



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EFFECTO DE LA TOXINA PERTUSSIS SOBRE LOS MACRÓFAGOS
INFILTRANTES DE TUMOR Y CÉLULAS SUPRESORAS MIELOIDES EN EL
MODELO DE GLIOMA RG2**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. ROXANA MAGAÑA MALDONADO

TUTOR PRINCIPAL:

DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. VICTORIA CHAGOYA DE SÁNCHEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DR. JULIO MORÁN ANDRADE
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MÉXICO, D. F. Marzo, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado como parte del Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Karen Manoutcharian Airapetian del Instituto de Investigaciones Biomédicas en colaboración con el Dr. Benjamín Pineda Olvera del Departamento de Neuro-inmunología y Neuro-oncología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suarez". Esta tesis fue financiada por los proyectos CONACyT CB180851, CONACyT 166600 y FOSSIS 182362.

El alumno fue becario del Programa, por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

COLABORADORES

Dr. Benjamín Pineda Olvera

Dr. Julio Sotelo Morales

Dra. Verónica Pérez de la Cruz

Dr. Jesús Taboada Barajas

Dr. Oscar René Marrufo Meléndez

Dr. Sergio Moreno Jiménez

M. en C. José Manuel Lárraga Gutiérrez

Dra. Laura Sánchez Chapul

M. en C. César Augusto Rodríguez Balderas

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suarez"

AGRADECIMIENTOS

A mi familia mi más sincero agradecimiento por todo su apoyo y amor incondicional. Mis abuelitos y mi mamá han sido un pilar fundamental en mi preparación, estoy infinitamente agradecida.

A CONACyT por el apoyo brindado para la realización de mis estudios de doctorado así como la asignación de la beca mixta para realizar una estancia de investigación.

A la UNAM por brindarme la oportunidad de prepararme para ser mejor profesionista. Me siento muy orgullosa de formar parte de esta Universidad.

A la Coordinación de Posgrado en Ciencias Bioquímicas, especialmente a Norma, Lety, Adelina y el Dr. Roberto Coria por su asesoría, excelente calidad humana y apoyo brindado en todo momento.

Al Dr. Karen Manoutcharian por la oportunidad de integrarme en su laboratorio, permitirme desarrollar el presente proyecto de investigación, así como por su orientación y apoyo.

Al Dr. Benjamín Pineda Olvera quien a pesar de no ser tutor de esta tesis, contribuyó durante mi preparación en todo momento, gran parte de mi formación científica ha sido gracias a su asesoría y consejos. Estoy muy agradecida por todo su apoyo, por compartirme sus conocimientos y transmitirme el gusto por la investigación, por considerarme parte de su equipo de trabajo y más aún por su amistad y confianza brindada.

Al Dr. Julio Sotelo por compartir sus conocimientos, amplia visión científica y consejos. Le agradezco mucho la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo.

Al Dr. José de Jesús García Soto(†) y Dr. Mario Pedraza Reyes quienes me motivaron, asesoraron y apoyaron durante mi formación profesional en mi querida Alma máter la Universidad de Guanajuato, proporcionándome las bases para continuar mi preparación científica.

A los miembros del Comité Tutor Dra. Victoria Chagoya de Sánchez y Dr. Julio Morán Andrade por las valiosas aportaciones para mejorar la presente investigación.

Al Dr. Alfredo Quiñones Hinojosa (Universidad Johns Hopkins. Baltimore, Maryland USA) le agradezco la oportunidad de realizar mi estancia de investigación en su laboratorio.

A todos los integrantes del Laboratorio de Neuro-inmunología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, los integrantes del Laboratorio del Dr. Karen Manoutcharian en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM) y los integrantes del Laboratorio de Células Madre de Glioma del Dr. Alfredo Quiñones Hinojosa (Universidad Johns Hopkins), les agradezco todos los gratos momentos compartidos.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), la beca mixta de CONACyT, así como al Dr. Alfredo Quiñones Hinojosa les agradezco su apoyo y contribución para la realización de mi estancia de investigación. A la Dra. Verónica Pérez de la Cruz y el Dr. Benjamín Pineda Olvera, les agradezco los recursos proporcionados para concluir esta tesis.

A la Unidad de Radioneurocirugía (Dr. Sergio Moreno Jiménez, M, en C. José Manuel Lárraga Gutiérrez); Unidad de Neuro-Imagen (Dr. Jesús Taboada Barajas, Dr. Oscar René Marrufo Meléndez); Bioterio (M. en C. César Augusto Rodríguez Balderas); Dra. Laura Sánchez Chapul; Biol. Norma Hernández Pedro, les agradezco su apoyo en el desarrollo de algunas determinaciones experimentales.

A mis compañeros y amigos Georgina, Maribel, Alelí, Norma, Edgar les agradezco todos los momentos compartidos.

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1.1.- Gliomas: Origen, Características y Clasificación.....	3
1.2.-Terapia actual.....	4
1.3.-Respuesta inmune contra tumor e inmunosupresión	5
1.4.-Nuevas estrategias terapéuticas	9
JUSTIFICACIÓN.....	13
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVO GENERAL.....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
METODOLOGÍA	14
Reactivos	14
Cultivo celular.....	15
1.- Ensayos <i>in vitro</i>	15
1.1.- Detección de apoptosis (Anexina V/7AAD) por citometría de flujo	16
1.2.- Detección de ciclo celular (yoduro de propidio) por citometría de flujo	16
1.3.- Detección de LC3 y beclina-1, mediante inmunofluorescencia	17
1.4.- Detección de LC3 y beclina-1, mediante Western blot.....	17
1.5.- Detección de vesículas autofágicas (naranja de acridina) por citometría de flujo.....	18
2.- Ensayos <i>in vivo</i>	18
2.1.- Modelo Ortotópico de Glioma.....	19
2.2.- Tratamiento con toxina pertussis y temozolamida	19
2.3.- Tratamiento con toxina pertussis y vacunación con células RG2 irradiadas.....	20

2.4.- Cuantificación de las distintas subpoblaciones celulares presentes en el tumor, sangre y bazo.....	20
2.5.- Determinación de sobrevida	21
Análisis estadístico	21
RESULTADOS.....	22
Viabilidad celular e inducción de apoptosis en la línea celular de glioma RG2.....	22
Efecto de PTx, TMZ y PTx+TMZ en el ciclo celular	24
Inducción de autofagia en las células de glioma RG2 tratadas con PTx, TMZ y PTx+TMZ	25
Desarrollo de organelos vesiculares acídicos (AVO's) en células de glioma RG2 tratadas con PTx, TMZ y PTx+TMZ	27
Cambios morfológicos e inducción de autofagia en células de glioma RG2	29
Sobrevida de las ratas implantadas con células de glioma RG2 y sometidas a los tratamientos con PTx, TMZ y PTx+TMZ	33
Sobrevida de las ratas implantadas con células de glioma RG2 y sometidas a los tratamientos con PTx, vacunación y PTx+vacunación	35
Monitoreo del Crecimiento Tumoral.....	37
Cuantificación de las distintas subpoblaciones celulares presentes en sangre	38
Cuantificación de las distintas subpoblaciones celulares presentes en bazo.....	40
Cuantificación de las distintas subpoblaciones celulares presentes en tumor	42
DISCUSIÓN.....	44
CONCLUSIONES	48
PERSPECTIVAS	49
PRODUCTIVIDAD	50
REFERENCIAS	53

RESUMEN

El glioblastoma (GBM) es el tumor cerebral primario más frecuente, tiene mal pronóstico y es refractario al tratamiento actual. Recientemente, reportamos el uso de la toxina pertussis (PTx) como adyuvante inmunoterapéutico en un modelo de glioma C6; mostrando disminución en el tamaño tumoral, apoptosis en los linfocitos T reguladores (Tregs) y disminución en los macrófagos infiltrantes de tumor. En el presente trabajo, evaluamos en el modelo de glioma RG2, el efecto citotóxico de PTx en combinación con temozolamida (TMZ), así como vacunación con células de glioma irradiadas (VAC) tanto *in vitro* como *in vivo*. Se determinó viabilidad celular, ciclo celular, apoptosis y autofagia mediante citometría de flujo, inmunofluorescencia, y Western blot. Posterior al implante intracraneal con células RG2, los animales fueron divididos en grupos de 7 ratas por tratamiento: Control, TMZ, PTx, TMZ+PTx, VAC y PTx+VAC. La determinación de apoptosis mostró incremento de 20% en las células RG2 tratadas con PTx, TMZ y PTx+TMZ. Se determinó la presencia de vesículas autofágicas, y no se observaron cambios en el ciclo celular en los grupos tratados con TMZ+PTx. El análisis de supervivencia mostró un incremento en la sobrevida de las ratas sometidas a los tratamientos individuales, mientras que este efecto se incrementó en el grupo tratado con TMZ+PTx; sin embargo, el tratamiento PTx+VAC no mostró incremento en la sobrevida. Los resultados correlacionan con las imágenes obtenidas por resonancia magnética, observando una disminución en el volumen tumoral de los grupos tratados con PTx y VAC. Se evaluaron las subpoblaciones de linfocitos T, macrófagos, células MDSC y células NK en sangre, bazo y tumor. En tumor se observa una disminución en los linfocitos Tregs con los tratamientos PTx y PTx+VAC, así como disminución en las células MDSC con PTx, VAC y PTx+VAC; además, PTx incrementó los linfocito T CD8+ y las células NK. Este trabajo demuestra que el uso concomitante de la PTx con TMZ puede representar una ventaja para mejorar el tratamiento del GBM. Sugiriendo que la PTx podría ser un adyuvante inmunoterapéutico en la terapia integral para GBM, debido a sus múltiples propiedades, tanto directamente en las células de GBM así como modulando subpoblaciones inmunológicas.

ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is the most frequent primary brain tumor, it has poor prognosis, and it remains refractory to current treatment. Recently, we report the use of pertussis toxin (PTx) as adjuvant immunotherapy in a C6 glioma model; showing a decrease in tumoral size, it induced selective cell death in regulatory T cells (Tregs), and it elicited less infiltration of tumoral macrophages. Here, we evaluated the cytotoxic effect of PTx in combination with temozolomide (TMZ) as well as vaccination with irradiated glioma cells (VAC) for glioma treatment, both *in vitro* and *in vivo* RG2 glioma model. We determined cell viability, cell cycle, apoptosis, and autophagy on treated RG2 cells through flow cytometry, immunofluorescence, and Western blot assays. After intracranial implantation of RG2 cells, animals were divided in 7 rats for each group and treated with TMZ, PTx, TMZ+PTx, VAC and PTx+VAC. Animals without treatment were considered as control. We found an induction of apoptosis in around 20 % of RG2 cells, in both single treatments PTx, TMZ and their combination. Also, we determined the presence of autophagy vesicles, without any modifications in the cell cycle in the TMZ+PTx-treated groups. The survival analyses showed an increase due to individual treatments; besides, in the group treated with the combination TMZ+PTx, this effect was enhanced, while in the group treated with PTx+Vac did not improve the survival, these results correlated with the images obtained by magnetic resonance, observing a decrease in tumor volume in PTx and VAC groups. Tumor, blood and spleen were taken for analysis of subpopulations of T cells, macrophages, MDSC, NK cells. In tumor, we observed a significant decrease in the number of Tregs cells in the treatment with PTx and PTx+Vac, while MDSC are decreased in PTx, VAC y PTx+VAC. Besides, the treatment with PTx increased CD8+ T cells and NK in tumor. We show that the concomitant use of PTx plus TMZ could represent an advantage to improve the GBM treatment. Suggesting that PTx could be an immunotherapeutic adjuvant in the integral therapy against GBM due their multiple properties either directly in glioma cells and also modulating immunological subpopulations.

INTRODUCCIÓN

1.1.- Gliomas: Origen, Características y Clasificación

Los gliomas son los tumores cerebrales primarios más frecuentes en adultos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) los clasifica como astrocitomas, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas, debido a que presentan similitudes histológicas con las células de la glía, incluyendo astrocitos y oligodendrocitos. Con base en su comportamiento biológico y grado de malignidad se dividen en 4 grados (I a IV), siendo el glioblastoma (GBM) el de mayor malignidad (Louis, Ohgaki et al. 2007, Siegel, Naishadham et al. 2013).

El GBM se caracteriza por tener gran heterogeneidad celular, ser altamente invasivo y con capacidad de infiltrar el tejido cerebral sano. En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México, el GBM representa el 9% de todos los tumores cerebrales y el 45.7% de gliomas primarios (Lopez-Gonzalez and Sotelo 2000, Velasquez-Perez and Jimenez-Marcial 2003).

El GBM puede surgir *de novo* (GBM primario) ó evolucionar a partir de un astrocitoma de bajo grado (GBM secundario); su desarrollo es a través de la alteración en diversas vías moleculares, constituyendo diferentes subtipos de la enfermedad. La mayoría de los casos son GBM primarios (>90%), los cuales afectan principalmente adultos mayores (55 años) y se desarrollan rápidamente sin ninguna evidencia previa clínica ó histológica de una lesión de menor grado de malignidad. Estos tumores se caracterizan por pérdida de heterocigosidad del cromosoma 10q (70% de los casos), amplificación de EGFR (Receptor del factor de crecimiento epidermal, por sus siglas en inglés) (36%), delección en p16_{INK4a} (31%) y mutaciones en PTEN (Gen homólogo de fosfatasa y tensina, por sus siglas en inglés) (25%) (Watanabe, Tachibana et al. 1996, Biernat, Tohma et al. 1997, Tohma, Gratas et al. 1998, Ohgaki and Kleihues 2007). El GBM secundario se manifiesta en adultos jóvenes (<45 años), las alteraciones genéticas más frecuentes son mutaciones en p53 (60% de los astrocitomas de bajo grado) y sobreexpresión de PDGFRA (Receptor α del factor de

crecimiento derivado de plaquetas, por sus siglas en inglés) (Hermanson, Funa et al. 1996, DeAngelis 2001). Durante la progresión a GBM se acumulan mutaciones adicionales y existen diferentes patrones de metilación entre ambos subtipos (Ohgaki and Kleihues 2007).

Recientemente, se ha establecido una subclasificación molecular del GBM, con base en sus perfiles de expresión de genes, denominándolos: proneural (PN), neural (NL), clásico (CL) y mesenquimal (MES) (Verhaak, Hoadley et al. 2010); los subtipos PN, MES y CL se han asociado con alteraciones en PDGFRA/IDH1 (Isocitrato deshidrogenasa 1), NF1 (Neurofibromatosis 1) y EGFR, respectivamente. El subgrupo proneural ha sido subdividido con base en el fenotipo metilador de las islas CpG (G-CIMP, por sus siglas en inglés) asociado con IDH1 mutado con respecto a IDH1 silvestre (Turcan, Rohle et al. 2012). Los gliomas con subtipo proneural correlacionan con un mayor sobrevida, mientras que los gliomas con expresión mesenquimal (subtipo MES) usualmente tienen pobre pronóstico (1 año para el subtipo proneural en comparación con 6 meses para el subtipo mesenquimal) (Vitucci, Hayes et al. 2011). Aunque los gliomas con características proliferativas ó mesenquimales tienen peor pronóstico, diversos estudios han confirmado que estos subtipos son más sensibles a la combinación de radioterapia y quimioterapia (Gravendeel, Kouwenhoven et al. 2009, Verhaak, Hoadley et al. 2010).

1.2.-Terapia actual

A pesar de la terapia multimodal actual, el pronóstico sigue siendo desfavorable y la sobrevida media es alrededor de 14.6 meses (Buckner 2003). El tratamiento convencional consiste en cirugía, radiación y quimioterapia (Stupp, Mason et al. 2005, Stupp, Hegi et al. 2007, Ryu, Yoon et al. 2012).

La cirugía es el tratamiento inicial para eliminar la mayor cantidad posible de tumor y confirmar patológicamente el diagnóstico; sin embargo, el GBM no es curable a través de resección quirúrgica, debido a su naturaleza invasiva. El tratamiento se combina con radioterapia y quimioterapia, presentando una moderada respuesta, daño colateral en el tejido cerebral sano y alta toxicidad.

El quimioterapéutico de primera elección es el agente alquilante, temozolamida (TMZ), un derivado de la imidazotetrazina. La TMZ es un profármaco, capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, a pH fisiológico se hidroliza rápidamente en su metabolito activo monometil triazenoimidazol carboxamida (MTIC), posteriormente éste se degrada al ion metildiazonio, que es el componente activo, transfiriendo el grupo metilo al ADN. La TMZ ejerce su acción citotóxica a través de la metilación del ADN en las posiciones O(6) y N(7) de la guanina, y la posición O(3) de la adenina (O'Reilly, Newlands et al. 1993). Esta metilación resulta en un mal apareamiento de bases, incorporándose una timina en lugar de una citocina, el error es reconocido por el sistema de reparación de bases mal apareadas (MMR, por sus siglas en inglés); debido a que la metilación persiste, se desarrolla una reparación aberrante, induciendo la muerte celular. El éxito del tratamiento con TMZ es limitado debido a que los gliomas presentan quimio-resistencia (Carmo, Carvalheiro et al. 2011). Las células tumorales pueden remover los aductos de metilo, por acción de la enzima de reparación MGMT (O-6- metilguanina-DNA-metiltransferasa, por sus siglas en inglés) (Hotta, Saito et al. 1994, Gerson 2004, Omar and Mason 2010). El tratamiento con TMZ presenta una modesta respuesta, incrementando la sobrevida sólo 2.5 meses, y no presentan beneficios en pacientes con sobreexpresión del gen MGMT.

Debido a la carencia de un tratamiento eficaz, en diversas disciplinas, entre ellas la inmunología, se están desarrollando nuevas estrategias para mejorar la terapéutica actual en el GBM.

1.3.-Respuesta inmune contra tumor e inmunosupresión

El sistema inmunológico está implicado en la eliminación de células tumorales en un proceso denominado vigilancia inmunológica (Vesely, Kershaw et al. 2011). La presencia de infiltrado de linfocitos T se describe inicialmente en modelos tumorales en rata inducidos con metil nitrosourea, y en muestras de gliomas humanos (Stavrou, Anzil et al. 1977). El Sistema Nervioso Central (SNC) tiene un bajo nivel de infiltrado de linfocitos T; sin embargo, en estados patológicos, la barrera hematoencefálica actúa de manera parcial permitiendo el tráfico linfocitario (Louis, Ohgaki et al. 2007). Se han descrito diversas células del sistema inmune que infiltran los tumores

cerebrales, tales como linfocitos T CD4+, CD8+, células dendríticas, macrófagos, microglía, células NK (Morimura, Neuchrist et al. 1990, Kiefer, Supler et al. 1994, Watters, Schartner et al. 2005, Louis, Ohgaki et al. 2007).

Los linfocitos T CD8+, también denominados linfocitos T citotóxicos (CTL), tienen un papel importante en la lisis de las células cancerosas (Kroemer, Galluzzi et al. 2013). Estos linfocitos pueden reconocer péptidos antigénicos a través de receptores específicos de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés), los cuales son presentados por moléculas HLA de clase I en la superficie de las células cancerosas (Fooksman, Vardhana et al. 2010). La interacción del TCR con el antígeno tumoral presentado, y la presencia de moléculas co-estimuladoras como B7-1/2, inducirá la liberación de granzimas y perforinas, induciendo apoptosis, además de la liberación de otras citocinas como interferón- γ y el factor de necrosis tumoral α/β (TNF- α/β). La respuesta de CTL es amplificada por interacción con otras células del sistema inmune, como las células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés). Las APC procesan los péptidos y proteínas asociadas al tumor, presentándolos a los linfocitos T mediante las moléculas del HLA clase I y II. La proliferación de los linfocitos T citotóxicos, también es inducida por los linfocitos T CD4+, secretando citocinas como IL-2 y IFN- γ , potenciando su efecto antitumoral (Guermontprez, Valladeau et al. 2002).

