se dividen asimétricamente, generando células amplificadoras que poseen una alta capacidad de proliferación. (Rodríguez, S.M., et al. 2022; Walcher, L., et al. 2020)

Las CSC que provocan recaídas, es decir, el crecimiento de un tumor maligno después de haber tratado uno previamente con quimioterapia y/o radioterapia, pueden ser subpoblaciones de células resistentes al tratamiento con alta plasticidad y modificaciones en su composición o bien células tumorales senescentes que causan cambios en el microambiente tumoral. Los tratamientos terapéuticos de primera línea inducen daños en el ADN de células tumorales, desencadenando el proceso de senescencia inducida por terapia (TIS) y provocando una disminución del tamaño del tumor, así como la atracción de células inmunitarias como neutrófilos, monocitos y células T que promueven la eliminación de células tumorales muertas, necróticas y senescentes. Sin embargo, a largo plazo, los efectos antitumorales del TIS se pueden perder ya que las células senescentes no eliminadas y las CSC resistentes pueden adquirir mutaciones adicionales, escapando así de la detención del ciclo celular y transformándose en nuevas células madre cancerígenas (CSC). Además, estas células que no se eliminaron junto con las células inmunitarias del microambiente, son capaces de secretar factores estimulantes como las interleucinas (IL) 1, 6 y 8, que apoyan el mantenimiento de la potencia en las CSC y provocan la recaída del tumor. (Walcher, L., et al. 2020)

Las moléculas de señalización y factores como las citocinas desarrollan un papel muy importante en la formación de las CSC, debido a que pueden influir en el fenotipo y la funcionalidad de estas células, contribuyendo así a su gran plasticidad. En células madre cancerígenas de cáncer de mama triple negativo (TNBC), por ejemplo, se ha observado que su metabolismo celular cambia notablemente al ser estimuladas de manera continua por citocinas proinflamatorias como  $TNF\alpha$  e  $IL-1\beta$ . Estas citocinas pueden promover cascadas prometastásicas en dichas células y desencadenar una inflamación crónica que puede estar

implicada en la formación de fenotipos celulares todavía más agresivos. (Skvortsova, I. 2021; Kore, R.A., Abraham, E.C. 2014)

También se ha visto que las células no neoplásicas que son altamente adaptativas y se encuentran en el microambiente tumoral del glioblastoma, impulsan la función de las CSC y la progresión del tumor al aumentar los niveles tanto de ARN como de proteína de la interleucina IL-1 $\beta$ . Concretamente, en muestras de pacientes con glioblastoma IDH1 de tipo salvaje esta expresión elevada de IL-1 $\beta$  se correlaciona inversamente con la supervivencia del paciente. (Chen, Z., et al. 2023)

Como ya se mencionó, la alta plasticidad que tienen las CSC hace que la terapia adecuada o la eficiencia del tratamiento para cada tumor sea más complicada y difícil de conseguir, debido a las inestables propiedades moleculares y patológicas que presentan. Por lo que resulta de gran importancia la investigación de biomarcadores que caractericen estas células y que permitan hacer tanto un pronóstico de la gravedad como un seguimiento a nivel terapéutico de diferentes tumores sólidos. (Skvortsova, I. 2021; Walcher, L., et al. 2020)

#### **1.4.1 Biomarcadores de CSC**

Algunas de las proteínas que se encuentran en la membrana de las células son importantes objetivos terapéuticos porque están muy expuestas en la superficie celular, lo que las convierte en blancos fáciles para los fármacos, a diferencia de las proteínas que se encuentran dentro de las células. De hecho, las proteínas de membrana representan hasta el 60% de todos los blancos farmacológicos conocidos y muchas de ellas sirven como marcadores prometedores de superficie celular para células madre cancerígenas de diferentes tumores. (He, J., et al. 2012)

La mayoría de los marcadores expresados en las células madre cancerígenas (CSC) también se pueden encontrar en poblaciones de células madre que residen en tejidos adultos en regeneración o en células madre embrionarias humanas (hESC). Además, como estas células pueden llegar a ser tan heterogéneas, su caracterización y aislamiento normalmente se basa en el uso de varios biomarcadores de superficie o en combinaciones de marcadores extracelulares e intracelulares. Algunos de los principales marcadores de células madre cancerígenas en tumores sólidos son: (Walcher, L., et al. 2020)



- **CD44**

CD44 es un biomarcador que se expresa tanto en cánceres sólidos como en cánceres hematológicos. Su expresión se asocia con una mayor proliferación, autorrenovación y metástasis, por lo que se ha indicado como un buen marcador para diagnósticos y enfoques terapéuticos. Niveles altos de este marcador se han reportado en cáncer colorrectal, gástrico, de pulmón, de hígado y de mama, entre otros. En células de glioblastoma también se encuentra regulado positivamente, pero su inhibición bloquea el crecimiento del tumor y sensibiliza a las células a los fármacos citotóxicos. (Walcher, L., et al. 2020; Dimov, I., et al. 2011)

- **CD133**

El biomarcador CD133 (Prominin-1) es una proteína de membrana glicosilada con 5 dominios transmembrana. Se expresa en hESC y es característico de células con alta capacidad tumorigénica y de formación de esferas. Se ha identificado en cáncer de mama, hígado, pulmón y estómago y se ha correlacionado con el proceso de transición epitelio mesenquimal (TEM) y con la resistencia a la radiación. Junto con CD44, puede servir como un marcador para predecir el proceso de metástasis. (He, J., et al. 2012; Walcher, L., et al. 2020)

- **SOX2**

Es un factor de transcripción que pertenece a la familia SOX, participa en el mantenimiento de un fenotipo celular indiferenciado, en la autorrenovación de las células madre y su expresión se relaciona con una mayor resistencia a la quimioterapia. No obstante, su papel en el desarrollo tumoral es controvertido ya que en algunos casos se ha asociado con un mal pronóstico (cáncer colorrectal) y en otros, con la disminución de la metástasis (cáncer gástrico). Por lo tanto, sus funciones parecen depender del origen del cáncer y del contexto celular. En células madre de glioblastoma (GSC), por ejemplo, el silenciamiento de SOX2 detiene la proliferación y favorece la pérdida de tumorigenicidad, por lo que puede ser un marcador tumoral de gliomas y reflejar un



patrón de diferenciación desorganizado que caracteriza a los tumores altamente malignos. (*He, J., et al. 2012 ; Walcher, L., et al. 2020 ; Dimov, I., et al. 2011*)

- **NANOG**

Nanog es un factor de transcripción ampliamente expresado en cánceres humanos. En cáncer de mama y colorrectal se ha asociado con el proceso de transición epitelio mesenquimal (TEM), invasión, metástasis y con la resistencia a los medicamentos. Además, junto a Oct3/4 se correlaciona con un mal pronóstico del paciente (*Walcher, L., et al. 2020*)

- **OCT 3/4**

Este factor de transcripción, también conocido como POU5F1, pertenece a la familia de genes POU y también es un regulador de la pluripotencia en células madre. Está regulado positivamente en varios tipos de cáncer como de pulmón, hígado o colorrectal y participa en la transformación neoplásica, en la quimio resistencia, la autorrenovación de las CSC y en el proceso de metástasis. (*Walcher, L., et al. 2020*)

- **NESTINA**

Es una proteína de filamento intermedio de clase IV que se expresa de manera abundante en células madre neurales, pero no en células diferenciadas. Su expresión, también se correlaciona con la malignidad de los tumores por lo que, junto a CD133, se considera un marcador de mal pronóstico en tumores como los gliomas malignos (*He, J., et al. 2012; Dimov, I., et al. 2011*)

- **ABCG2**

Este marcador es una proteína de membrana que pertenece a la superfamilia de los transportadores ABC (casetes de unión a ATP), concretamente a una de las 7 subfamilias: ABCA-ABCG. Está formado por dominios transmembrana y por dominios de unión a nucleótidos citoplásmicos que funcionan como motor al hidrolizar el ATP. Debido a esta propiedad, ABCG2 también funciona como bomba de eflujo de fármacos

en varios tipos de cáncer por lo que es responsable de causar una alta resistencia a los medicamentos cuando se sobreexpresa en dichas células. (Kuo, Y.C., et al. 2023) En células madre cancerígenas de glioblastoma (GSC) es uno de los responsables de que tengan las habilidades de autorrenovación, pluripotencia y resistencia a la quimioterapia. (Ludwig, K. & Kornblum, H.I. 2017; Kukul, S., et al. 2021)

Muchos de estos biomarcadores se expresan tanto en células madre neurales (CSC) como en células madre de glioblastoma (GSC), así como en otros tipos de cáncer.

#### **1.4.2 Células madre cancerígenas en glioblastoma (GSC)**

Como ya se mencionó anteriormente, el glioblastoma multiforme se caracteriza por una recurrencia inevitable dentro del primer año de tratamiento y por una alta resistencia a la quimioterapia y radioterapia. Estas características están asociadas directamente con las células madre cancerígenas (CSC), la subpoblación de células pluripotentes y autorrenovables que están presentes en tumores tan agresivos como este. Concretamente, en el glioblastoma multiforme estas células se conocen como células madre gliales (GSC) y pueden generarse a partir de la desdiferenciación de células neurales como astrocitos y neuronas. Las características principales de estas células son comunes con las CSC descritas: su baja actividad proliferativa, la baja abundancia dentro del tumor, la resistencia al tratamiento y su asociación con la recurrencia del tumor. (Biserova, K., et al. 2021)

Las GSC con capacidad de autorrenovación, además, se caracterizan por la formación de esferas denominadas "neurosferas" o "neuroesferas de glioma". Estas esferas son comunes en los gliomas primarios y le otorgan al tumor la propiedad de resistencia a la quimioterapia y radioterapia y, lo que es más importante, proporcionan un potencial oncogénico mejorado, generando tumores que son altamente proliferativos e invasivos. Al agruparse y formar estas colonias o esferas las células proliferan a un ritmo mucho más lento que las otras células tumorales y este comportamiento es consistente con los rasgos de las células madre que se dividen más lentamente que las células cancerosas. No obstante, las células cancerosas circundantes también pueden llegar a adquirir un fenotipo de células madre y unirse a las células

de la neuroesfera hasta formar colonias cada vez más grandes y con una mayor quimiorresistencia, invasividad y potencial oncogénico, las cuales son características típicas de las GSC. Estas células de glioma pueden adquirir la capacidad de autorrenovación y pluripotencia de células madre que no tenían después de la exposición a factores intrínsecos o extrínsecos que se detallan a continuación. (Wang, L., et al. 2012)

Las CSC de gliomas como el glioblastoma están reguladas por seis mecanismos principales, que incluyen: 3 factores intrínsecos como la genética, la epigenética y el metabolismo, y 3 factores extrínsecos como son las cualidades de nicho, el microambiente celular y el sistema inmunológico del huésped. (Lathia, et al. 2015; Biserova, K., et al. 2021)

- **Factores intrínsecos**

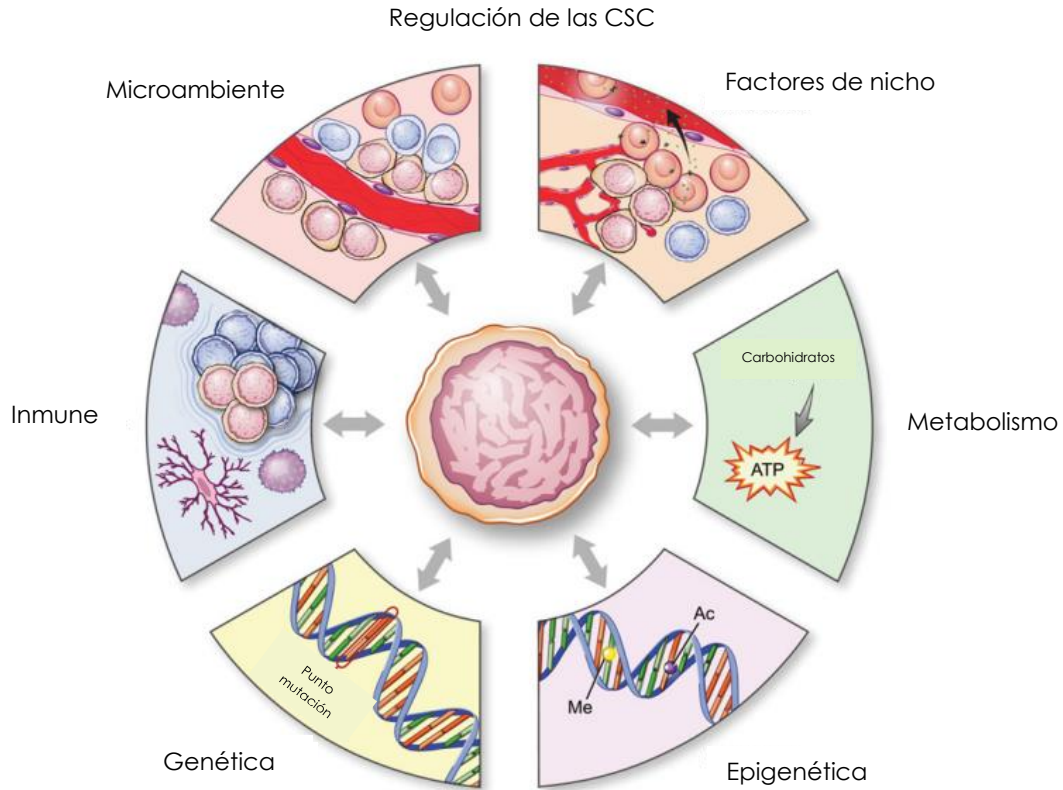
El alto grado de heterogeneidad que presentan las GSC del glioblastoma se debe a importantes mutaciones que ocurren a nivel genético y epigenético en dichas células como son; la metilación del ADN, alteraciones en la estructura de la cromatina que se deben a la modificación postraduccional de las histonas y la desregulación de algunos microRNAs. Estos cambios, afectan directamente la expresión genética de manera que, por ejemplo, la hipermetilación de regiones promotoras puede silenciar genes supresores de tumores, como TP53, mientras que la hipometilación puede activar la expresión de oncogenes. En cuanto al metabolismo, las GSC exhiben el efecto “Warburg”, que se caracteriza por el cambio metabólico hacia la glucólisis aeróbica en lugar de la fosforilación oxidativa, al estar en un microambiente tumoral en condiciones de hipoxia. La glucólisis aeróbica es menos efectiva en la síntesis de ATP, pero resulta beneficiosa para las GSC porque permite la síntesis de nuevas moléculas que promueven el mantenimiento de su autorrenovación, proliferación y supervivencia. (Biserova, K., et al. 2021)

- **Factores extrínsecos**

Se conoce como nicho al lugar donde se encuentra la mayor densidad de células madre en el glioblastoma y en total se han descrito 3 tipos diferentes: los nichos perivasculares,

los invasivos y los hipóxicos. Los nichos perivasculares se desarrollan a partir de la transdiferenciación de GSC en pericitos a lo largo de los capilares y arteriolas, los nichos invasivos se caracterizan por el crecimiento de células neoplásicas invasivas a lo largo de los mismos capilares y los nichos hipóxicos surgen del desequilibrio entre el rápido crecimiento del GBM y la proliferación lenta de los vasos sanguíneos que conduce a la necrosis. Una vez formados estos nichos también son capaces de activar diferentes vías de señalización que les permiten mantener un estado indiferenciado y aumentar su supervivencia. Las vías más comunes activadas en estas células incluyen la señalización de Notch, BMP, NF- $\kappa$ B, Sonic Hedgehog (SHH) y Wnt. La activación aberrante de Notch se asocia con una mayor capacidad de migración e invasión, NF- $\kappa$ B promueve la resistencia al tratamiento por radiación y la señalización Wnt es fundamental para el mantenimiento de las propiedades de células madre. (*Lathia, et al. 2015 ; Biserova, K., et al. 2021 ; Lah, T.T., et al. 2020*)

Las GSC de estos nichos son capaces de interactuar directamente con el microambiente tumoral que está formado por células y factores no malignos que pueden contribuir o promover el crecimiento del tumor, así como la formación de nuevas GSC. La hipoxia representa una característica esencial del microambiente en el glioblastoma ya que sostiene la autorrenovación, la proliferación, el crecimiento invasivo y la supervivencia de las GSC. La baja concentración de oxígeno también regula al alza proteínas que contribuyen al proceso de angiogénesis, formación de nuevos vasos sanguíneos tumorales, así como al proceso de dediferenciación y de resistencia al tratamiento. Finalmente, las GSC contribuyen al entorno inmunosupresor del glioblastoma al inhibir la activación de los linfocitos T citotóxicos, desencadenar la apoptosis en ellos y activar los linfocitos T reguladores. Además, también sintetizan otros factores como la IL-10 y el TGF- $\beta$ , que suprimen la función de la microglía asociada al tumor generando un fenotipo más inmunosupresor. (*Rodríguez, SM., et al. 2022*)



**Figura 3.** Representación esquemática de los procesos que afectan a las células madre gliales (GSC). (Modificada de: Biserova, K., et al. 2021).

Las células madre de glioblastoma se pueden identificar a través de varios biomarcadores como los marcadores de superficie celular CD133 (Prominin 1), CD15, CD34, CD44, L1CAM y A2B5, o factores de transcripción como Nestina, SOX2, Nanog o Musashi-1. No obstante, ninguno de estos marcadores es exclusivo de las GSC, ya que muchos también se expresan en células madre neurales sanas. (Rodríguez, S.M., et al. 2022; Lah, T.T., et al. 2020)

Las GSC se pueden clasificar en subtipos moleculares de la misma manera en que se clasifican los tipos de glioblastoma según sus perfiles de expresión genética e inmunohistoquímica: proneural, neural, clásico y mesenquimatoso. Las células de tipo proneural se asocian con la mutación IDH1, la amplificación de PDGFRA y la alta expresión de genes de desarrollo, mientras que las del tipo mesenquimatoso presentan la pérdida o mutación de NF1, TP53 y la activación de marcadores mesenquimales y de la vía NF- $\kappa$ B. No obstante, los subtipos de células no son fijos pues el GBM proneural primario puede reaparecer como GBM mesenquimatoso por un cambio molecular o por una mejor supervivencia de las GSC mesenquimales que ya

estaban presentes en el GBM proneural primario. Por otro lado, las células de tipo clásico se caracterizan básicamente por la amplificación de EGFR. (*Lah, T.T., et al. 2020 ; Biserova, K., et al. 2021*)

### **1.5 IL-1 $\beta$ e inflamación**

La interleucina-1-beta (IL-1 $\beta$ ) es una potente citocina proinflamatoria que resulta parte fundamental de las respuestas de defensa que tiene el organismo ante infecciones y lesiones. Junto a la interleucina-1-alfa (IL-1 $\alpha$ ) son las proteínas mejor caracterizadas y más estudiadas de entre los 11 miembros de la familia de la IL-1. Estas citocinas son producidas y secretadas por diferentes tipos de células, pero la gran mayoría de los estudios se centran en su producción dentro de las células del sistema inmunológico innato, como los monocitos, las células dendríticas o los macrófagos. (*Lopez, G., Brough, D. 2011*).

En cuanto a sus funciones, la IL-1 $\beta$  es generada en respuesta a infecciones por lo que es clave en la resolución de inflamaciones agudas, mientras que la IL-1 $\alpha$  se expresa de manera constitutiva en muchos tipos de células no inmunes donde permanece, principalmente, en el citosol o unida a la superficie celular y se libera en caso de necrosis celular. No obstante, a pesar de las diferencias funcionales que puedan tener, todos los miembros de la familia de la IL-1 se expresan como zimógenos, es decir, que la mayoría de estas citocinas requieren de escisión dentro del proteasoma para convertirse en formas maduras y biológicamente activas. En el caso de la IL-1 $\beta$ , primero se produce el complejo pro-IL-1 $\beta$  como un precursor inactivo de 31 kDa que luego es escindido por inflamasomas activados (a diferencia de los demás zimógenos de esta familia). Concretamente, el proceso inicia cuando este complejo multiproteico pro-IL-1 $\beta$  se ensambla en respuesta a señales de peligro exógenas o endógenas y, a su vez, induce la activación de caspasas (caspasa 1) que generarán la IL-1 $\beta$  bioactiva. (*Bent, R., et al. 2018*)

Una vez producida la IL-1 $\beta$  madura es secretada rápidamente de las células siguiendo una ruta “no convencional” de secreción celular, es decir, que no sigue la vía clásica de exportación de proteínas del retículo endoplasmático (RE). Algunos de los mecanismos de secreción que se han propuesto son; el rescate y redirección, que se basa en la exocitosis de los lisosomas que

contienen esta proteína, la liberación protegida, a través del desprendimiento de microvesículas de la membrana plasmática, y la liberación terminal, que se basa en la salida a través de poros de células que están en muerte celular (piroptosis). Al final, que ocurra uno u otro mecanismo de secreción puede depender de la fuerza del estímulo inflamatorio percibido por la célula. (Lopez, G., Brough, D. 2011).

La familia del receptor de interleucina -1 (IL-1R) está formada por 10 miembros que comparten una estructura muy similar. Son proteínas integrales con un dominio de inmunoglobulina extracelular y un dominio citoplasmático del receptor Toll/IL-1 (TIR), a excepción del receptor 2 (IL-1R2). De estos receptores, solo IL-1R1 e IL-1R2 son capaces de reconocer y unirse a IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , así como al antagonista del receptor IL-1Ra, pero como el receptor IL-1R2 carece del dominio TIR, no puede inducir ni activar la vía de señalización después de la unión al sustrato (IL-1 $\beta$  o  $\alpha$ ), es solamente un "receptor señuelo" por su capacidad para unirse a IL-1 sin iniciar la señalización. Ambos receptores se expresan en una gran cantidad de células, incluidas células inmunitarias. Una vez se unen las citocinas IL-1 $\alpha$  o IL-1 $\beta$  a su receptor principal (IL-1R1) ocurren cambios conformacionales en el receptor y se forman los complejos IL-1R1/IL-1R3, después de que el dominio TIR de IL-1R3 se acerque al dominio TIR de IL-1R1, lo que activa la vía de señalización. (Bent, R., et al. 2018 ; Fang, Z., Jiang, J. & Zheng, X. 2023)

### **1.5.1 IL-1 $\beta$ y cáncer**

Además del papel beneficioso que tiene la IL-1 $\beta$  en la resolución de inflamaciones agudas y en el inicio de respuestas antitumorales adaptativas, también se ha atribuido a esta citocina un aumento de la gravedad de enfermedades inflamatorias como: algunos trastornos neurológicos, como la epilepsia o el Alzheimer, de enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide, en la diabetes tipo 2 y en el desarrollo de tumores. (Bent, R., et al. 2018)

Se ha descrito que la IL-1 $\beta$  puede promover el crecimiento tumoral y la metástasis a través de diferentes mecanismos. Por ejemplo, niveles altos de esta proteína pueden impulsar la activación sostenida de NF- $\kappa$ B y de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), o pueden promover la expresión de genes protumorales que codifican para proteínas del ciclo celular y

antiapoptóticas, e incluso pueden activar vías de señalización alternas como la de la proteína quinasa B (AKT). (*Bent, R., et al. 2018*)

Algunos de los tipos de tumores que puede desencadenar la inflamación persistente son el mieloma, el cáncer gástrico, el cáncer de páncreas, el cáncer de pulmón, el cáncer de cabeza y cuello y el cáncer de hígado. Este último, por ejemplo, puede desencadenarse después de que la IL-1 $\beta$  impulse la inflamación hepática, así como también es responsable de inducir una metilación aberrante en el ADN y aumentar el riesgo de cáncer gástrico. Los niveles de esta interleucina también están aumentados entre 2 y 3 veces más en las células epiteliales de las vías respiratorias de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad que constituye un factor de riesgo importante para desarrollar cáncer de pulmón. (*Pretre, V, et al. 2022*)

También se ha demostrado, que cuando la citocina IL-1 $\beta$  está presente en el microambiente tumoral es capaz de inducir la angiogénesis y conducir hacia la invasión a las células tumorales, pues se ha visto en estas un aumento elevado de la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) así como un aumento en la densidad de los vasos sanguíneos. De esta manera, una sobreproducción de IL-1 $\beta$  facilita el camino para la inducción y crecimiento de tumores que puede culminar en el proceso de metástasis, pues ya se ha probado que hay niveles altos de esta citocina en metástasis de cáncer de pulmón, entre otros. (*Bent, R., et al. 2018 ; Kore, R.A., Abraham, E.C. 2014*)

### **1.5.2 IL-1 $\beta$ y glioblastoma multiforme**

El GBM se caracteriza por la rápida invasión local de células tumorales hacia estructuras cerebrales normales adyacentes y por la formación de extensas áreas de necrosis, que están rodeadas de células anaplásicas. Este tipo de muerte celular por necrosis justamente es la responsable de desencadenar la inflamación y liberación de mediadores proinflamatorios, entre los que se encuentra la IL-1, una de las principales citocinas reguladoras de este proceso. (*Hurmath, K., et al. 2014*)