Teóricamente, la eliminación tumoral pudiera ser lograda por inmunización con antígenos asociados al tumor. Sin embargo, la inmunoterapia activa en cáncer ha mostrado solo mínima efectividad. Un obstáculo en el éxito del tratamiento para GBM, es su microambiente tumoral altamente inmunosupresivo. Se ha observado la presencia de células infiltrantes que promueven el crecimiento tumoral, tales como macrófagos fenotipo M2, linfocitos T reguladores (Tregs) y células supresoras derivadas mieloides (MDSC) (Bhondeley, Mehra et al. 1988, Prins, Scott et al. 2002, Watters, Schartner et al. 2005, Curtin, Candolfi et al. 2008, Sonabend, Rolle et al. 2008).

El microambiente tumoral del GBM está constituido por múltiples tipos celulares, entre ellos células del parénquima asociadas al tumor (células vasculares, microglía, células inmunes periféricas y células precursoras neurales), existen diversas interacciones entre ellas, lo que favorece el crecimiento tumoral (Charles, Holland et al. 2012). Las células de glioma secretan factores inmuno-moduladores como interleucina-6 (IL-6) y factor estimulante de colonias 1 (CSF-1), que inducen una respuesta Th2 (Weber, Sabel et al. 1996, Bigner, Matthews et al. 1999, Jenkins, Blair et al. 2006). Existe además, un microambiente hipóxico debido a la inapropiada neovascularización, flujo sanguíneo irregular y alto consumo de oxígeno de las células malignas con alta tasa de proliferación (Jensen 2009); esto promueve la expresión de genes involucrados en proliferación y angiogénesis (Carmeliet, Dor et al. 1998). La hipoxia tumoral puede activar la vía inmunosupresiva de STAT3, así como proteínas que forman parte de la vía de señalización, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor inducible de hipoxia 1 (HIF1- α), este último puede incrementar el número y las propiedades supresivas de las células Tregs (Gray, Zhang et al. 2005, Jung, Lee et al. 2005, Griffin, Burger et al. 2006, Ben-Shoshan, Maysel-Auslender et al. 2008).

Los linfocitos Tregs (CD4⁺ CD25⁺FoxP3⁺), son linfocitos T (CD4⁺) que expresan la subunidad α del receptor de IL-2 (CD25⁺) y actúan como inmunosupresores celulares (DeAngelis 2001, Riemenschneider and Reifenberger 2009). Se ha demostrado que los linfocitos Tregs infiltrantes de tumor, contribuyen a la patogénesis y progresión tumoral, siendo necesaria su eliminación para alcanzar una efectiva respuesta inmune (García-Lora, Algarra et al. 2003). En el microambiente tumoral los linfocitos Tregs pueden ejercer su acción supresora sobre los linfocitos T CD4⁺ ó CD8⁺ mediante diversos mecanismos: ya sea a través de su interacción con las células dendríticas (DCs) para inducir un fenotipo inmunosupresivo evitando la activación de los linfocitos T CD4⁺ ó CD8⁺; por otro lado, producen IL-10 y TGF- β que actúan directamente sobre los linfocitos T efectores disminuyendo su acción citotóxica; y pueden interactuar directamente con los linfocitos T efectores para inducir anergia (Ostrom, Gittleman et al. 2013). Además, se ha descrito que su disminución,

incrementa la supervivencia en modelos experimentales de ratones con tumores cerebrales (DeAngelis 2001, Ostrom, Gittleman et al. 2013).

Los macrófagos (CD68+) han sido asociados con tumores de alto grado y baja tasa de supervivencia en pacientes con tumores cerebrales (Strojnjk, Kavalar et al. 2009). La infiltración tumoral por macrófagos está generalmente asociada con neoangiogénesis y consecuencias negativas ya que éstos liberan sustancias tales como las metaloproteasas membranales de tipo I (MT1-MMP), enzimas que actúan rompiendo las uniones intercelulares y permitiendo la invasión de las células de glioma en el parénquima cerebral. Estas enzimas se sobreexpresan por estimulación con sustancias liberadas por las células del glioma vía estimulación de receptores tipo Toll (TLR's) (Markovic, Vinnakota et al. 2009, Siveen and Kuttan 2009).

Las células MDSC forman parte del microambiente tumoral y tienen efectos inmunosupresores (Nigro, Baker et al. 1989, Li, Yen et al. 1997). Se ha observado que la inmunización con antígenos tumorales induce su expansión en médula ósea, inhibiendo la respuesta inmune y facilitando el crecimiento tumoral y la metástasis (Talmadge 2007, Jia, Jackson-Cook et al. 2010). Estas células son fenotípicamente dobles positivas para marcadores de granulocito y monocito (Gr1/CD11b) en ratón ó (Gr1/CD11b) en ratón. Las células MDSC humanas también han sido descritas en otras neoplasias tales como melanoma y carcinoma de células renales (Zea, Rodriguez et al. 2005, Filipazzi, Valenti et al. 2007, Ko, Zea et al. 2009). Existen múltiples mecanismos por los cuales las células MDSC ejercen efectos reguladores sobre los linfocitos T, algunos de los cuales incluyen el catabolismo de aminoácidos esenciales como triptófano ó arginina por la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) ó arginasa I, respectivamente; la producción de óxido nítrico ó citocinas inmunosupresoras como TGF- β (Mazzoni, Bronte et al. 2002, Munn and Mellor 2004, Rodriguez and Ochoa 2008, Xiang, Poliakov et al. 2009). En ratas inmunizadas con células tumorales de glioma, se observó un incremento en las distintas subpoblaciones de células infiltrantes de tumor, entre ellas las MDSC; estas células generaron una disminución en los linfocitos T, a través de la producción de óxido nítrico, induciendo apoptosis (Jia, Jackson-Cook et al. 2010).

1.4.-Nuevas estrategias terapéuticas

En el campo de la inmunología se están desarrollando diversas estrategias para mejorar el tratamiento actual. La inmunoterapia representa una alternativa atractiva debido a que es capaz de inducir una respuesta inmune segura y eficaz, con menos efectos adversos y mayor selectividad. El principio básico de los enfoques inmunoterapéuticos en cáncer es inducir una respuesta inmune celular específica de tumor que provoque la eliminación selectiva de células cancerosas. Se ha demostrado que la vacunación con antígenos tumorales incrementa la respuesta inmune (Mahaley, Bigner et al. 1983, Sampson, Archer et al. 1996, Iwadate, Yamaura et al. 2003, Reardon, Wucherpfennig et al. 2013).

Por otra parte, existe gran interés por identificar nuevos agentes terapéuticos para ser utilizados como adyuvantes solos ó en combinación con la quimioterapia actual. Así como disminuir la inmunosupresión tumoral y generar una respuesta inmune efectiva contra el tumor (Black, Chen et al. 1992, Thaci, Ahmed et al. 2014).

Se ha demostrado que la toxina pertussis (PTx) tiene un efecto selectivo sobre la población de células Tregs, induciendo una notable reducción en la frecuencia y actividad inmunosupresora de linfocitos T CD4+CD25+ de bazo *in vivo* (Cassan, Piaggio et al. 2006, Chen, Howard et al. 2007). Por otra parte, se ha demostrado que el tratamiento con PTx inhibe la quimiotaxis de macrófagos *in vitro* (líneas celulares RAW264 y WBC264-9C)(Backlund, Meade et al. 1985, Papaspyridonos, McNeill et al. 2008). En estudios recientes (Orozco-Morales, Sanchez-Garcia et al. 2012) se demostró en un modelo subcutáneo de glioma, que ratas tratadas con PTx muestran una reducción tumoral de 77% comparadas con ratas sin tratar. Esta reducción fue asociada con la disminución en el número de linfocitos Tregs, tanto en bazo como en tumor; así como la disminución en el número de macrófagos infiltrantes del tumor.

PTx es una exotoxina secretada por *Bordetella pertussis*, el agente causal de la tosferina, está constituida por 5 subunidades (S1 a S5) conformada en un re-arreglo A-B (Tamura, Nogimori et al. 1982). La subunidad A corresponde al dominio enzimáticamente activo (S1), con actividad de ADP-ribosiltransferasa, catalizando la ADP-ribosilación de un residuo de cisteína en la subunidad α de las proteínas G

triméricas, siendo las proteínas $G_{i/o}$ el único sustrato para la PTx (Katada, Tamura et al. 1983, Kurose, Katada et al. 1983). El oligómero B está constituido por 1S2:1S3:2S4:1S5 y corresponde al dominio de unión de la toxina a receptores en las células blanco (Burns 1988, Mangmool and Kurose 2011). Una vez que la PTx es secretada por la bacteria, puede unirse a receptores celulares, mediante la región amino terminal de la subunidad S2 y S3 del oligómero B, e internalizarse en la célula a través de endocitosis mediada por receptor. La unión de adenosín trifosfato (ATP) a la PTx (Hazes, Boodhoo et al. 1996) desestabiliza el complejo A-B, generando la liberación de la subunidad S1 (Hazes and Read 1997) en el retículo endoplasmático. La reducción del enlace disulfuro se lleva a cabo mediante la acción de las proteínas disulfuro isomerasas, las cuales contribuyen a la liberación de la subunidad S1 (Burns and Manclark 1986, Moss, Stanley et al. 1986).

El mecanismo de acción celular de la PTx se describe por (Garcia-Sainz 1981, Hazeki and Ui 1981), demostrando que la acción de PTx puede ocurrir a nivel del acoplamiento entre el receptor y la adenilato ciclasa; a través de su interacción con receptores de membrana, modifica el mecanismo de acoplamiento involucrado en la activación ó inhibición de la adenilato ciclasa.

La principal actividad biológica de la PTx es debido a la ADP-ribosilación de la subunidad α de las proteínas $G_{i/o}$. La PTx potencia la activación de la adenilato ciclasa dependiente de GTP, siendo el ATP y la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) factores esenciales para su acción (Katada and Ui 1982). Al unirse la toxina a la célula, evita la interacción de las proteínas G con los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, por sus siglas en inglés) (Burns 1988). La PTx utiliza NAD⁺ como un sustrato donador de la ADP-ribosa al residuo de cisteína localizado en la región carboxilo terminal de la subunidad α de las proteínas G triméricas (Bokoch, Katada et al. 1983, Hsia, Tsai et al. 1985), catalizando el corte entre el átomo de carbono de la ribosa y el átomo de nitrógeno de la nicotinamida y transfiriendo el ADP-ribosil del NAD⁺ a una molécula aceptora de la proteína blanco (subunidad α de las proteínas $G_{i/o}$), lo cual evita la unión a sus receptores acoplados a proteínas G, y bloquea la cascada de transducción de señales (Ui, Katada et al. 1984).

Una vez que se lleva a cabo la ADP-ribosilación de la subunidad α de las proteínas $G_{i/o}$ (Bokoch, Katada et al. 1983), se inhibe el intercambio de GDP-GTP; la subunidad α es bloqueada en el estado inactivo (forma unida a GDP), haciéndola incapaz de inhibir a la adenilato ciclasa (AC), resultando en niveles incrementados de adenosín monofosfato cíclico (cAMP). Esta acumulación altera procesos metabólicos celulares y es la causa de la mayoría de los efectos patológicos de la infección causada por *Bordetella pertussis* (Houslay and Milligan 1997, Mangmool and Kurose 2011).

Otros efectos de PTx relacionados a la acción catalítica de la subunidad S1, son el incremento en la secreción de insulina en las células β pancreáticas (Katada and Ui 1980); en adipocitos, PTx tiene acción lipolítica causada por la ADP-ribosilación (Moreno, Mills et al. 1983). Su administración *in vivo*, induce linfocitosis, hiperinsulinemia e hipoglucemia, así como modificación en la sensibilización de histamina (Clausen, Munoz et al. 1968, Munoz, Arai et al. 1981); también inhibe migración de neutrófilos y permeabilidad vascular (Brito, Souza et al. 1997).

Se han reportado otros efectos independientes de la ADP-ribosilación de las proteínas $G_{i/o}$, éstos se relacionan con el oligómero B, entre los cuales se incluyen: la inducción de la acción mitogénica de las células T (Strnad and Carchman 1987); la activación de protein cinasas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés) y NF- κ B (Melien, Sandnes et al. 2000, Li and Wong 2001, Wang, Yang et al. 2006); la activación de Rac (Nishida, Suda et al. 2010); induce la maduración de células dendríticas de manera dependiente de TLR4 (Wang, Yang et al. 2006) e inicia la transducción de señales de los linfocitos T, a través de su asociación con el receptor de células T (Schneider, Weiss et al. 2007).

Numerosos efectos inmunológicos han sido atribuidos a la PTx y se ha utilizado por décadas como un adyuvante para exacerbar la severidad de la encefalomielitis alérgica experimental (EAE) en cepas permisibles y para forzar a las cepas resistentes a ser permisibles para el desarrollo de la enfermedad (Linthicum 1982, Munoz, Bernard et al. 1984). PTx es altamente inmunogénica (Nencioni, Pizza et al. 1991, Mascart, Verscheure et al. 2003), por lo que ha sido incluida en algunas vacunas de forma química o genéticamente detoxificada (Garcia-Sainz, Romero-Avila

et al. 1992, Tonon, Goriely et al. 2002). En el sistema inmune innato, PTx disminuye la producción de IL-6 e IL-10 por células cebadas (Mielcarek, Hornquist et al. 2001), promueve la maduración de las células APC, dirigiendo a una sobrerregulación de MHC clase II o moléculas de co-estimulación y estimula la producción de IL-2 (He, Gurunathan et al. 2000, Tonon, Goriely et al. 2002, Hou, Wu et al. 2003, Darabi, Karulin et al. 2004). En el sistema inmune adaptativo, PTx incrementa ambas respuestas Th1 y Th2 (Ryan, McCarthy et al. 1998, Shive, Hofstetter et al. 2000, Hofstetter, Shive et al. 2002) e inhibe la migración linfocitaria inducida por quimiocinas (Cyster and Goodnow 1995, Alt, Laschinger et al. 2002). Clásicamente, el efecto exacerbante de la PTx en EAE fue atribuido al aumento de la sensibilización a histamina (Linthicum 1982, Linthicum and Frelinger 1982) y la permeabilización de la barrera hematoencefálica (Bruckener, el Baya et al. 2003).

Las múltiples propiedades inmunológicas de la PTx, así como su efecto adyuvante en la reducción del volumen tumoral en un modelo subcutáneo de glioma, muestran que PTx tiene una potencial aplicación en el tratamiento de tumores cerebrales, siendo de gran interés determinar el efecto citotóxico de la PTx en combinación con la quimioterapia actual así como con otra alternativa inmunoterapéutica como es la vacunación en un modelo de glioma RG2., con la finalidad de generar una respuesta inmune efectiva contra el tumor, así como disminuir la inmunosupresión tumoral.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que el glioma permanece refractario a las estrategias convencionales de tratamiento, es de vital importancia buscar nuevas alternativas terapéuticas para incrementar la sobrevida y mejorar la calidad de vida de los pacientes. La inmunoterapia representa una alternativa atractiva para tratar este tipo de neoplasias, siendo una terapia con menos efectos adversos y mayor selectividad. Dado el reciente conocimiento del microambiente tumoral, el uso de la PTx como modulador del sistema inmune y potenciador de la quimioterapia pudiera favorecer una respuesta inmune antitumoral efectiva al evitar la inmunosupresión que se provoca en el ambiente tumoral, así como potenciar el efecto de quimioterapia.

HIPÓTESIS

Si la PTx tiene un efecto modulador sobre el sistema inmune, regulando subpoblaciones infiltrantes de tumor y ejerce un efecto citotóxico directo contra células tumorales, entonces la combinación de ésta con otras estrategias terapéuticas producirá una respuesta más efectiva contra las células tumorales de glioma.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la PTx en combinación con quimioterapia y vacunación en el modelo de glioma RG2.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.-Determinar el efecto de la PTx *in vitro* en combinación con temozolamida sobre inducción de apoptosis, arresto del ciclo celular y autofagia en la línea celular de glioma RG2.

2.-Determinar el efecto de la PTx en combinación con temozolamida y vacunación con células completas tumorales radiadas sobre la supervivencia de ratas implantadas con células de glioma RG2.

3.-Estudiar el efecto de la PTx en combinación con vacunación sobre las subpoblaciones inmunológicas infiltrantes del tumor.

METODOLOGÍA

Reactivos

Temozolamida (TMZ, 3,4-dihidro-3-metil-4-oxoimidazo [5,1-d]-as-tetrazina-8-carboxamida) fue adquirida de Sigma-Aldrich, y para los ensayos fue disuelta en DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Naranja de acridina fue obtenida de Polysciences (Warrington, PA, USA). Toxina pertussis (PTx) liofilizada fue adquirida de Sigma Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y fue disuelta en solución salina.

Cultivo celular

Las células de glioma RG2 derivadas de rata (Tumor Grado IV) fueron obtenidas de la Colección Americana de Cultivos y Tejidos (Rockville, MD, USA). Las células se cultivaron en condiciones estériles a 37⁰C en una atmósfera húmeda controlada con CO₂ al 5% en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (GIBCO, BRL), 4 mM de glutamina, 100 unidades/ml de penicilina, y 100 mg/ml de estreptomicina. Los cultivos se monitorearon y cuando estuvieron a 85% de confluencia, se disgregaron mediante tratamiento con tripsina, se realizó el conteo celular y posterior implante.

1.- Ensayos *in vitro*

Se sembraron 3x10⁵ células RG2/ pozo en placas de 6 pozos pre-cubiertas con poli-L-lisina (5 µg/ml), incubándolas toda la noche a 37⁰C. Se realizó el tratamiento con DMSO (1 µl/ml) para el grupo control, TMZ (100 µM), PTx (20 ng/ml) en PBS ó TMZ+PTx durante 48 h. Posteriormente las células se trataron con tripsina y colectaron para detectar apoptosis (Anexina V/7AAD), autofagia (La cadena ligera 3 de la proteína asociada a microtúbulos (LC3) y beclina-1) mediante inmunofluorescencia y western blot, detección de vesículas autofágicas y ciclo celular. El número de células viables fue determinado por exclusión del colorante azul tripano.

Para inhibir la autofagia, se utilizó 3-MA (3-metil adenina) (1.0 mM), un inhibidor de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K), la cual regula el proceso autofágico y participa en la formación del autofagosoma (Kabeya, Mizushima et al. 2000, Kim and Klionsky 2000). El inhibidor se adicionó 24 hrs posteriores al tratamiento con DMSO (1 µl/ml) (grupo control), TMZ (100 µM), PTx (20 y 200 ng/ml) ó TMZ+PTx, y transcurridas 48 hrs con el inhibidor, se monitorearon las células mediante microscopia de luz y se realizó la detección de LC3 por inmunofluorescencia.

1.1.- Detección de apoptosis (Anexina V/7AAD) por citometría de flujo

Posterior al tratamiento con TMZ, PTx y TMZ+PTx, las células se colectaron y resuspendieron en PBS a una concentración de 1×10^6 células /ml. Las suspensiones celulares se incubaron con Anexina V (Kit para detección de apoptosis- Anexina V, BD Pharmingen) y 7AAD (7-amino-actinomicina D, marcador de viabilidad) en 100 μ l de buffer de unión, durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, posteriormente se adicionaron 400 μ l de buffer de unión. Se evaluaron 10,000 eventos, mediante citometría de flujo (FACSCalibur instrument BD Biosciences) y se analizaron los datos en el programa Cell QuestPro and Flow Jo ver. 7.6.1. Un gráfico de puntos de cuatro cuadrantes se utilizó para distinguir las células viables (Anexina V-/7AAD-), células en apoptosis temprana (Anexina V+/7AAD-), células en apoptosis tardía (Anexina V+/7AAD+), y células necróticas (Anexina V-/7AAD+). La suma de apoptosis temprana y apoptosis tardía se presentó como apoptosis total (Pietra, Mortarini et al. 2001).