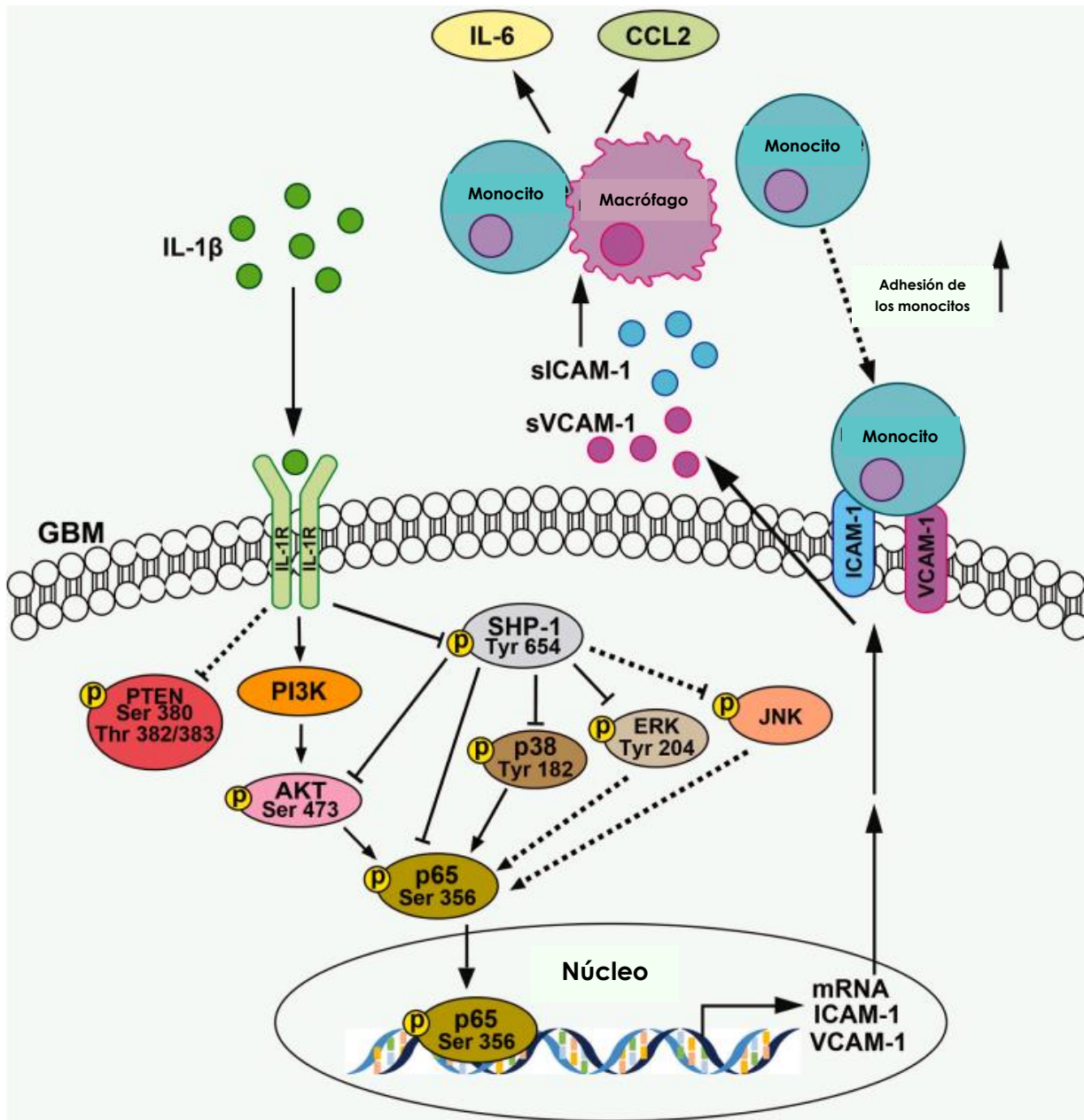
Concretamente, se ha visto que el microambiente tumoral de los glioblastomas contiene varios factores de crecimiento y citocinas proinflamatorias, entre las que destaca la IL-1 $\beta$ . Esta es una



de las citocinas que más comúnmente están presentes en el glioblastoma y su principal fuente de producción son las propias células del tumor, aunque también los macrófagos (M1), los monocitos y la microglía, que son las principales células inmunitarias que constituyen el microambiente del GBM, pueden producirla. (*Sun, W., et al. 2014; Shen, C.K., et al. 2021*)

Uno de los estudios más recientes y claros sobre el papel de esta citocina proinflamatoria sobre las células de glioblastoma multiforme, fue llevado a cabo por *Hurmat, K y colaboradores*, quienes demostraron, en el 2014, que la IL-1 $\beta$  promueve la proliferación, migración e invasión de células de glioma humano. Concretamente, observaron que la migración y la invasión son promovidas por la IL-1 $\beta$  en dos líneas celulares de glioblastoma (U87MG y U251MG), mientras que el efecto proliferativo se observó solo en las células U87MG. También determinaron que como el antagonista IL-1Ra fue capaz de inhibir la migración, la invasión y los efectos proliferativos mediados por IL-1 $\beta$ , entonces los efectos de esta citocina proinflamatoria deben actuar sobre el receptor de IL-1 (IL-1R). Además, la IL-1 $\beta$  es el inductor más potente de factores proangiogénesis y proinvasión como VEGF y MMP en astrocitos humanos y células de glioma, por lo que se cree que podría llegar a inducir una transformación similar a la transición epitelio-mesenquimal (EMT) en las células de glioblastoma. (*Tarassishin, L., et al. 2014*)

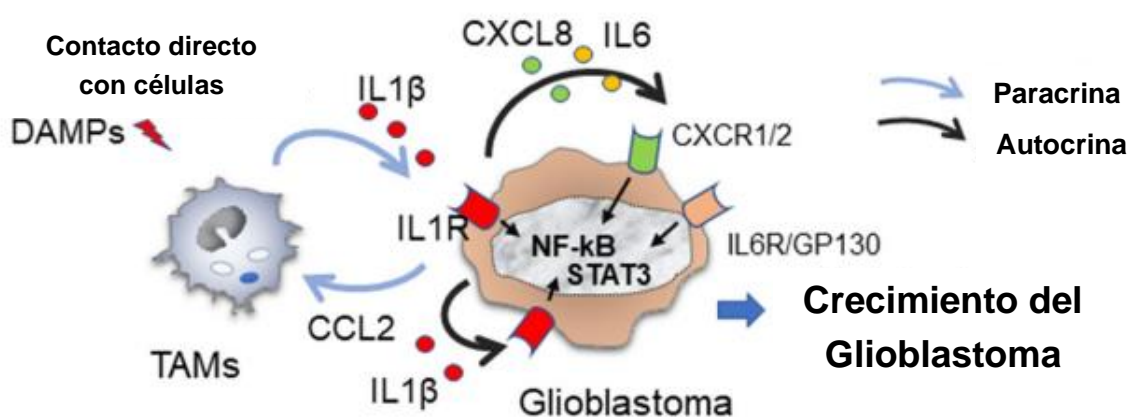
En cuanto al mecanismo de acción de la IL-1 $\beta$ , varios estudios han demostrado que la IL-1 $\beta$  puede activar diversas vías intracelulares y que eso puede generar un impacto diferente en la progresión del glioblastoma, pero cada vez hay más información sobre el camino que puede seguir esta citocina hasta causar la progresión del GBM. Una propuesta de mecanismo regulador se basa en que la unión de la IL-1 $\beta$  a su receptor (IL-1R) en las células de GBM provoca la desfosforilación de SHP-1 y la activación de p38 y AKT, promoviendo así la señalización de NF- $\kappa$ B. Esto daría como resultado proteínas y formas solubles de VCAM-1 e ICAM-1, que mejoran la infiltración de monocitos en el microambiente y la secreción de CCL2 e IL-6 por parte de los macrófagos, citocinas proinflamatorias que inducen un crecimiento aún mayor del glioblastoma y de la capacidad invasiva y de resistencia a fármacos. (*Shen, C.K., et al. 2021; Chaudhary, R., et al. 2021*)



**Figura 4.** Diagrama de la interacción entre células de GBM y TAM's inducida por IL-1 $\beta$  (Modificada de: Shen, C.K., et al. 2021).

Otra propuesta de mecanismo de acción de la IL-1 $\beta$  más reciente es que diferentes patrones moleculares asociados al daño (DAMP's) podrían estimular a los macrófagos asociados al microambiente del glioblastoma (TAM) para secretar IL-1 $\beta$ . Una vez secretada, como esta interleucina puede seguir la vía autocrina (captada por la misma célula) o paracrina (hacia otras células), activaría las células tumorales de glioblastoma e induciría la secreción de nuevas

citocinas proinflamatorias y factores como más IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL8 y CCL2, entre otras. Una vez secretadas, las interleucinas 1 $\beta$  y 6, junto con CXCL8, podrían causar el crecimiento del glioblastoma al activar la vía de STAT3 y NF- $\kappa$ B y CCL2 podrían reclutar más células inmunesupresoras e inducir la migración de los TAM hacia el centro del tejido tumoral. (Sun, W., et al. 2014; Kai, K., et al. 2022)



**Figura 5.** Esquema hipotético de la interacción mediada por IL-1 $\beta$  entre los macrófagos asociados al tumor y las células de glioblastoma (Modificada de: Kai, K., et al. 2022).

Además, esta secreción de IL-1 $\beta$  y otros factores asociados con la hipoxia, la angiogénesis y la invasión tumoral por los TAM's, también estarían causando un aumento en la habilidad de las células de glioblastoma para formar neuroesferas, es decir, nuevas células madre cancerígenas autorrenovadoras y quimiorresistentes. (Zhu, X., et al. 2023) En la línea celular de glioblastoma humano U87MG, por ejemplo, se ha visto que la exposición crónica a IL-1 induce la expresión de COX-2, que respalda la propiedad de autorrenovación de las GSC. (Lee, S.Y., et al. 2017) Sin embargo, el mecanismo mediante el cual la IL-1 $\beta$  podría mejorar y aumentar la propiedad de células madre cancerígenas de glioblastoma (GSC) puede ser muy variado y todavía no está bien descrito.

## 1.6 Cultivos celulares

Las líneas celulares de gliomas constituyen una herramienta imprescindible para poder descubrir los mecanismos moleculares que son relevantes en el comportamiento maligno de los gliomas y se pueden usar tanto *in vitro* como en modelos *in vivo*, con la finalidad de identificar y probar nuevas dianas terapéuticas. (Bady, P., et al. 2012)

Hay varias líneas celulares de glioblastoma humano, que permiten su estudio e investigación *in vitro*: las U-373 MG, U-138 MG, U-87 MG, DBTRG-05MG, T98G, H4, CCF-STTG1 y Hs 683.

Las células U87MG (abreviación de “Upsala 87 Malignant Glioma”) fueron obtenidas en 1966 por un grupo de investigadores de la Universidad de Upsala, en Suecia y constituyen una línea celular con morfología epitelial de glioblastoma humano. Se obtuvieron a partir de una biopsia de un hombre de 44 años que padecía de glioblastoma clasificado como astrocitoma de grado 4. (Mullins, C.S., et al. 2013)

Las mutaciones del gen IDH1 se observan en astrocitomas de grado inferior como oligodendrogliomas y en el glioblastoma secundario, pero son raras en glioblastoma primario. Una de las líneas celulares de glioblastoma más utilizadas y establecidas, como es la U87MG, ha evolucionado sin mutaciones de IDH1 por lo que se describe como isocitrato deshidrogenasa (IDH) de tipo salvaje y promotora de la metilación de la O6-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT). La expresión normal de MGMT protege el genoma celular de los efectos mutagénicos de los agentes alquilantes, como la temozolomida (TMZ), por lo que forma parte del mecanismo más popular de resistencia a TMZ, pero como en las U87MG está metilada, estas células son sensibles a la TMZ. (Yi, G., et al. 2016; Ohba, S., et al. 2014)

Con respecto al estado del gen p53, “el guardián del genoma”, las líneas celulares de glioma se parecen a los tumores originales y, por lo tanto, son adecuadas para estudiar los cambios biológicos asociados con las mutaciones de p53 en los tumores gliales. Las células de glioblastoma humano U87MG son células que expresan p53 normal, mientras que las células U251MG son células de glioma que expresan p53 mutantes. (Hurmath, K., et al. 2014)

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) constituyen un grupo muy variado de tumores, cada vez más frecuentes, e incluyen desde lesiones benignas hasta lesiones altamente invasivas y poco diferenciadas que representan casi el 90% de todas las neoplasias malignas del SNC. El glioblastoma multiforme (GBM) es el glioma diagnosticado con mayor frecuencia (69%), por lo que es el tumor cerebral primario maligno más común y agresivo en adultos. La mediana de supervivencia de los pacientes con este tipo de cáncer es menor a los 2 años, incluso después de recibir el tratamiento óptimo, y eso es debido a su alta agresividad. Una de las características más significativas de este tipo de tumor, es su recurrencia, la cual se debe entre otras causas, a un aumento en la proporción de células madre cancerígenas presentes en el tumor primario. Estas células se caracterizan por presentar resistencia a fármacos y radiaciones ionizantes, las cuales producirán células tumorales resistentes y más agresivas a las del tumor inicial, haciendo más ineficiente los tratamientos terapéuticos.