1.2.- Detección de ciclo celular (yoduro de propidio) por citometría de flujo

La distribución del ciclo celular fue determinado por citometría de flujo utilizando tinción con yoduro de propidio (PI). Transcurridas 48 h de tratamiento con TMZ, PTx y TMZ+PTx, las células se colectaron y resuspendieron en PBS a una concentración de 1×10^6 células /ml. Se fijaron con etanol al 70% y se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Las células se lavaron con PBS, se centrifugaron y resuspendieron en buffer de permeabilización (Na_2HPO_4 (0.2 M), ácido acético (0.1 M)) e incubaron 30 minutos a 37°C . Posteriormente, se centrifugaron y resuspendieron en RNAsa (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y yoduro de propidio (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), incubándolas en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. El ciclo celular fue determinado mediante citometría de flujo (FACSCalibur instrument BD Biosciences), realizando las mediciones a 488 nm, evaluando 10,000 eventos. Los datos se analizaron utilizando el programa Cell QuestPro and Flow Jo ver. 7.6.1.

1.3.- Detección de LC3 y beclina-1, mediante inmunofluorescencia

LC3 es esencial durante la inducción de autofagia y está asociada con la membrana del autofagosoma (Kabeya, Mizushima et al. 2000, Munafo and Colombo 2001). Transcurridas 48 h de tratamiento con TMZ, PTx y TMZ+PTx, las células se fijaron con paraformaldehído (4%), se bloquearon con suero normal de cabra (3%), se incubaron en BSA (1%)/suero normal de cabra (10%)/ glicina (0.3M) en PBS-Tween (0.1%) durante 1 h para permeabilizar las células y bloquear interacciones no específicas proteína-proteína. Las células se incubaron con el anticuerpo policlonal cabra anti-LC3A/B ó con el anticuerpo policlonal conejo anti-beclina 1 (abcam, Cambridge, UK) durante 30 minutos. Posteriormente, se lavaron con PBS e incubaron con el anticuerpo secundario IgG anti-cabra ó IgG anti-conejo (abcam, Cambridge, UK) durante 30 minutos en oscuridad, se lavaron con PBS y adicionó el medio de montaje. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio Leica DMLS Galen III (Leica Microsystems, Inc., Wetzlar, Alemania).

1.4.- Detección de LC3 y beclina-1, mediante Western blot

Posterior al tratamiento con TMZ, PTx y TMZ+PTx, las células se lisaron con buffer de lisis (Hepes (25 mM), Tritón X-100 (1.5%), SDS (0.1%), NaCl (0.5 M), EDTA (5 mM), y desoxicolato de sodio (0.1 mM)) conteniendo inhibidores de proteasas. Los extractos totales celulares se cuantificaron (Bio-Rad protein assay dye reagent), cantidades iguales de proteínas de cada grupo se separaron mediante SDS-PAGE y posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF, las cuales se incubaron con solución de bloqueo (leche 5%) durante 1 h y posteriormente se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-LC3 a 4⁰C durante 16 h, las membranas se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a HRP (peroxidasa de rábano) durante 1 h a temperatura ambiente. Las proteínas inmunoreactivas fueron detectadas usando un reactivo de quimioluminiscencia (SuperSignal West Pico chemiluminescence substrate; Pierce Biotechnology) y posteriormente fueron expuestas a películas de rayos X (Fuji Film Corp).

1.5.- Detección de vesículas autofágicas (naranja de acridina) por citometría de flujo

La autofagia es caracterizada por la formación de vesículas autofágicas (organelos vesiculares ácidos- AVO's). Para detectar y cuantificar los AVO's, se utilizó una tinción con naranja de acridina, este agente lisosomotrópico se mueve libremente a través de las membranas biológicas, donde está sin carga; su forma protonada se acumula en los compartimentos ácidos, donde forma agregados. Las células teñidas con naranja de acridina presentan fluorescencia verde brillante en el citoplasma y una fluorescencia roja difusa en el núcleo, mientras que en los compartimentos ácidos presentan una fluorescencia roja brillante. (Traganos and Darzynkiewicz 1994, Dolan and Pegg 1997, Kanzawa, Bedwell et al. 2003). Se pueden medir los cambios en la intensidad de fluorescencia roja, que es proporcional al grado de acidez y/o el volumen del compartimento celular ácido.

Posterior al tratamiento con TMZ, PTx y TMZ+PTx, las células fueron colectadas en medio RPMI 1640 sin rojo fenol (Sigma Aldrich), se resuspendieron en PBS a una concentración de 1×10^6 células /ml y se trataron con naranja de acridina (5 µg/ml), la fluorescencia verde (FL-1) y roja (FL-3) del naranja de acridina fue medida mediante citometría de flujo usando el programa CellQuest (Becton Dickinson, San José, CA, USA). La suma de los cuadrantes superior izquierdo y superior derecho del gráfico de puntos fue utilizado para representar el porcentaje de autofagia. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

2.- Ensayos *in vivo*

Antes del implante intracraneal, las células de glioma RG2 fueron colectadas mediante tratamiento con tripsina y resuspendidas en medio DMEM. La suspensión celular fue regularmente agitada para evitar sedimentación y mantenida en esterilidad a 4°C hasta su implantación en el modelo animal.

2.1.- Modelo Ortotópico de Glioma

Para implantar las células de glioma RG2 se utilizaron ratas Fischer 344 (Bioinvert, México, DF) (n = 28) de tres meses de edad, sexo masculino que fueron alimentadas *ad libitum*. El procedimiento de implantación de células se llevó a cabo basándose en el método desarrollado por (Kobayashi, Allen et al. 1980). Cada animal fue anestesiado (ketamina-xilacina vía intraperitoneal) e inmovilizado en el aparato de estereotaxia (Stoelting Co., Wood Dale, IL), posterior a la desinfección e incisión de la piel de la cabeza, se realizó una pequeña perforación en el cráneo (2 mm lateral y 2 mm por delante del bregma, en el lado derecho del cráneo). Se inocularon 1×10^6 /ml células de glioma RG2 resuspendidas en 10 μ l de medio de cultivo DMEM, se inyectaron a una profundidad de 3 mm a una velocidad de 2 μ l/min utilizando una jeringa de vidrio de 25 μ l (Hamilton, Reno, NV). Un tiempo de espera de 2 minutos fue seguido después de la inyección.

2.2.- Tratamiento con toxina pertussis y temozolamida

Posterior a la inoculación, los animales fueron divididos en cuatro grupos de acuerdo al tratamiento: grupo 1-ratas sin tratamiento, con PBS (control); grupo 2-ratas tratadas con TMZ (10 mg/Kg en 200 μ l de jugo de manzana por vía oral durante 5 días); grupo 3-ratas tratadas con la toxina pertussis (PTx) (se administra por vía intraperitoneal a una concentración de 2 μ g (2 días post-implante) y 1 μ g (4 días post-implante) disuelta en PBS); grupo 4-ratas tratadas con la combinación PTx+ TMZ, administradas de acuerdo a la descripción anterior. Cada grupo estaba constituido por 7 ratas. Se sacrificaron 20 días posteriores al implante, de acuerdo a la guía del Instituto Nacional de Neurología para el uso compasional de animales de laboratorio. Todos los experimentos fueron revisados y aprobados por el Comité de Cuidado Animal del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México)

2.3.- Tratamiento con toxina pertussis y vacunación con células RG2 irradiadas

Se evaluó el tratamiento con PTx, así como la vacunación con antígenos tumorales irradiados para inducir una respuesta inmune antitumoral. Se utilizaron 7 ratas Fischer para cada tratamiento, los grupos utilizados fueron los siguientes: grupo 1-ratas con tumor sin tratamiento (control); grupo 2-ratas con tumor tratadas con PTx; grupo 3-ratas con tumor vacunadas con células RG2 irradiadas; grupo 4-ratas con tumor tratadas con PTx y vacunadas con células RG2 irradiadas. La toxina se administró por vía intraperitoneal a una concentración de 2 µg (2 días post-implante) y 1µg (4 días post-implante) disuelto en solución salina. Para la vacunación, las células RG2 fueron irradiadas a 50 Gy, se administraron por vía subcutánea 2.5×10^6 células irradiadas, resuspendidas en 500 µl de PBS al día 2 y 4 post-implante. Las ratas control recibieron PBS con el mismo esquema.

2.4.- Cuantificación de las distintas subpoblaciones celulares presentes en el tumor, sangre y bazo

Se realizó inmunofluorescencia directa usando anticuerpos monoclonales anti-CD4-PE, anti-CD8-PE, anti-CD25-APC y anti-FoxP3-FITC, para determinar el porcentaje de células CD4+, CD8+, CD4+/CD25+/FoxP3 en el tumor. Se colocaron 30 µl de homogenado de tumor e incubaron con 5 µL de su correspondiente anticuerpo monoclonal (dilución 1:100) durante 30 minutos. Posteriormente 200 µL de solución de permeabilización se adicionó a las células e incubó por 10 min., se lavaron y posteriormente incubaron con anti-FoxP3-FITC durante 30 min, se lavaron y fijaron con paraformaldehído al 1%/PBS para examinarlas con citometría de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences) usando el Programa CellQuest Pro (BD Bioscience).

2.5.- Determinación de sobrevida

De acuerdo a lo descrito se realizó el implante del tumor en ratas Fischer, las cuales se dividieron en los grupos anteriormente indicados, monitoreando periódicamente la evolución del tumor mediante resonancia magnética 1.5 T (General Electric, modelo Signa Excite HDxt 1.5 T). Para determinar sobrevida, se registró el día en que las ratas murieron y posteriormente se realizó el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier.

Análisis estadístico

Con fines descriptivos, se utilizó la media aritmética y desviación estándar (DE). Los grupos se compararon usando análisis de Varianza (ANOVA) y post-hoc (Tukey); un valor de $p < 0.05$ es definido como significativo. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS ver 18 y Kaplan Meier para sobrevida (SPSS 18.0 para Windows; SPSS Inc., Chicago IL).