El microambiente tumoral de los glioblastomas contiene diferentes factores de crecimiento y citocinas que pueden impulsar la progresión de ese tipo de cáncer, como lo es la interleucina proinflamatoria IL-1 $\beta$ . Esta es una de las citocinas más comunes presentes en el glioblastoma y es capaz de impulsar el proceso de neuroinflamación, la invasión y la progresión del tumor.

Por lo tanto, el propósito de este trabajo es evaluar si la presencia de la citocina IL-1 $\beta$  estimula la inducción de células madre cancerígenas, para lo cual se evaluarán los niveles de expresión de algunos marcadores clásicos de células madre (NANOG, NESTIN, OCT-4, SOX2, CD133, CD44 y ABCG2). Los resultados obtenidos de este estudio o investigación podrían proponer a esta proteína (IL-1 $\beta$ ) como un nuevo blanco terapéutico para reducir la recurrencia del glioblastoma multiforme y de esta forma mejorar el pronóstico y calidad de vida del paciente.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor cerebral más agresivo y mortal porque se caracteriza por una recurrencia inevitable dentro del primer año de tratamiento y por una alta resistencia a la quimioterapia y radioterapia. El tratamiento estándar después de la resección quirúrgica es la quimioterapia con *Temozolomida* como agente alquilante que causa la apoptosis de las células tumorales, pero las células madre cancerígenas (CSC), una subpoblación muy importante de células pluripotentes y autorrenovables que están presentes en el tumor, hacen que el glioblastoma sea altamente resistente a este y a todos los enfoques terapéuticos.

Las CSC se caracterizan por tener diferentes mutaciones a nivel genético y epigenético que hacen que el GBM sea un tumor muy heterogéneo y esto, junto a su alta plasticidad, hace que la terapia adecuada o la eficiencia del tratamiento para este tumor sea más difícil de conseguir, debido a las modificaciones moleculares y patológicas que presentan. Uno de los mecanismos de resistencia a la quimioterapia inducidos por las CSC es la inactivación metabólica de los fármacos como la *Temozolomida*.

Además, las CSC o también conocidas como células madre gliales (GSC) del glioblastoma que no se eliminan con la quimioterapia, junto con las células inmunitarias del microambiente del tumor, son capaces de secretar factores estimulantes como las interleucinas 1, 6 y 8, que apoyan el mantenimiento de la potencia de las CSC y participan en la recaída del tumor. Concretamente, la IL-1 $\beta$  podría ser una responsable directa de aumentar la concentración de células madre cancerígenas en el glioblastoma, por lo que sería importante profundizar en esta investigación. Pero, ¿será la interleucina 1 $\beta$  un buen blanco farmacológico para reducir la tasa de recurrencia de los pacientes con glioblastoma y alargar su esperanza de vida?

#### **4. HIPÓTESIS**

El tratamiento con IL-1 $\beta$  de las células de glioblastoma humano U87MG induce un aumento en la expresión de algunos de estos marcadores de células madre cancerígenas (CSC): CD44, CD133, ABCG2 (superficie celular) o SOX2, OCT4, NANOG y NESTINA (biomarcadores intracelulares).

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 Objetivo General**

Evaluar la expresión de diferentes marcadores de células madre (CSC) en las células de glioblastoma humano U87MG tratadas con IL-1 $\beta$ .

##### **5.2 Objetivos Específicos**

1. Determinar la presencia del ARNm que codifica para marcadores de células madre (CSC): NANOG, NESTIN, OCT4, SOX2, CD133, CD44 y ABCG2 en células de glioblastoma humano U87-MG.
2. Investigar si la presencia de IL-1 $\beta$  modifica los niveles de expresión de los marcadores de células madre NANOG, NESTIN, OCT4, SOX2, CD133 y CD44 en células de glioblastoma humano U87-MG.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Cultivo celular (células U87MG)**

Las células U87 MG, obtenidas de la ATCC (American Type Culture Collection), se sembraron en matraces de cultivo de poliestireno de 25 cm<sup>2</sup> de superficie, con medio de cultivo *Advanced DMEM* (Gibco, EUA) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L-Glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico-antimicótico (25µg/ml de anfotericina B, 10.000 µg/ml de estreptomycin y 10.000 unidades/ml de penicilina). 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 cuando alcanzó una confluencia del 90% las células se expusieron a 2 mL de una solución salina Tripsina- EDTA al 0.25% (Sigma- Aldrich, EUA) para despegarlas. Sin embargo, antes de eso se retiró el medio de cultivo y lavó 2 veces con 5 mL de PBS estéril a una concentración de 1X, para luego adicionar los 2 mL de tripsina y dejar reposar entre 3 y 5 min. Pasado este tiempo, se resuspendió todo con medio estéril y la suspensión celular obtenida se pasó a un tubo cónico que se centrifugó a 1500 rpm por 5 min. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y la pastilla celular que quedó en el tubo, se resuspendió con medio de cultivo, a partir del cual, se tomaron alícuotas para regenerar el cultivo madre y sembrar las células que se utilizarían para experimentos posteriores. Todo esto en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

### **6.2 Reactivos**

Se utilizó IL-1β recombinante humana (Invitrogen) diluida en 10 ml de BSA al 1% en PBS para generar una solución stock de 2 µg/ml. Se realizaron experimentos con una concentración de IL-1β de 10 ng/ml en un tiempo de 96 horas, para después realizar los experimentos de RT-PCR y de supervivencia celular.



### **6.3 Ensayo de expresión génica**

#### **a) Extracción de ARN total**

Las células U87 se sembraron en placas y una vez que alcanzaron una confluencia del 50%, se cambió el medio de cultivo y se dio inicio al tratamiento correspondiente, con cambio de medio cada 24 horas. Una vez considerado el tiempo respectivo al tratamiento (96 horas) se procedió a realizar la extracción del RNA total por medio de un kit comercial *FavorPrep™, 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 añadió tripsina (500 µL) por 5 minutos, luego se añadieron 750 µL de medio de cultivo, se preparó el buffer de lisis suplementado con 1% de β- mercapto-etanol y se agregaron 350 µL de buffer de lisis por pozo (después de centrifugar, quitar todo el medio y dejar solo la pastilla formada). Posteriormente, con ayuda de una micropipeta se resuspendió y se transfirió la mezcla a la columna con el filtro blanco, se centrifugó a 13000 rpm por 2 min, se desechó la columna blanca y a lo que quedó en los tubos colectores se le agregó 350 µL de etanol al 70%. La mezcla resultante se colocó en otros tubos con los filtros rojos, se centrifugaron a 13000 rpm por 2 min, se les retiró el sobrenadante a los tubos y se realizaron 3 lavados: 1 lavado con buffer de lavado uno y 2 lavados con buffer de lavado dos. Tras cada lavado, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 2 min, 12 mil rpm por 2 min y 13 mil rpm por 3 min, respectivamente. Por último, se realizó una 3ª centrifugada en seco, se transfirieron los filtros rojos a nuevos tubos y se agregaron 30 µL de agua libre de RNAsas. Se dejó reposar todo por 3 minutos a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó a 12000 rpm por 3 minutos para obtener el RNA total.

#### **b) Cuantificación de ARN**

Posterior a la extracción, se cuantificó la concentración y la cantidad 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 determinó como el cociente obtenido entre las longitudes de onda 260 nm y 280 nm (A260/A280). El valor del cociente obtenido debe 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 (ADNc)

Para la síntesis de la primera cadena de Ácido Desoxirribonucleico complementario al ARN extraído (ADNc), se utilizó 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 6 µL de forma común a todas las muestras.

REACTIVO	VOLUMEN al 1x
Buffer RT	4 µL
Random	0.5 µL
dNTP's	1 µL
Mull	0.5 µL
<b>Total:</b>	<b>6 µL</b>

Para cada tubo (6) de reacción se usó un volumen de RT final de 20 µL, por lo que el volumen restante (14 µL) se complementó con la muestra de ARN obtenida previamente más agua libre de DNAsa.

Se realizaron los cálculos para conocer el volumen complementario de la muestra de ARN que fue requerido por cada tubo de reacción mediante una división:

- 1) **CN 1** →  $4000/556.6$  (concentración en µL/ml) = **7.18 µL/ml de RNA**
- 2) **CN 2** →  $4000/636.8$  (concentración en µL/ml) = **6.28 µL/ml de RNA**
- 3) **CN 3** →  $4000/719.8$  (concentración en µL/ml) = **5.55 µL/ml de RNA**

Entonces el volumen de 20 µL de RT final quedó formado por:

- 1) **6 µL** del mix RT + **7.18 µL** de muestra de RNA + **6.82 µL** de agua libre de DNAsa.
- 2) **6 µL** del mix RT + **6.28 µL** de muestra de RNA + **7.72 µL** de agua libre de DNAsa.
- 3) **6 µL** del mix RT + **5.55 µL** de muestra de RNA + **8.45 µL** de agua libre de DNAsa.

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

A partir del ADN complementario obtenido en la retro-transcripción se realizó la 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  $\mu$ L. Los oligonucleótidos que se utilizaron se muestran en la siguiente tabla:

Oligonucleótido	Sentido	Secuencia	Tamaño del amplicón (pb)	T <sub>m</sub> (°C)
<b>NANOG</b>	Forward	CCCAAAGTGGTGGGATTATAGG	391	64.4
	Reverse	CCAGTCTGAGCAGCAGAATAAG		
<b>OCT-4</b>	Forward	GTGAAGCTGGAGAAGGAGAAG	190	63.1
	Reverse	AGATGGTCGTTTGGCTGAATA		
<b>SOX 2</b>	Forward	AATGCCTTCATGGTGTGGT	247	62.5
	Reverse	GCAGCGTGTACTTATCCTTCTT		
<b>NESTIN</b>	Forward	CACTCAGAGGGAAGGAGATAGA	290	62.8
	Reverse	GATGGAGCAGGCAAGAGATT		
<b>CD133</b>	Forward	GAGACCCAAGACTCCCATAAAG	197	63.1
	Reverse	CCCAGGACACAGCATAGAATAA		
<b>CD44</b>	Forward	ACCCAAAGGGTGAAGCTATTT	248	63.1
	Reverse	CCATTCTCAGCTCTTCCTGATAC		
<b>ABCG2</b>	Forward	CACCTCCTTCTGTCATCAACTC	753	62.9
	Reverse	AGATCGATGCCCTGCTTTAC		
<b><math>\beta</math>-actina</b>	Forward	ATCCTGCGTCTGGACCTGGCTG	559	72.9
	Reverse	CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTG		

REACTIVO	VOLUMEN
<b>Green Dream Taq</b>	10 $\mu$ L
<b>Primer Forward</b>	1 $\mu$ L
<b>Primer Reverse</b>	1 $\mu$ L
<b>Agua nucleasa free</b>	6 $\mu$ L
<b>ADNc</b>	2 $\mu$ L
<b>Total:</b>	<b>20 <math>\mu</math>L</b>

Se empleó 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 ( $T_m$ ) del oligonucleótido a utilizar, 1 minuto a 72°C y 10 minutos a 72°C, todo esto por 30 ciclos y finalmente la temperatura de los tubos se llevó a 4°C para ser almacenados en congelación hasta su empleo.

#### e) Separación de los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa

Se continuó con la separación electroforética utilizando geles de agarosa al 1.2% teñidos con Bromuro de etidio (BrEt). Para la preparación del gel se disolvieron 0.6g de agarosa en 50 ml de buffer TAE 1X y la solución se calentó por 1 min y 30 segundos. Posteriormente, se añadieron 4  $\mu$ L de bromuro de etidio y todo se vertió en la cámara de electroforesis, dejando gelificar por 25 minutos a temperatura ambiente.

Una vez polimerizado, el gel se cargó con 4.5  $\mu$ L del marcador y 8  $\mu$ 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 buffer 6X DNA Loading Dye (ambos de Thermo Scientific, EUA).