RESULTADOS

Viabilidad celular e inducción de apoptosis en la línea celular de glioma RG2

Se evaluó el efecto citotóxico de TMZ, PTx ó TMZ+ PTx en la línea celular de glioma RG2 mediante Anexina V/ 7AAD por citometría de flujo. En la **Figura 1a** se observan los gráficos de puntos representativos de las células tratadas con los diferentes tratamientos. Después de 48 h de tratamiento, se observa una significativa disminución en la viabilidad celular en el grupo tratado con TMZ (82.2+/-0.91), PTx (83.1+/- 0.06) y TMZ+PTx (80.2+/- 0.65) comparado con el grupo control (96.2+/-0.55) ($p<0.001$) (**Figura 1b1**). Se analizó el grado de apoptosis temprana y tardía en las células de glioma inducidas con TMZ, PTx y TMZ+PTx. Se observa un incremento en el porcentaje de células en apoptosis temprana posterior al tratamiento con TMZ (14.2+/- 1.05), PTx (12.9+/- 0.03) y TMZ+PTx (13.6+/- 0.95) en comparación con el grupo control (2.8+/- 0.15) ($p<0.001$) (**Figura 1b2**). Respecto a la apoptosis tardía inducida por los tratamientos, se observan diferencias significativas en TMZ (3.2+/- 0.21), PTx (3.2+/-0.32) y TMZ+ PTx (5.5+/- 1.11) en comparación con el grupo control (0.81+/- 0.44) ($p=0.007$ y $p<0.001$) (**Figura 1b3**). No se encontraron diferencias entre los grupos en el porcentaje de células necróticas ($p=0.795$) (**Figura 1b4**), indicando que la citotoxicidad de TMZ ó PTx no es debida a inducción de necrosis.

Figura 1

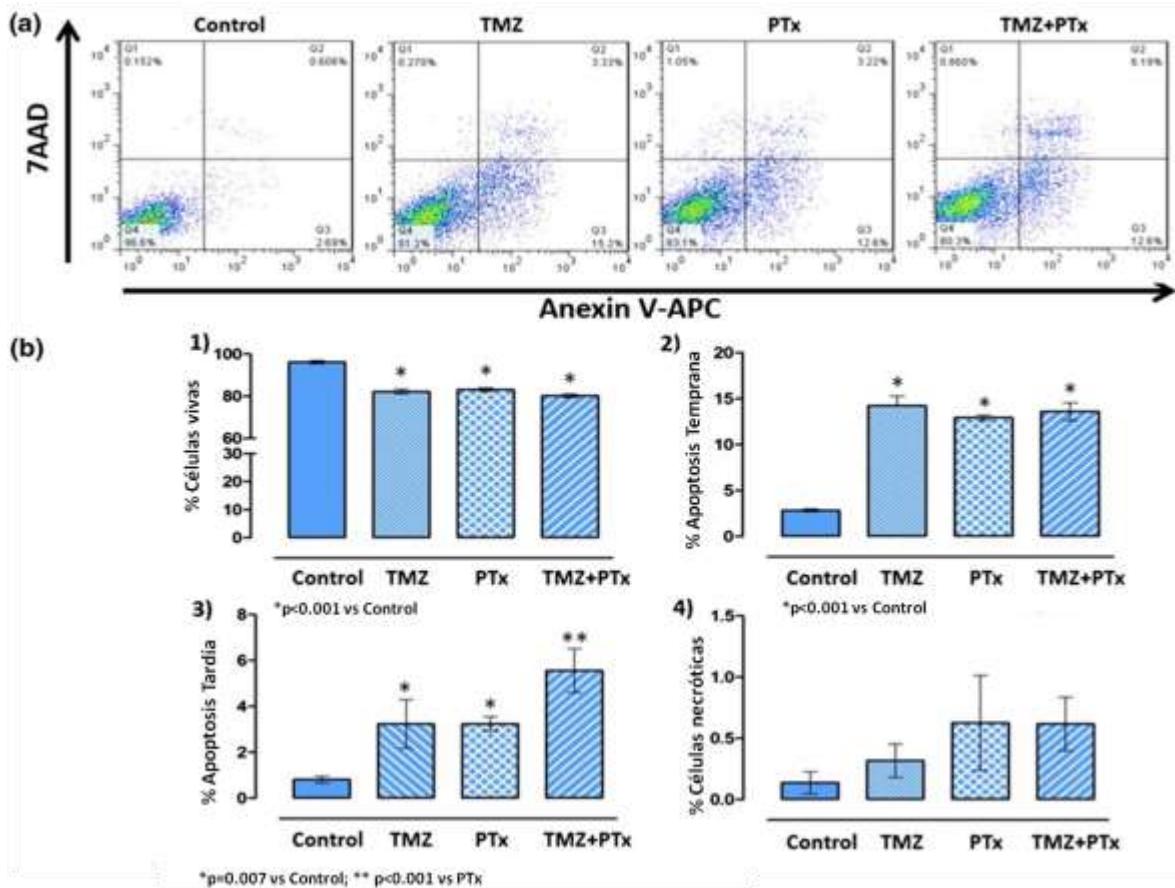


Figura 1. Efecto de PTx y TMZ sobre la inducción de apoptosis en células de glioma RG2. Las células tumorales fueron sembradas a una concentración de 3×10^5 células/pozo e incubadas durante toda la noche a 37°C . Transcurridas 48 h de tratamiento con PTx (20 ng/ml) y TMZ (100 μM), las células fueron colectadas y se determinó el número de células viables, células apoptóticas y necróticas mediante citometría de flujo. Los resultados mostrados corresponden a 3 experimentos independientes realizados por triplicado. **a)** representa el gráfico de puntos de la inducción de apoptosis en células de glioma RG2 tratadas con TMZ, PTx y TMZ+PTx. **b1)** % de células viables, **b2)** % de células en apoptosis temprana, **b3)** % de células en apoptosis tardía, **b4)** % de células necróticas.

Efecto de PTx, TMZ y PTx+TMZ en el ciclo celular

Para determinar si el tratamiento con PTx, TMZ y PTx+TMZ induce arresto en el ciclo celular en las células de glioma RG2, se llevó a cabo un análisis fluorocitométrico del ADN. En la **Figura 2**, se observa que el tratamiento con los diferentes compuestos no muestra cambios significativos en el ciclo celular en las células de glioma RG2.

Figura 2

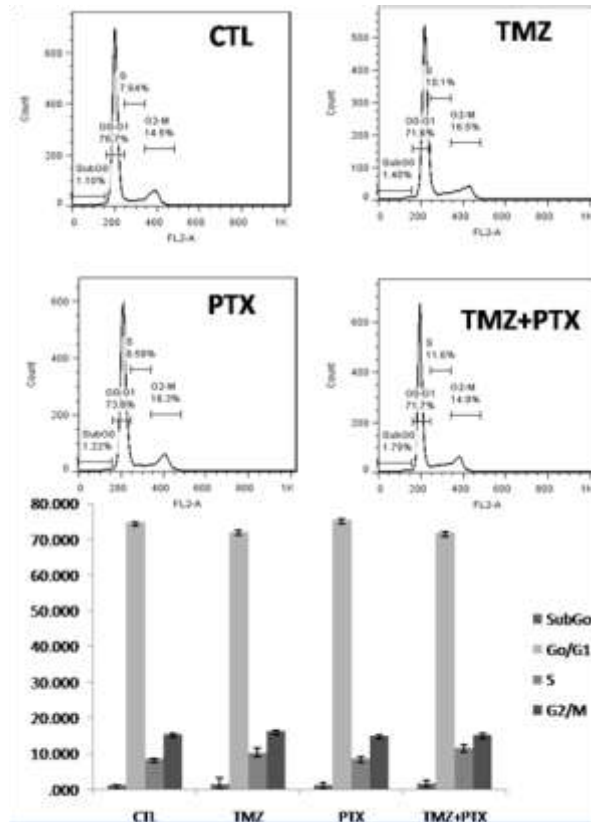


Figura 2. Efecto de PTx y TMZ sobre las fases del ciclo celular en células de glioma RG2. Las células fueron tratadas con PTx, TMZ y PTx+TMZ durante 3 días, colectadas, teñidas con yoduro de propidio (PI) y analizadas en el FACSCalibur. El porcentaje de células en diferentes fases del ciclo celular fueron determinadas utilizando el Programa Flow Jo ver. 7.6.1. Los resultados mostrados corresponden a 3 experimentos independientes realizados por triplicado.

Inducción de autofagia en las células de glioma RG2 tratadas con PTx, TMZ y PTx+TMZ

Evaluamos si el tratamiento con PTx induce autofagia ó si la combinación de PTx + TMZ potencia el efecto autofágico inducido por el tratamiento con TMZ. Posterior a la exposición de TMZ (100 μ M), PTx (20ng/ml),y PTx+TMZ durante 72 h, las células RG2 fueron teñidas con el anticuerpo anti-LC3 (**Figura 3a**) ó con el anticuerpo anti-beclina-1 (**Figura 3b**), analizando los cambios morfológicos por microscopia de fluorescencia. Se observa un incremento en la intensidad de fluorescencia en las células sometidas a los diferentes tratamientos, que corresponden a vesículas autofágicas (**Figuras 3a y 3b**). La expresión de LC3 I y II se determinó mediante Western blot (**Figura 3c**), observando un incremento en la expresión de LC3 II en las células de RG2 tratadas con PTx, TMZ y el efecto se ve potenciado en la combinación PTx+TMZ.

Figura 3

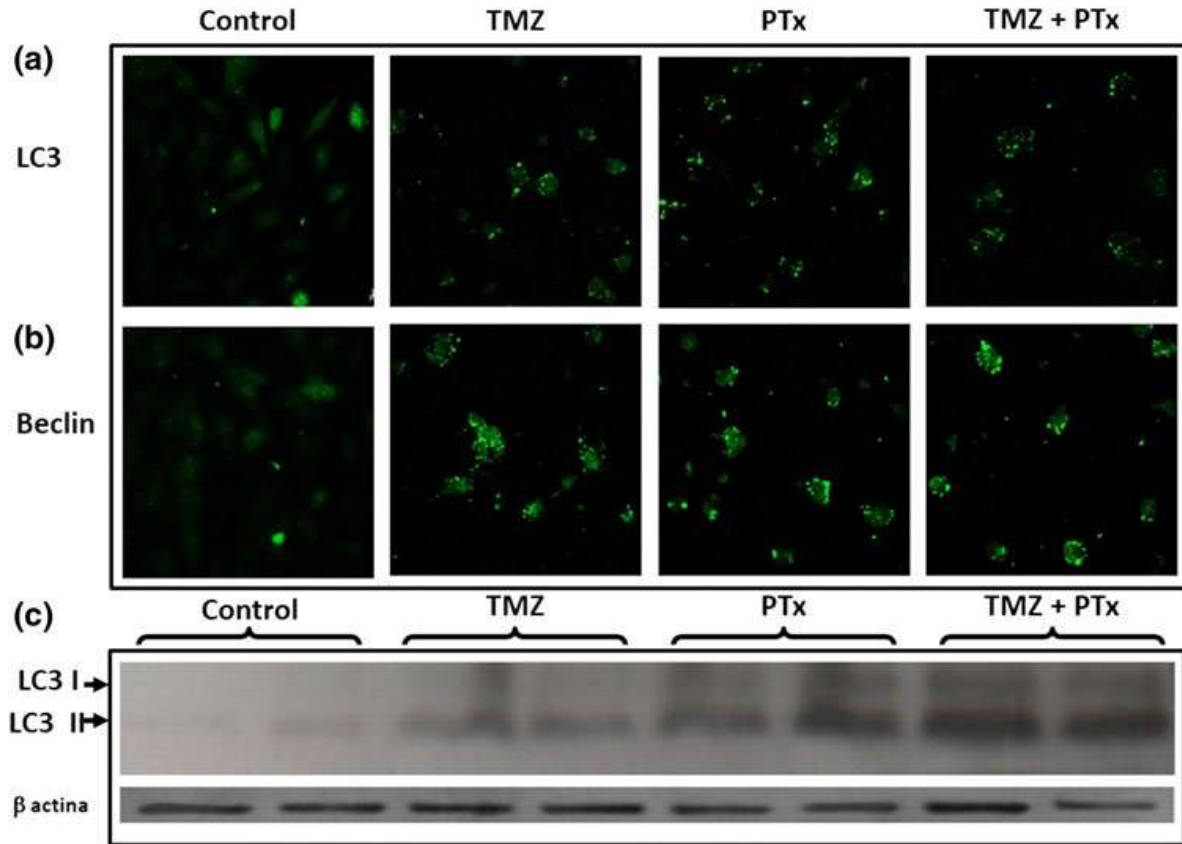


Figura 3. Inducción de autofagia por TMZ, PTx y TMZ+PTx en células de glioma RG2. Las células fueron cultivadas y tratadas con TMZ(100 μ M), PTx (20ng/ml),y PTx+TMZ durante 72 hrs, las células de RG2 se tiñeron con el anticuerpo policlonal cabra anti-LC3A/B (a) ó el anticuerpo policlonal conejo anti-beclina- 1 (b), siendo examinadas por microscopia de fluorescencia. En (c) se muestra mediante análisis de Western blot, la expresión de LC3 I y II en células de glioma RG2 sometidas a tratamiento con TMZ, PTx y TMZ+PTx.

Desarrollo de organelos vesiculares ácidos (AVO's) en células de glioma RG2 tratadas con PTx, TMZ y PTx+TMZ

Para identificar y cuantificar el desarrollo de AVO's, que son característicos de autofagia, utilizamos naranja de acridina, llevando a cabo un análisis fluorocitométrico. Se observa en la **Figura 4a** que el tratamiento con TMZ, PTx y PTx+TMZ induce en células de glioma RG2 un incremento en la intensidad de fluorescencia roja (eje Y) de 5.34, 11.60 y 31.19%, respectivamente, indicando el desarrollo de AVO's después de 48 hrs. de tratamiento. Se representó en un gráfico el porcentaje de inducción de AVO's \pm DE (Desviación Estándar) (**Figura 4b**). Se realizaron tres experimentos independientes realizados por triplicado, observando una tendencia similar siendo el efecto estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

Figura 4

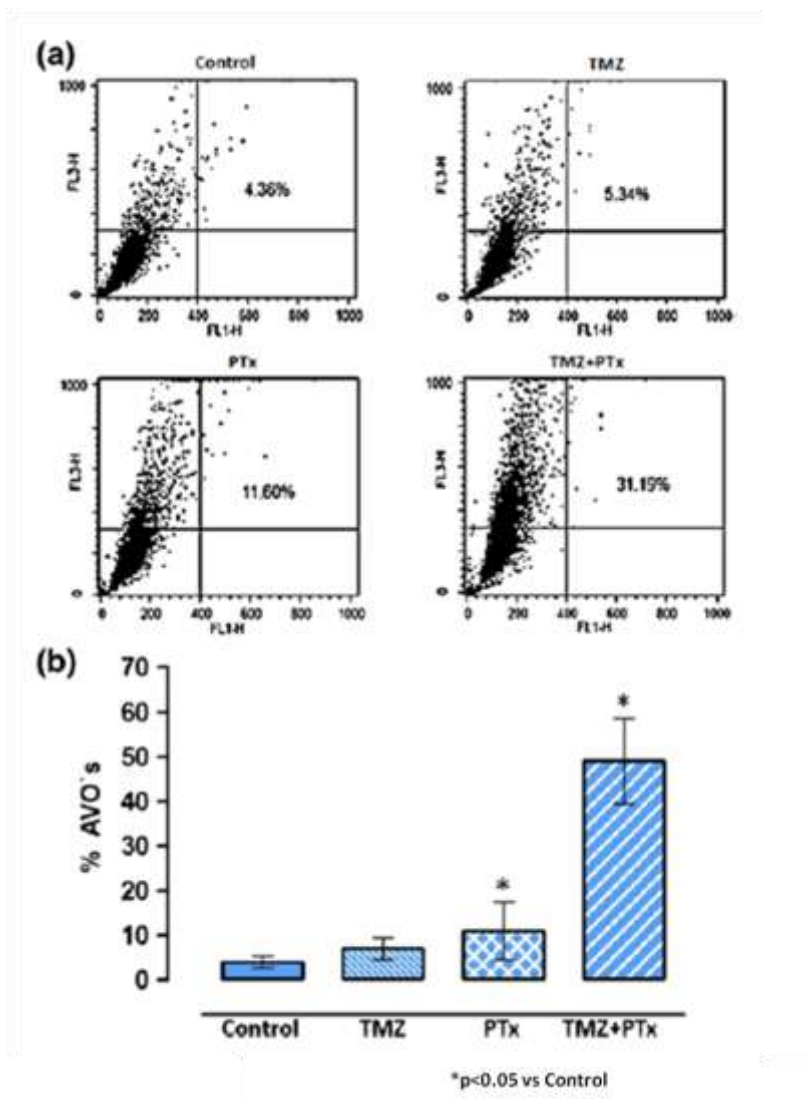
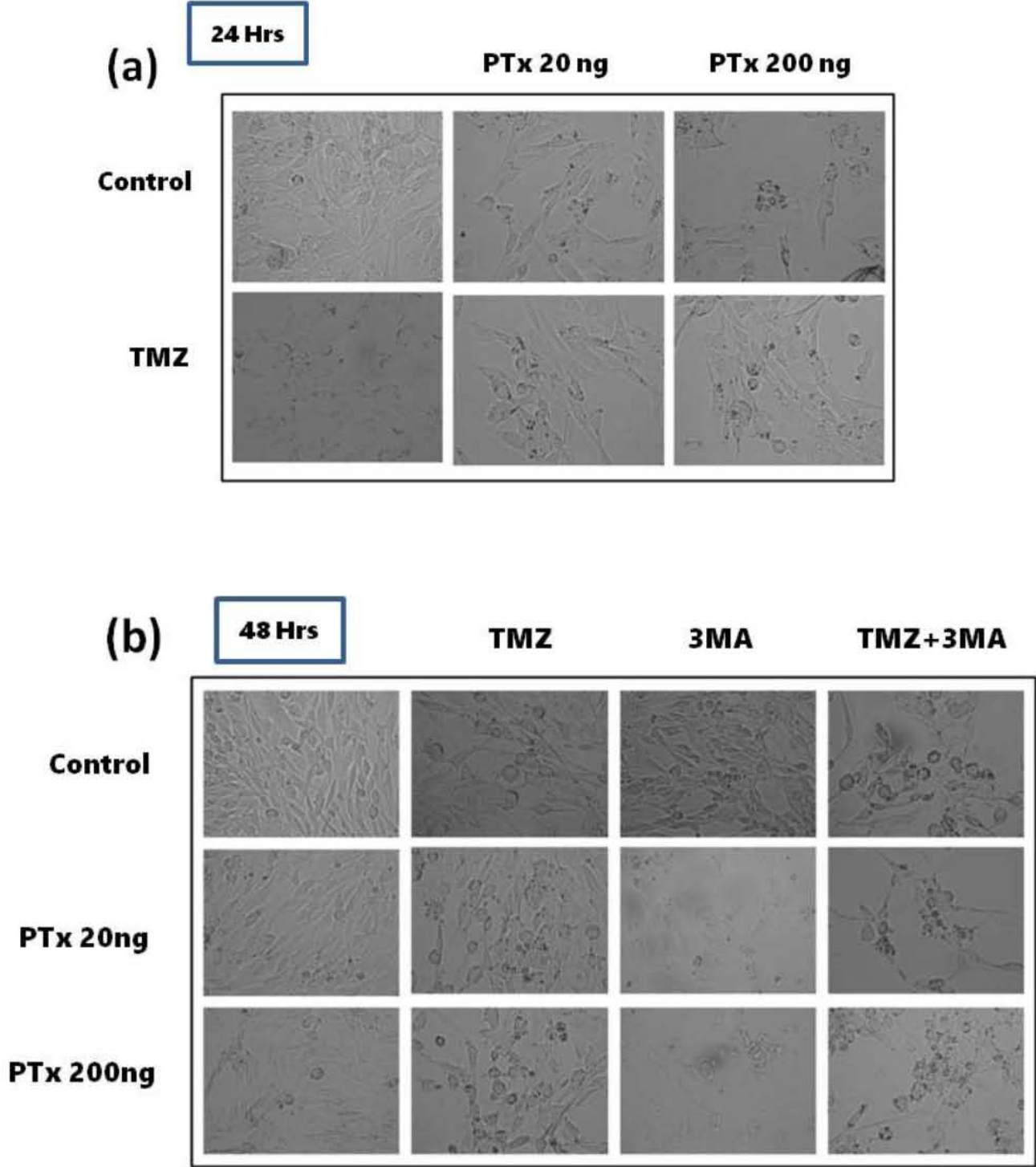