La separación electroforética se llevó a cabo en buffer TAE 1X a 65 V (voltios) durante 80 minutos y 400 A, y finalmente, se obtuvieron las micrográficas del gel en el fotodocumentador de geles AXYGEN.

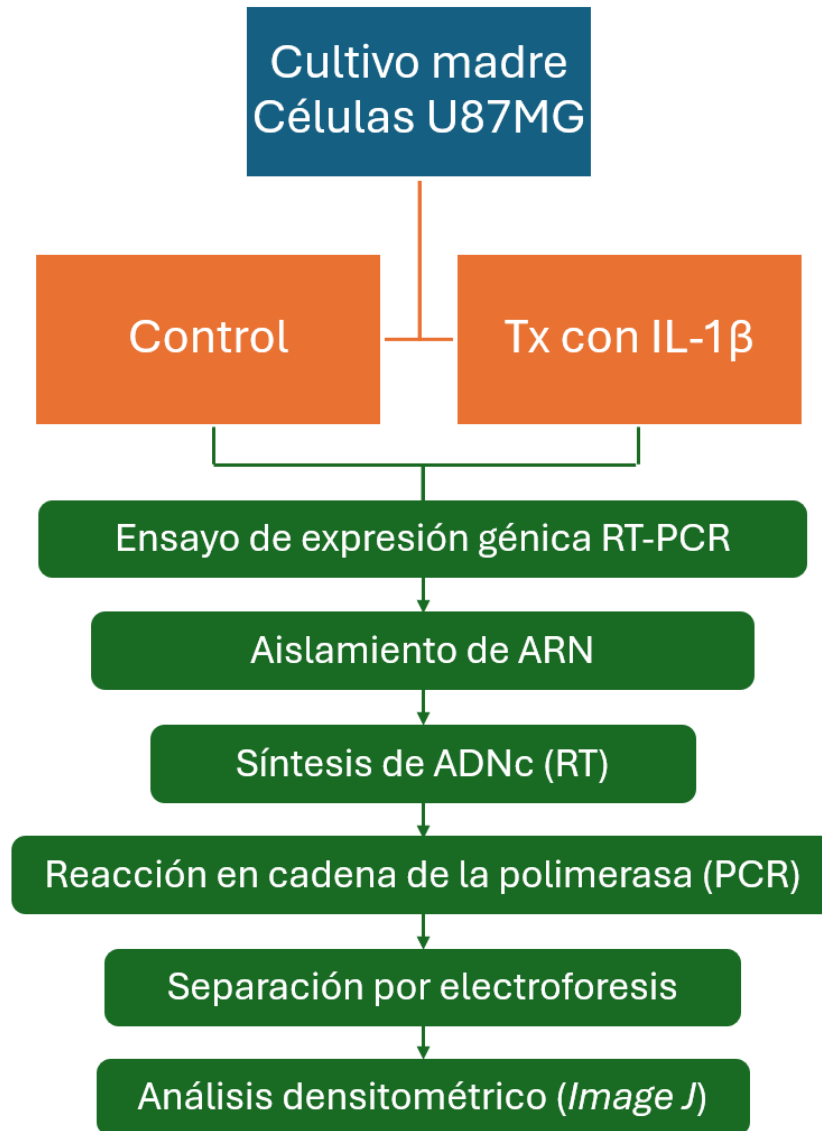
#### f) Densitometría

Se realizó el análisis densitométrico de las bandas presentes en las imágenes obtenidas 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).

#### **6.4 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 ( $p < 0.05$ ).

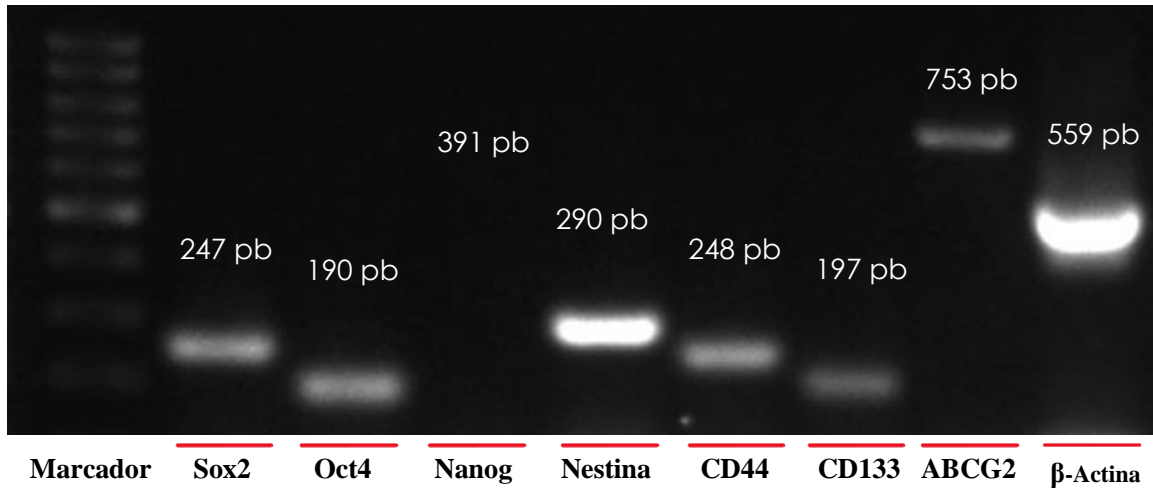
#### **6.5 Resumen: diagrama de trabajo**



## **7. RESULTADOS**

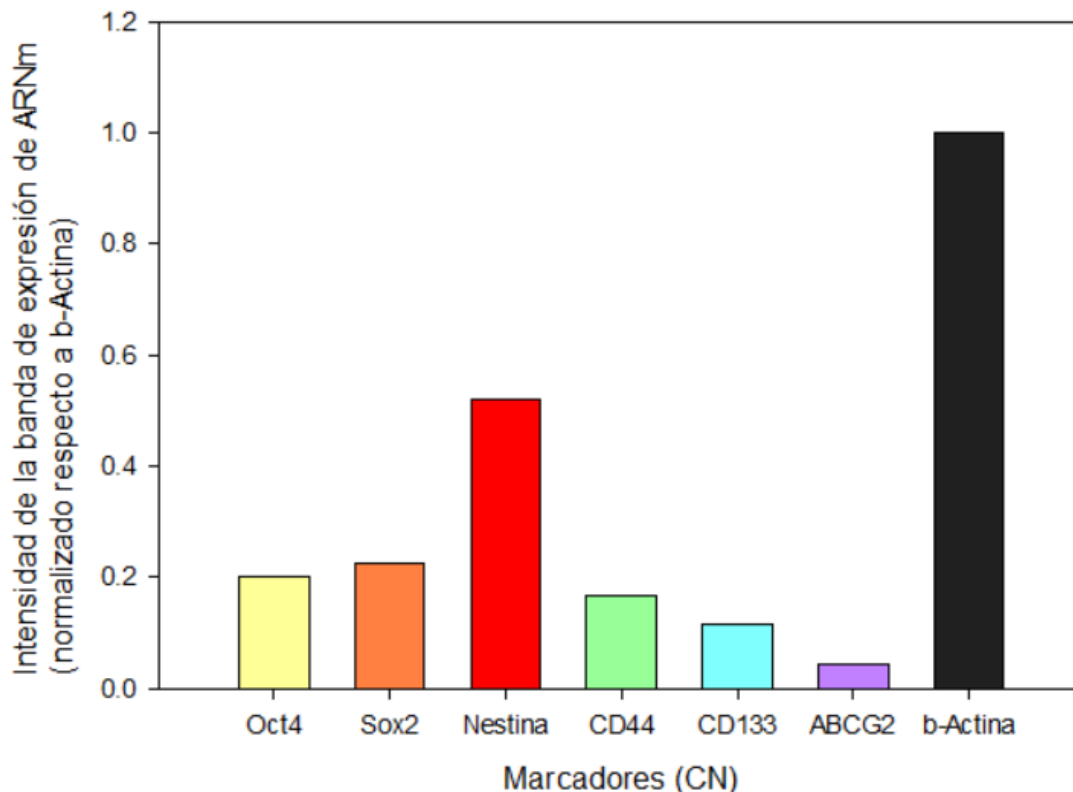
Los biomarcadores o marcadores celulares son importantes herramientas usadas en investigación que ayudan a diferenciar entre los distintos fenotipos celulares, por ejemplo, a las células madre cancerígenas (CSC) de las células tumorales normales, para así poder lograr una eficacia óptima del tratamiento. (*Gholamzad, A. et al. 2024*). Las células madre de glioblastoma (GSC), son responsables, al menos en parte, de la recurrencia del tumor, así como del pronóstico de supervivencia del paciente, por lo que resulta altamente significativo, poderlas identificar, aislar y analizar de manera individual, esto con el fin de entender su funcionamiento, y de esta manera, poder proponer estrategias terapéuticas para reducir la incidencia de recurrencia, así como mejorar la calidad y pronóstico de vida de los pacientes. De manera inicial, se propuso identificar que marcadores moleculares, relacionados al fenotipo de célula madre, tanto normal como tumoral, expresan las células U-87 en condiciones de cultivo estándar. Los marcadores moleculares de superficie celular que evaluamos fueron: CD133 (Prominin 1), CD44 y ABCG2, y los marcadores moleculares intracelulares: NESTINA, SOX2, NANOG y OCT4. Es importante mencionar, que estos marcadores moleculares no son exclusivos de las GSC, ya que también se pueden estar expresados en células madre neurales sanas o en células tumorales de otros tipos de cáncer. (*Rodríguez, S.M., et al. 2022*).

El resultado del ensayo de expresión génica que se presenta en la Figura 6, muestra que las células U87MG mantenidas en condiciones estándar de cultivo, son capaces de expresar el ARNm que codifica para algunos marcadores moleculares asociados al fenotipo de célula madre, tales como Sox2, Oct4, Nestina, CD44, CD133 y ABCG2. Las células U87MG no expresan el ARNm que codifica para Nanog, el cual está relacionado a un estadio más indiferenciado de las células, como célula madre toti o pluripotenciales.



*Figura 6. Nivel de expresión del ARNm de algunos marcadores de CSC en células U87MG. Se muestra una imagen representativa del resultado de RT-PCR de punto final.*

El análisis densitométrico de los productos de PCR que se presenta en la Figura 7, muestra una expresión diferencial de los diferentes marcadores moleculares de las células U87MG; siendo Nestina el marcador molecular más ampliamente expresado, mientras que CD133 y ABCG2, son los marcadores con menor nivel de expresión. La Nestina es uno de los marcadores moleculares más ampliamente relacionado con el fenotipo de células madre de tipo neural.



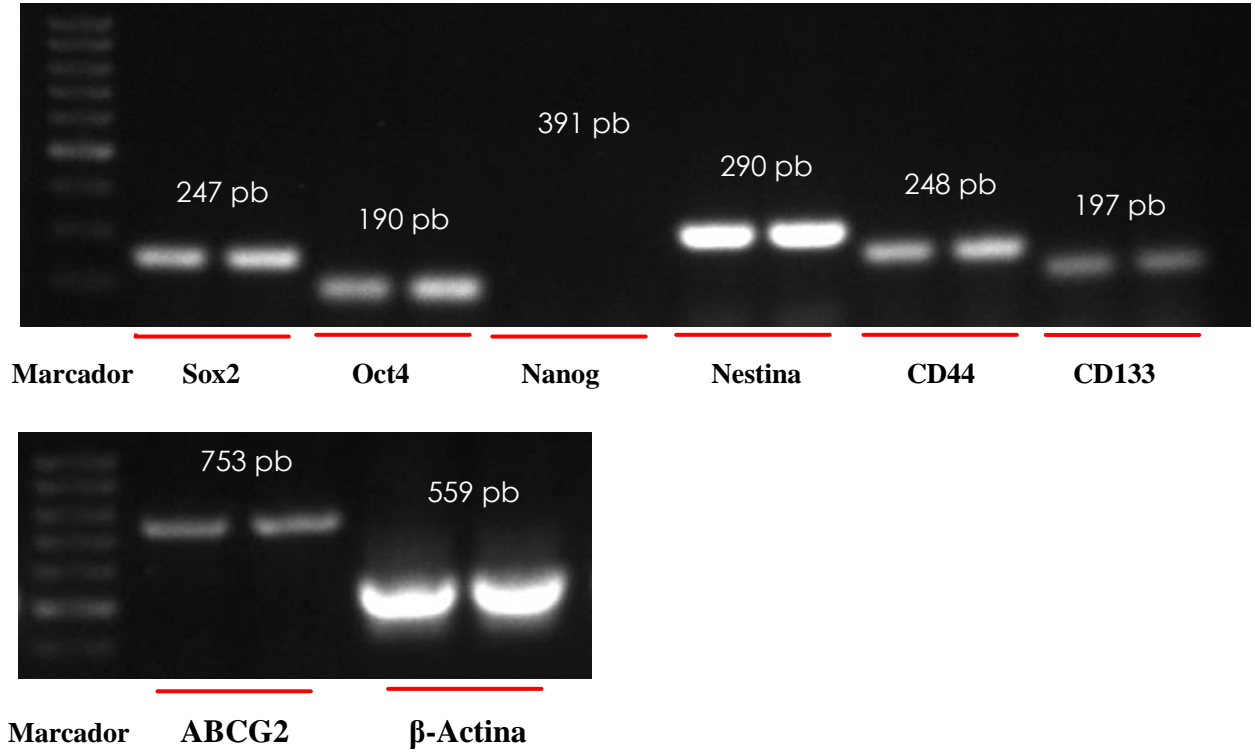
**Figura 7. Expresión diferencial de algunos marcadores de CSC en células U87MG.** Se muestra el gráfico obtenido del análisis densitométrico realizado a partir de la figura 6. Los valores graficados son el promedio de tres micrografías y la normalización se realizó con respecto al promedio de los niveles de expresión del ARNm que codifica para  $\beta$ -actina, el cual es considerado como control.

Existen algunas evidencias, que apoyan la propuesta de que el microambiente tumoral inflamatorio es un factor que favorece la inducción del fenotipo de células madre cancerosas en algunos tipos de tumores. En este contexto, se decidió investigar, si la presencia de una citocina proinflamatoria como IL-1 $\beta$  altera el nivel de expresión de uno o varios marcadores moleculares que las células U87MG expresan de manera basal. Las células U87MG fueron tratadas con una concentración de 10 ng/ml de IL-1 $\beta$  por 96 horas. Al finalizar el tratamiento, se aisló y purificó el ARN total para los ensayos de RT-PCR de punto final. El análisis densitométrico de los amplicones obtenidos en las dos condiciones experimentales (Figura 8), muestran que la presencia de IL-1 $\beta$  induce un incremento en los niveles de expresión del ARNm que codifica para los marcadores moleculares: Oct4, Nestina y ABCG2. La expresión

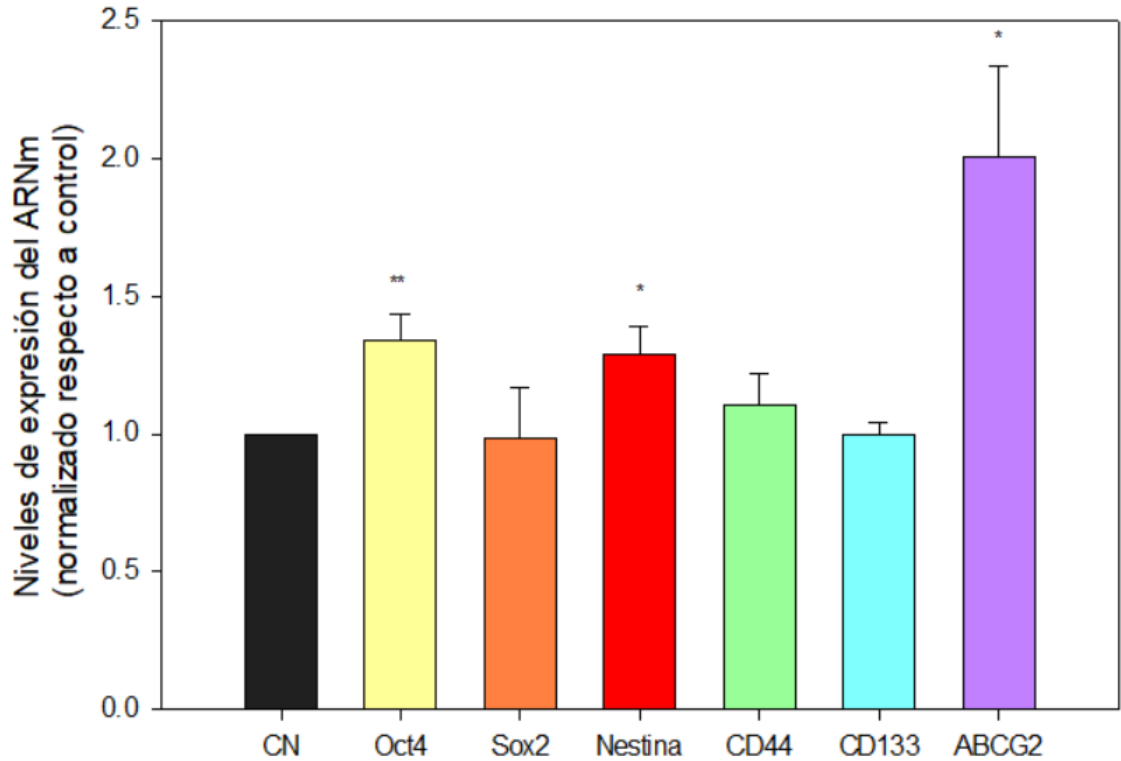


de los marcadores Sox2, CD44 y CD133 no resulta afectada de manera significativa por la presencia de IL-1 $\beta$ , y Nanog, sigue sin expresarse, aún en presencia de IL-1 $\beta$ .

A)



**B)**



**Figura 8.** El tratamiento con *IL-1 $\beta$*  aumenta la expresión del ARNm de los marcadores moleculares *Oct4*, *Nestina* y *ABCG2*. **A)** Se muestra una imagen representativa del resultado de la RT-PCR de punto final después de tratar a las células U87MG con 10 ng/ml de *IL-1 $\beta$*  por 96 horas. **B)** Se muestra el gráfico obtenido del análisis estadístico realizado a partir de la imagen A. Los valores graficados son el promedio con su error estándar de cuatro experimentos independientes. El símbolo \* representa que el valor de *p* es menor de 0.05 ( $p < 0.05$ ) y \*\* que la diferencia significativa es del 1% ( $p < 0.01$ ). 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. DISCUSIÓN

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor cerebral maligno primario más común, agresivo y con peor pronóstico, pues la tasa de supervivencia media para los pacientes que lo padecen es de tan solo 18 meses. Su alta tasa de mortalidad se debe a que es un tumor muy heterogéneo, con múltiples mutaciones subclonales que le otorgan la capacidad de resistencia a todos los enfoques terapéuticos que existen: resección quirúrgica, seguida de radioterapia junto con quimioterapia concomitante y adyuvante con temozolomida (TMZ). (*Rodríguez, S.M., et al. 2022; Yuan, Y., et al. 2021*)

Concretamente, las células madre cancerosas (CSC) que conforman el glioblastoma constituyen la principal subpoblación de células responsables de la resistencia a medicamentos y de la recurrencia tumoral, debido a sus capacidades de autorrenovación, diferenciación e iniciación metastásica. Pero no son todas iguales, precisamente la alta plasticidad que presentan hace que existan diferencias tanto fenotípicas como funcionales dentro de esta misma población por lo que se pueden encontrar diferentes tipos de CSC como; CSC inactivas, CSC progenitoras, células parecidas a las progenitoras y células diferenciadas que progresivamente pierden capacidad de autorrenovación y adquieren capacidad proliferativa (iniciadoras de metástasis). Gracias al avance de la tecnología y a técnicas como la citometría de masas o la citometría de flujo, se pueden separar y caracterizar estas células para así observar cómo su heterogeneidad funcional se refleja en la heterogeneidad fenotípica (diferentes proteínas y marcadores celulares). (*Mohan, A., et al. 2021*)

Por esta razón, en el presente trabajo se decidió evaluar primero mediante RT-PCR de punto final la expresión de algunos de los marcadores celulares que ya se han reportado en células madre cancerígenas de glioblastoma (GSC. En los artículos publicados por *Rodríguez, S.M. y colaboradores (2022)* o por *Lah, T.T. y colaboradores (2020)* se identifican a los marcadores de superficie celular CD133, CD15, CD34, CD44, L1CAM, A<sub>2</sub>B<sub>5</sub>, y a los factores de transcripción Nestina, Sox, Nanog o Musashi-1, como los biomarcadores típicos de células madre de glioblastoma (GSC). No obstante, en este trabajo se decidió evaluar solo a algunos de ellos (Oct4, Sox2, Nanog, Nestina, ABCG2, CD133 y CD44). En el caso de la línea celular U87MG y tal y como se puede ver en la imagen del primer resultado se expresan

la mayoría de estos marcadores a excepción de Nanog. Además, se puede observar que la banda del marcador de Nestina se expresa con mucha más intensidad que las bandas de los otros marcadores, por lo que inferimos que este biomarcador intracelular es más abundante en las células U87MG que los otros marcadores. La expresión de CD133 y ABCG2, ambos marcadores de la membrana celular, es baja, pero se puede observar claramente que sí se expresan en dichas células en comparación con Nanog.

La expresión nula de Nanog es sorprendente ya que se sabe que este factor de transcripción es un biomarcador de células madre cancerosas común y desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de su autorrenovación y la pluripotencia. También está involucrado en la mejora del crecimiento celular, en la disminución de la apoptosis, el aumento de la tumorigenicidad, la metástasis y la resistencia a los medicamentos en varios tipos de células tumorales incluyendo las células madre de glioblastoma (GSC). (*Yuan, Y., et al. 2021*) Por esta razón, que no se haya expresado en las células U87MG puede resultar controversial pero puede explicarse fácilmente con el hecho de que la presencia y la intensidad de los marcadores pueden variar durante las transformaciones cancerosas, pues una de las características distintivas de las CSC es precisamente su potencial para generar poblaciones fenotípica y funcionalmente heterogéneas. (*Mohan, A., et al. 2021*) (*Gholamzad, A., et al. 2024*) Por otro lado, cabe resaltar que el oligonucleótido de Nanog fue utilizado previamente en otros experimentos con otras líneas celulares tumorales y su expresión era positiva, de manera que el hecho de que no se haya expresado en este caso no es por error de su funcionalidad.

En cuanto a la expresión del marcador de Nestina, que fue la más alta, concuerda con lo esperado ya que esta proteína se expresa de manera abundante en células madre neurales y es de los marcadores de pronóstico más usados contra gliomas, pues se correlaciona directamente con su malignidad. Concretamente, está más relacionada con los gliomas de alto grado como el glioblastoma, así como con la baja tasa de supervivencia de los pacientes, tanto a nivel de expresión de proteína como de ARNm. Las células madre de glioblastoma necesitan de la expresión de esta proteína para poder tener su capacidad de plasticidad celular, así como para poder expandir y aumentar su población, por lo que es normal que haya sido el biomarcador con mayor expresión a nivel de ARNm en las U87MG. (*He J., Liu Y., Lubman*

*D.M. 2012; Bien-Möller, S., et al. 2018; Wang, Q., et al. 2021; Ludwig, K., & Kornblum, H.I. 2017)*

La baja tasa de respuesta del glioblastoma multiforme a cualquier forma de tratamiento existente también se debe a la heterogeneidad intratumoral, es decir, a la variedad de células que conforman su nicho tumoral y que pueden estar produciendo y secretando sustancias que influyen en la agresividad y capacidad de resistencia del tumor. Concretamente, el microambiente tumoral del glioblastoma está formado por células estromales (endoteliales, pericitos), células neurales (neuronas, astrocitos reactivos) y células inmunes invasoras que también forman parte de la microglía. Dentro de estas últimas se encuentran los macrófagos, las células dendríticas, algunos neutrófilos y los monocitos, cuya infiltración y acumulación dentro de la masa tumoral está directamente relacionada con el grado de malignidad del glioma, siendo el glioblastoma el más infiltrado (grado IV). Durante el inicio y la evolución del tumor, los macrófagos asociados (TAM) y el resto de las células de la microglía intentan destruir las células neoplásicas mediante la liberación de factores de crecimiento, factores citotóxicos, quimiocinas y citocinas como el TNF- $\alpha$ , la IL-6 o la IL-1, pero con la producción de estas sustancias contribuyen a la malignidad del tumor al promover la invasión, metástasis, angiogénesis y evasión del ataque inmunológico. (*Wang, L., et al. 2012; Al-Kharboosh, R., et al. 2020; Tarassishin, L., Casper, D. & Lee, S.C. 2014; Chaudhary, R., Morris, R.J. & Steinson, E. 2021*)

El mediador inflamatorio maestro y más producido de manera abundante en el microambiente tumoral del glioblastoma es la citocina proinflamatoria IL-1 $\beta$ . Esta citocina contribuye a la pérdida de la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE) mediante la expresión de genes que favorecen la plasticidad de los vasos, por lo que es el principal inductor del edema vasogénico característico del GBM. Cuando esto ocurre, la infiltración de células inmunosupresoras en la masa tumoral es continua por lo que se da una secreción crónica de más citocinas proinflamatorias y de factores proangiogénesis y proinvasión como VEGF y MMP, que contribuyen en la progresión del glioma. También, se ha demostrado que la IL-1 $\beta$  aumenta los niveles de expresión de los promotores de tumores COX2, CCL2, e IL-8 y actúa como un inhibidor de la apoptosis tumoral al inducir la señalización de STAT3. (*Al-Kharboosh, R., et al. 2020 ; Wang, L., et al. 2012 ; Hübner, M., et al. 2020*)

Todo esto en conjunto ha sido reportado en varios artículos como, por ejemplo, el de *F. Hurmath y colaboradores* quienes demostraron, en el 2014, que la estimulación con IL-1 $\beta$  de la línea celular de glioblastoma U87MG, que expresa p53 de tipo normal, promovía la proliferación, migración e invasión de las células tumorales. Estos tres comportamientos celulares promovidos por la IL-1 $\beta$  también se asocian con las células madre de glioblastoma (GSC) lo que sugiere que las citocinas pueden contribuir al desarrollo de nuevas células madre. Las GSC, además, se caracterizan por su capacidad para formar esferas de células conocidas como “neuroesferas” que tienen un potencial oncogénico todavía mayor al promover la autorrenovación y la resistencia a la quimioterapia y radioterapia. (*Wang, L., et al. 2012*). En 2012, *Wang y colaboradores*, demostraron que la combinación de IL-1 $\beta$  con el factor TGF- $\beta$  promovía la formación de neuroesferas en la línea celular de glioma humano LN-229 y que, por lo tanto, aumentaba la quimiorresistencia, la invasividad y el potencial oncogénico de estas, características directamente relacionadas con las GSC. Más adelante, en 2015, *Feng y colaboradores* confirmaron la hipótesis de que las citocinas pueden contribuir al desarrollo de nuevas células madre al aumentar el fenotipo de células madre cancerosas en algunas células de glioma.

Sin embargo, esta capacidad de inducción de nuevas células madre de la citocina IL-1 $\beta$  no ha sido estudiada en las células de glioblastoma humano U87MG, por lo que, en este trabajo, una vez evaluada la expresión normal de los biomarcadores de células madre se determinó si el tratamiento de las mismas células con la citocina IL-1 $\beta$  podía inducir o no un aumento en la expresión del fenotipo (aumento en la expresión de los mismos marcadores) de células madre cancerígenas. Como se puede observar claramente en la imagen del último resultado (A), obtenida después de la RT-PCR de punto final, hay un aumento de la intensidad en las bandas de expresión del ARNm que codifica para los marcadores de células madre Sox2, Oct4, Nestina, CD44 y ABCG2. Por el contrario, parece que la intensidad de la banda de expresión del biomarcador CD133 disminuyó con el tratamiento con IL-1 $\beta$  y, como era de esperar, la expresión del factor de transcripción NANOG se mantuvo nula como el control. No obstante, a pesar de que a simple vista se puede observar un aumento en 5 de los 7 marcadores de células madre, el análisis estadístico de la imagen A y de otros tres experimentos independientes reveló que solo existe una diferencia significativa en 3 de ellos: Oct4, Nestina y ABCG2. Esto se observa mejor en el gráfico de barras del segundo resultado

(B), donde se puede ver que el nivel de expresión del ARNm de Nestina aumenta un 30%, el de Oct4 un 40% y el del marcador ABCG2 en un 100%, aproximadamente, respecto al control.

Estos resultados, concuerdan con lo esperado ya que en otro artículo donde la IL-1 $\beta$  era capaz de formar neuroesferas y de aumentar el fenotipo de células madre cancerígenas en células de glioblastoma humano (LN-229), también se observó una mayor expresión de Nestina y una disminución en la expresión de CD133. (Wang, *et al.* 2012) Y aunque ya se tenía constancia de que la IL-1 $\beta$  es capaz de promover el crecimiento tumoral y aumentar el fenotipo de las células madre cancerígenas en otras células de glioma (Feng, X., *et al.* 2015), aquí se reporta por primera vez que esta citocina también es capaz de aumentar el fenotipo de células madre en las células U87MG y, concretamente, que lo hace al inducir un aumento de la expresión de los biomarcadores de células madre Oct4, Nestina y ABCG2.

El factor de transcripción Oct4, también conocido como POU5F1, ha sido estudiado y relacionado directamente con la pluripotencia de las células madre cancerígenas. Hay 3 isoformas de este marcador (A, B y B1) pero Oct4 que es el mismo que se usó en este trabajo, ha sido reportado como el factor clave responsable del mantenimiento de la actividad tumorigénica de las GSC, por lo que su sobreexpresión obtenida en las U87MG después del tratamiento con IL-1 $\beta$  confirma su papel en la generación y autorrenovación de las GSC. Además, cabe destacar que Oct4A no se expresa en células neurales normales y es más común detectarlo en niveles altos en glioblastomas recurrentes que en nuevos glioblastomas, por lo que puede funcionar claramente como un indicador del aumento de la agresividad de este tipo de tumor. La sobreexpresión de Oct4, por otra parte, se ha visto que también induce la activación de regiones potenciadoras de otros marcadores de células madre como Sox2, de manera que en conjunto tienen mayor incidencia sobre el mantenimiento de la tumorigénesis y la pluripotencia de las GSC. Es más, en células de glioblastoma resistentes a la radiación gamma y temozolomida se ha observado que la expresión de Oct4 y Sox2 es mayor y que el bloqueo de Oct4, por sí solo, puede aumentar la sensibilidad de las células de glioma a la temozolomida. (Bradshaw, A., *et al.* 2016; Chen, X., *et al.* 2023; Mohiuddin, I.S., Wei, S.J. & Kang, M.H. 2020; Liu, C., *et al.* 2024). No obstante, a pesar de observarse en la imagen del resultado 2 un aumento en la expresión de este último marcador, Sox2, después del

tratamiento con IL-1 $\beta$ , al hacer el análisis estadístico la diferencia no fue significativa lo que puede explicarse con el hecho de que tal vez las células U87MG necesitarían más tiempo con la IL-1 $\beta$  o más concentración de esta para que Oct4 pudiera activar y aumentar la sobreexpresión de Sox2.

El aumento observado en la expresión del marcador de Nestina después del tratamiento con IL-1 $\beta$  también fue el esperado, pues como ya se mencionó anteriormente este tipo de biomarcador está muy asociado con el glioblastoma multiforme y con la población de células madre cancerígenas. Además, el aumento en la expresión de Nestina también se correlaciona con una disminución de la capacidad de supervivencia del paciente, hecho que confirma que la citocina proinflamatoria IL-1 $\beta$  es capaz de aumentar el fenotipo de células madre de glioblastoma y la agresividad de este tumor. (*Bradshaw, A., et al. 2016*)

A diferencia de Nestina y Oct4, el marcador ABCG2 es de superficie celular y es un transportador que se relaciona directamente con la resistencia a los medicamentos de quimioterapia, pues es capaz de expulsarlos del interior de las células. Como las células madre cancerígenas tienen la propiedad de quimiorresistencia, es lógico que este biomarcador esté sobreexpresado en las GSC de las U87MG, pues el tratamiento con IL-1 $\beta$  precisamente provocó un aumento en la población de las GSC y, por lo tanto, un aumento en la expresión de este tipo de marcador. En estudios con otro tipo de líneas celulares, se demostró que la regulación negativa de ABCG2 causaba una disminución de la proliferación de las células GSC y un aumento en la apoptosis, lo que demuestra su gran implicación en la malignidad de este tipo de tumor. (*Chen, L., et al. 2017*) En otros artículos, también se ha reportado que ABCG2 tiene una alta expresión en los macrófagos M2 asociados al glioblastoma (TAM's) y que las células de GBM que expresan el marcador de células madre OCT4 muestran una regulación positiva de ABCG2 que aumenta la resistencia a la doxorubicina, el carboplatino y la VP16. Esto significa, que también hay una correlación positiva y un eje regulador entre Oct4 y ABCG2, del mismo modo que se asocia Oct4 con la sobreexpresión de Sox2. (*Hosokawa, Y., et al. 2015*) En cuanto a la secreción de las citocinas proinflamatorias y otros mediadores de la inflamación, ya se sabía que son capaces de ejercer un efecto profundo sobre la actividad del transportador ABCG2 en varios tipos de cáncer. En células de cáncer de mama MCF-7, por ejemplo, el factor TNF- $\alpha$  y las interleucinas IL-6 e



IL-1 $\beta$  muestran un efecto regulador positivo de ABCG2 o en células de carcinoma gástrico, la IL-1 $\beta$  también aumenta la actividad del marcador, pero en este trabajo se reporta, por primera vez, que la IL-1 $\beta$  induce un aumento en la expresión de ABCG2 en las células de glioblastoma multiforme U87MG. (Kukal, S., et al. 2021)

En definitiva, la citocina proinflamatoria IL-1 $\beta$  administrada de manera exógena induce un aumento en la población de células madre de glioblastoma en las U87MG al sobreexpresar los biomarcadores intracelulares Oct4 y Nestina y el marcador de superficie celular ABCG2, que son factores clave en el mantenimiento de la actividad tumorigenica de las GSC. No obstante, sería necesario investigar la vía de señalización a través de la cuál actúa la IL-1 $\beta$  y qué segundos mensajeros activa para poder inducir este aumento en la expresión de los marcadores y de la población de células madre. Aunque después de analizar la literatura, se encontró que las vías más utilizadas por esta interleucina para aumentar la población de GSC deben ser las vías de señalización de NF- $\kappa$ B, Wnt y PI3K/AKT/mTor. En primer lugar, porque las citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  pueden unirse a su receptor en la membrana celular y activar segundos mensajeros como Akt que a su vez activan la expresión de NF- $\kappa$ B, factor nuclear que promueve la resistencia de las GSC al tratamiento por radiación. En segundo lugar, porque la vía PI3K/AKT/mTor está directamente relacionada con la quiescencia celular y está sobreexpresada en un 90% en el glioblastoma multiforme. Y, finalmente, la señalización Wnt, porque es fundamental para la actividad y el mantenimiento de las propiedades de células madre y también es responsable de la resistencia a la quimioterapia y la radioterapia, así como del crecimiento, la agresividad y el potencial invasivo del GBM. (Vieira de Castro, J., et al. 2020 ; Shen, C.K., et al. 2021 ; Biserova, K., et al. 2021; Khabibov, M., et al. 2022 ; Kai, K., et al. 2022)

En resumen, después de lo analizado en este estudio se puede afirmar que la interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) puede ser un nuevo blanco terapéutico efectivo para reducir la concentración de células madre cancerígenas, o lo que es lo mismo, reducir la agresividad y las tasas de recurrencia del glioblastoma multiforme para, de esta forma, poder mejorar el pronóstico y la calidad de vida del paciente.

## **9. CONCLUSIONES**

- Las células U87MG expresan de manera basal marcadores moleculares relacionados con el fenotipo de célula madre: CD44, CD133, ABCG2, Oct4, Sox2 y Nestina.
- Las células U87MG expresan de manera predominante el ARNm que codifica para Nestina.
- La presencia de IL-1 $\beta$  induce un aumento en la expresión de los marcadores moleculares: Oct4, Nestina y ABCG2 en las células U87MG.
- La vía de señalización activada por IL-1 $\beta$  podría ser considerada como un nuevo blanco farmacológico para reducir la agresividad y posibilidad de recurrencia del glioblastoma.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Alegría-Loyola MA, Galnares-Olalde JA, Mercado M. Tumors of the central nervous system. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2017;55(3):330-340.

Alexander BM, Cloughesy TF. Adult glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology.* 2017;35(21), 2402-2409.

Al-Kharboosh R, ReFaey K, Lara-Velazquez M, Grewal SS, Imitola J, Quiñones-Hinojosa A. Inflammatory Mediators in Glioma Microenvironment Play a Dual Role in Gliomagenesis and Mesenchymal Stem Cell Homing: Implication for Cellular Therapy. *Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes.* 2020;4(4):443-459.

Bady P, Diserens AC., Castella V, Kalt S, Heinimann K, Hamou MF., et al. DNA fingerprinting of glioma cell lines and considerations on similarity measurements. *Neuro-Oncology.* 2012;14(6):701–11.

Bent R, Moll L, Grabbe S, Bros M. Interleukin-1 Beta—A Friend or Foe in Malignancies? *International Journal of Molecular Sciences.* 2018 Jul 24;19(8):2155.

Bien-Möller S, Balz E, Herzog S, et al. Association of Glioblastoma Multiforme Stem Cell Characteristics, Differentiation, and Microglia Marker Genes with Patient Survival. *Stem Cells Int.* 2018; 2018:9628289.

Biserova K, Jakovlevs A, Uljanovs R, Strumfa I. Cancer Stem Cells: Significance in Origin, Pathogenesis and Treatment of Glioblastoma. *Cells.* 2021 Mar 11;10(3):621.

Bradshaw A, Wickremsekera A, Tan ST, Peng L, Davis PF, Itinteang T. Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme. *Front Surg.* 2016; 3:21.

Chaudhary R, Morris RJ, Steinson E. The multifactorial roles of microglia and macrophages in the maintenance and progression of glioblastoma. *J Neuroimmunol.* 2021; 357:577633.

Chen L, Shi L, Wang W, Zhou Y. ABCG2 downregulation in glioma stem cells enhances the therapeutic efficacy of demethoxycurcumin. *Oncotarget.* 2017;8(26):43237-43247.

Chen X, Niu W, Fan X, et al. Oct4A palmitoylation modulates tumorigenicity and stemness in human glioblastoma cells. *Neuro Oncol.* 2023;25(1):82-96.

Chen Z, Giotti B, Milota Kaluzova, Puigdelloses M, Rawat K, Price G, et al. A paracrine circuit of IL-1 $\beta$ /IL-1RI between myeloid and tumor cells drives genotype-dependent glioblastoma progression. *The Journal of clinical investigation.* 2023 Nov 15;133(22).

Dimov I, Tasic-Dimov D, Conic I, Stefanovic V. Glioblastoma Multiforme Stem Cells. *The Scientific World JOURNAL.* 2011; 11:930–58.

Fang Z, Jiang J, Zheng X. Interleukin-1 receptor antagonist: An alternative therapy for cancer treatment. *Life Sci.* 2023; 335:122276.

Fathima Hurmath K, Ramaswamy P, Nandakumar DN. IL-1 $\beta$  microenvironment promotes proliferation, migration, and invasion of human glioma cells. *Cell Biology International.* 2014 Jul 31;38(12):1415–22.

Feng X, Szulzewsky F, Yerevanian A, Chen Z, Heinzmann D, Rasmussen RD, et al. Loss of CX3CR1 increases accumulation of inflammatory monocytes and promotes gliomagenesis. *Oncotarget.* 2015 Mar 30;6(17).

Gholamzad A, Khakpour N, Khosroshahi EM, et al. Cancer stem cells: The important role of CD markers, Signaling pathways, and MicroRNAs. *Pathol Res Pract*. 2024; 256:155227.

González TF., et al. Glioblastoma multiforme: actualidad en marcadores biomoleculares como factores de pronóstico a propósito de una serie de casos con sobrevida mayor a 2 años en el Instituto Nacional de Cancerología. INC Colombia. *Acta Neurológica Colombiana*, 30(4), 282-289.

Grochans S, Cybulska AM, Simińska D, Korbecki J, Kojder K, Chlubek D, et al. Epidemiology of Glioblastoma Multiforme—Literature Review. *Cancers*. 2022 May 13;14(10):2412.

He J, Liu Y, Lubman DM. Targeting glioblastoma stem cells: cell surface markers. *Current Medicinal Chemistry*. 2012. 19(35):6050–5.

Hide T, Komohara Y, Miyasato Y, et al. Oligodendrocyte Progenitor Cells and Macrophages/Microglia Produce Glioma Stem Cell Niches at the Tumor Border. *EBioMedicine*. 2018; 30:94-104

Hosokawa Y, Takahashi H, Inoue A, et al. Oct-3/4 modulates the drug-resistant phenotype of glioblastoma cells through expression of ATP binding cassette transporter G2. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1850(6):1197-1205.

Hübner M, Effinger D, Wu T, et al. The IL-1 Antagonist Anakinra Attenuates Glioblastoma Aggressiveness by Dampening Tumor-Associated Inflammation. *Cancers (Basel)*. 2020;12(2):433

International Agency for Research on Cancer (IARC), World Health Organization. Brain, central nervous system. *Cancer Today*.

Kai K, Komohara Y, Esumi S, et al. Macrophage/microglia-derived IL-1 $\beta$  induces glioblastoma growth via the STAT3/NF- $\kappa$ B pathway. *Hum Cell*. 2022;35(1):226-237

Khabibov M, Garifullin A, Boumber Y, Khaddour K, Fernandez M, Khamitov F, Khalikova L, Kuznetsova N, Kit O, Kharin L. Signaling pathways and therapeutic approaches in glioblastoma multiforme (Review). *Int J Oncol*. 2022 Jun;60(6):69.

Kore RA, Abraham EC. Inflammatory cytokines, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha, upregulated in glioblastoma multiforme, raise the levels of CRYAB in exosomes secreted by U373 glioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014 Oct;453(3):326–31.

Kukul S, Guin D, Rawat C, et al. Multidrug efflux transporter ABCG2: expression and regulation. *Cell Mol Life Sci*. 2021;78(21-22):6887-6939.

Kumari S, Gupta R, Ambasta RK, Kumar P. Multiple therapeutic approaches of glioblastoma multiforme: From terminal to therapy. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2023;1878(4):188913.

Kuo YC, Kou HW, Hsu CP, Lo CH, Hwang TL. Identification and Clinical Significance of Pancreatic Cancer Stem Cells and Their Chemotherapeutic Drug Resistance. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(8):7331.

Lah TT, Novak M, Breznik B. Brain malignancies: Glioblastoma and brain metastases. *Seminars in Cancer Biology [Internet]*. 2020 Feb 1; 60:262–73.

Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CLL, Rich JN. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes & Development [Internet]*. 2015 Jun 15;29(12):1203–17.

- Lee SY, Kim JK, Jeon HY, Ham SW, Kim H. CD133 Regulates IL-1 $\beta$  Signaling and Neutrophil Recruitment in Glioblastoma. *Mol Cells*. 2017;40(7):515-522.
- Lee SY, Kim JK, Jeon HY, Ham SW, Kim H. CD133 Regulates IL-1 $\beta$  Signaling and Neutrophil Recruitment in Glioblastoma. *Mol Cells*. 2017;40(7):515-522.
- Liu C, Yang T, Cheng C, Huo J, Peng X, Zhang Y. Dauricine attenuates Oct4/sonic hedgehog co-activated stemness and induces reactive oxygen species-mediated mitochondrial apoptosis via AKT/ $\beta$ -catenin signaling in human neuroblastoma and glioblastoma stem-like cells. *Phytother Res*. 2024;38(1):131-146.
- Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews [Internet]*. 2011 Aug;22(4):189–95.
- Ludwig K, Kornblum HI. Molecular markers in glioma. *J Neurooncol*. 2017;134(3):505-512.
- Mohan A, Raj Rajan R, Mohan G, Kollenchery Puthenveetil P, Maliekal TT. Markers and Reporters to Reveal the Hierarchy in Heterogeneous Cancer Stem Cells. *Front Cell Dev Biol*. 2021; 9:668851.
- Mohiuddin IS, Wei SJ, Kang MH. Role of OCT4 in cancer stem-like cells and chemotherapy resistance. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020;1866(4):165432.
- Mullins CS, Schneider B, Stockhammer F, Krohn M, Classen CF, Linnebacher M. Establishment and Characterization of Primary Glioblastoma Cell Lines from Fresh and Frozen Material: A Detailed Comparison. Castro MG, editor. *PLoS ONE*. 2013 Aug 7;8(8):e71070.
- Ohba S, Mukherjee J, See WL, Pieper RO. Mutant IDH1-Driven Cellular Transformation Increases RAD51-Mediated Homologous Recombination and Temozolomide Resistance. *Cancer Research [Internet]*. 2014. 74(17):4836–44.
- Pretre V, Papadopoulos D, Regard J, Pelletier M, Woo J. Interleukin-1 (IL-1) and the inflammasome in cancer. *Cytokine*. 2022 May 1; 153:155850.
- Rodríguez MPT, Garcia KAM, Cruz A del PI, Baquero CAC. Inmunopatología del Glioblastoma Multiforme y su importancia en el ámbito clínico. *Revista Ciencias Biomédicas*. 2022 Apr 15;11(2):163–78.
- Rodriguez SMB, Staicu GA, Sevastre AS, Baloi C, Ciubotaru V, Dricu A, et al. Glioblastoma Stem Cells—Useful Tools in the Battle against Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022 Apr 21;23(9):4602.
- Sharma V, Dixit D, Ghosh S, Sen E. COX-2 regulates the proliferation of glioma stem like cells. *Neurochem Int*. 2011;59(5):567-571.
- Sharma V, Dixit D, Koul N, Mehta VS, Sen E. Ras regulates interleukin-1 $\beta$ -induced HIF-1 $\alpha$  transcriptional activity in glioblastoma. *J Mol Med (Berl)*. 2011;89(2):123-136.
- Shen CK, Huang BR, Yeh WL, Chen CW, Liu YS, Lai SW, et al. Regulatory effects of IL-1 $\beta$  in the interaction of GBM and tumor-associated monocyte through VCAM-1 and ICAM-1. *European Journal of Pharmacology* 2021 Aug 15; 905:174216.
- Sinning M. Clasificación de los tumores cerebrales. *Revista Médica Clínica Las Condes [Internet]*. 2017 May;28(3):339–42.

- Skvortsova I. *Cancer Stem Cells: What Do We Know about Them?* *Cells*. 2021 Jun 17;10(6):1528.
- Sun W, Depping R, Jelkmann W. *Interleukin-1 $\beta$  promotes hypoxia-induced apoptosis of glioblastoma cells by inhibiting hypoxia-inducible factor-1 mediated adrenomedullin production.* *Cell Death & Disease*. 2014 Jan;5(1):e1020.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.* *CA: a Cancer Journal for Clinicians*. 2021 Feb 4;71(3):209–49.
- Tan AC, Ashley DM, López GY, Malinzak M, Friedman HS, Khasraw M. *Management of glioblastoma: State of the art and future directions.* *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2020 Jun;70(4):299–312.
- Tarassishin L, Casper D, Lee SC. *Aberrant expression of interleukin-1 $\beta$  and inflammasome activation in human malignant gliomas.* *PLoS One*. 2014;9(7):e103432.
- Reaction Biology. *U-87 MG: Subcutaneous glioblastoma cancer tumor model. In vivo pharmacology.* *European Union, USA; June-2022.* Available from: [www.reactionbiology.com](http://www.reactionbiology.com).
- Vieira de Castro J, Gonçalves CS, Hormigo A, Costa BM. *Exploiting the Complexities of Glioblastoma Stem Cells: Insights for Cancer Initiation and Therapeutic Targeting.* *Int J Mol Sci*. 2020;21(15):5278.
- Walcher L, Kistenmacher AK, Suo H, Kitte R, Dluczek S, Strauß A, et al. *Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies.* *Frontiers in Immunology*. 2020 Aug 7;11(1280).
- Wang L, Liu Z, Balivada S, et al. *Interleukin-1 $\beta$  and transforming growth factor- $\beta$  cooperate to induce neurosphere formation and increase tumorigenicity of adherent LN-229 glioma cells.* *Stem Cell Res Ther*. 2012; 3(1):5.
- Wang Q, Wu H, Hu J, et al. *Nestin Is Required for Spindle Assembly and Cell-Cycle Progression in Glioblastoma Cells.* *Mol Cancer Res*. 2021;19(10):1651-1665.
- Witthayanuwat S, Pese M, Supaadirek C, Supakalin N, Thamronganantasakul K, Krusun S. *Survival Analysis of Glioblastoma Multiforme.* *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018;19(9):2613-2617.
- Yi G, Liu Y, Xiang W, Wang H, Chen Z, Xie S, et al. *Akt and  $\beta$ -catenin contribute to TMZ resistance and EMT of MGMT negative malignant glioma cell line.* *Journal of the Neurological Sciences*. 2016 Aug 1; 367:101–6.
- Yuan Y, Zhang M, Yan G, et al. *Nanog promotes stem-like traits of glioblastoma cells.* *Front Biosci*. 2021; 26(3):552-565.
- Zhu X, Fang Y, Chen Y, et al. *Interaction of tumor-associated microglia/macrophages and cancer stem cells in glioma.* *Life Sci*. 2023; 320:121558.