Figura 4. Desarrollo de AVO's en células de glioma RG2 tratadas con PTx, TMZ y PTx+TMZ. Detección de fluorescencia verde y roja en células teñidas con naranja de acridina utilizando análisis FACS (a). FL1-H indica la intensidad de color en verde, mientras que FL3-H indica la intensidad de color en rojo. (b) El gráfico muestra el porcentaje de inducción de AVO's \pm DE. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Cambios morfológicos e inducción de autofagia en células de glioma RG2

Las células de glioma RG2 sometidas al tratamiento con PTx (20 ng/ml, 200 ng/ml), TMZ (100 μ M) y PTx+TMZ se monitorearon por microscopía de campo claro, después de 24, 48 y 72 h de tratamiento. Transcurridas 24 h de tratamiento (**Figura 5a**), algunas células mostraron vacuolas, las cuales son observadas principalmente en los grupos tratados con PTx y su combinación con TMZ. A las 48 h y 72 h post-tratamiento (**Figura 5b y 5c**) se observa un incremento el número de células con vesículas autofágicas. Cuando se adicionó el inhibidor de autofagia 3-MA (3-metil adenina, 1 mM), en los grupos tratados con PTx y TMZ, se observa una disminución en el número de las vesículas autofágicas, así como el número de células viables. Transcurridas 72 h, las células fueron teñidas con el anticuerpo anti-LC3 (**Figura 6**) observando que con los tratamientos PTx, TMZ y la combinación PTx+TMZ se detecta LC3, siendo indicativo de que las células de glioma se encuentran en un proceso autofágico; al adicionar el inhibidor 3-MA, la detección de LC3 se ve disminuida.

Figura 5



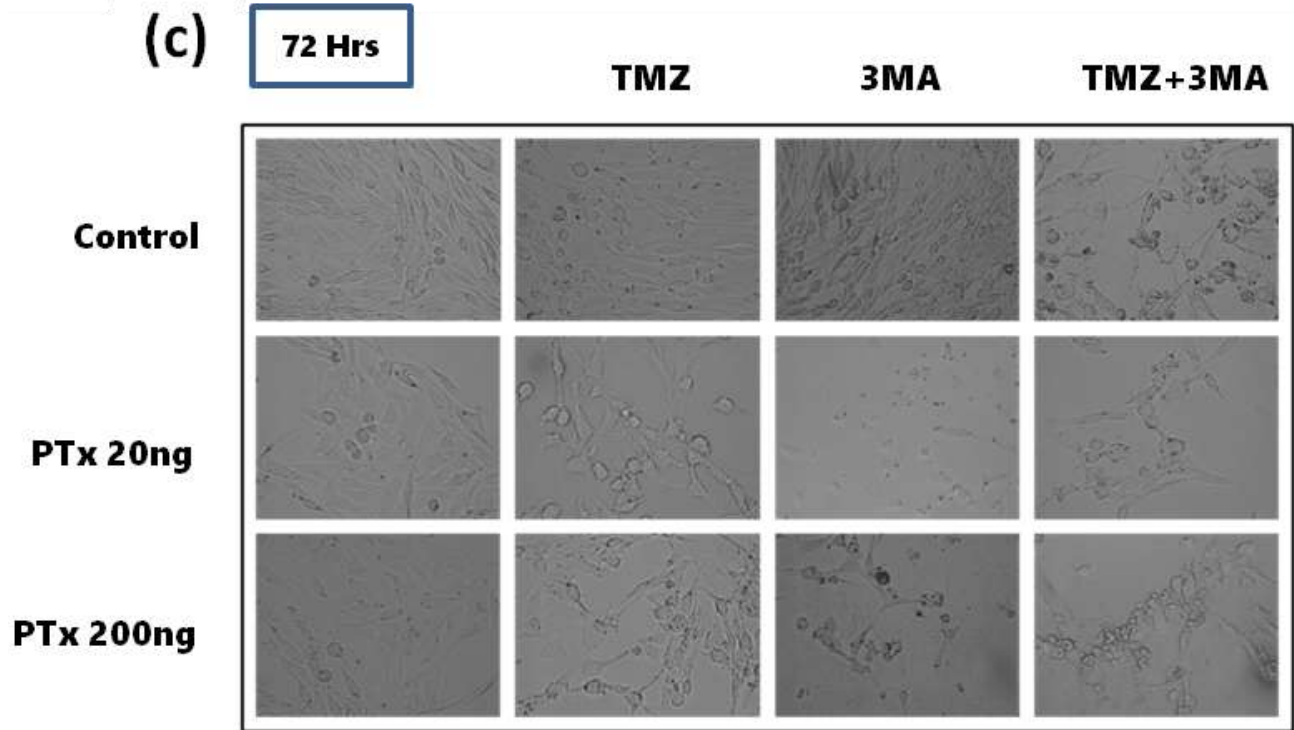


Figura 5. Monitoreo del daño celular inducido por TMZ, PTx y TMZ+PTx a las 24 h posteriores al tratamiento (a), 48 h con y sin 3-MA (b) y 72 h con y sin 3MA (c). Las imágenes fueron tomadas mediante microscopía de campo claro y fluorescencia, a las 72 h post-tratamiento. El 3-MA fue utilizado para inhibir la autofagia.

Figura 6

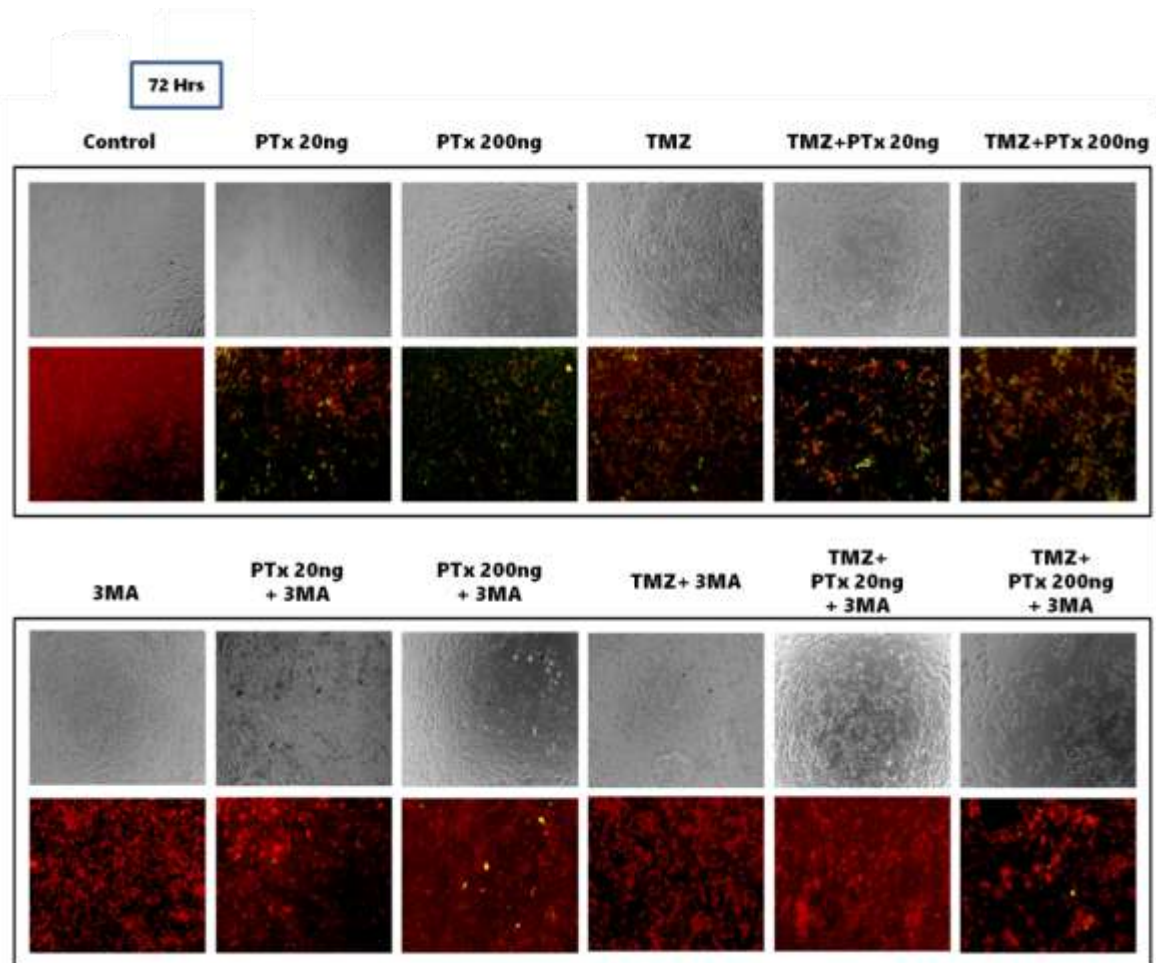


Figura 6. Monitoreo del daño celular inducido por TMZ, PTx y TMZ+PTx a las 72 h posteriores al tratamiento con y sin 3-MA. El núcleo fue contrateñido con yoduro de propidio (rojo) y el anticuerpo LC3 fue utilizado para detectar las células que tienen expresión de LC3 después del tratamiento. El 3-MA fue utilizado para inhibir la autofagia.

Sobrevida de las ratas implantadas con células de glioma RG2 y sometidas a los tratamientos con PTx, TMZ y PTx+TMZ

Se determinó si el tratamiento con PTx, TMZ y PTx+TMZ incrementa la supervivencia de ratas implantadas con células de glioma RG2. Se realizó el análisis de sobrevida de Kaplan–Meier de las ratas con glioma intracerebral sometidas a los tratamientos descritos. El periodo de sobrevida media para el grupo control se determinó 21 días post-implante (**Figura 7**). Las ratas sometidas al tratamiento con TMZ (25 días, $p=0.05$) y PTx (28 días, $p=0.048$) muestran incremento en el periodo de sobrevida, presentando un mayor efecto el grupo PTx+TMZ (31 días, $p=0.014$). Los resultados sugieren que la combinación PTx+TMZ presenta mayor incremento en la sobrevida de las ratas con implante de glioma RG2.

Figura 7

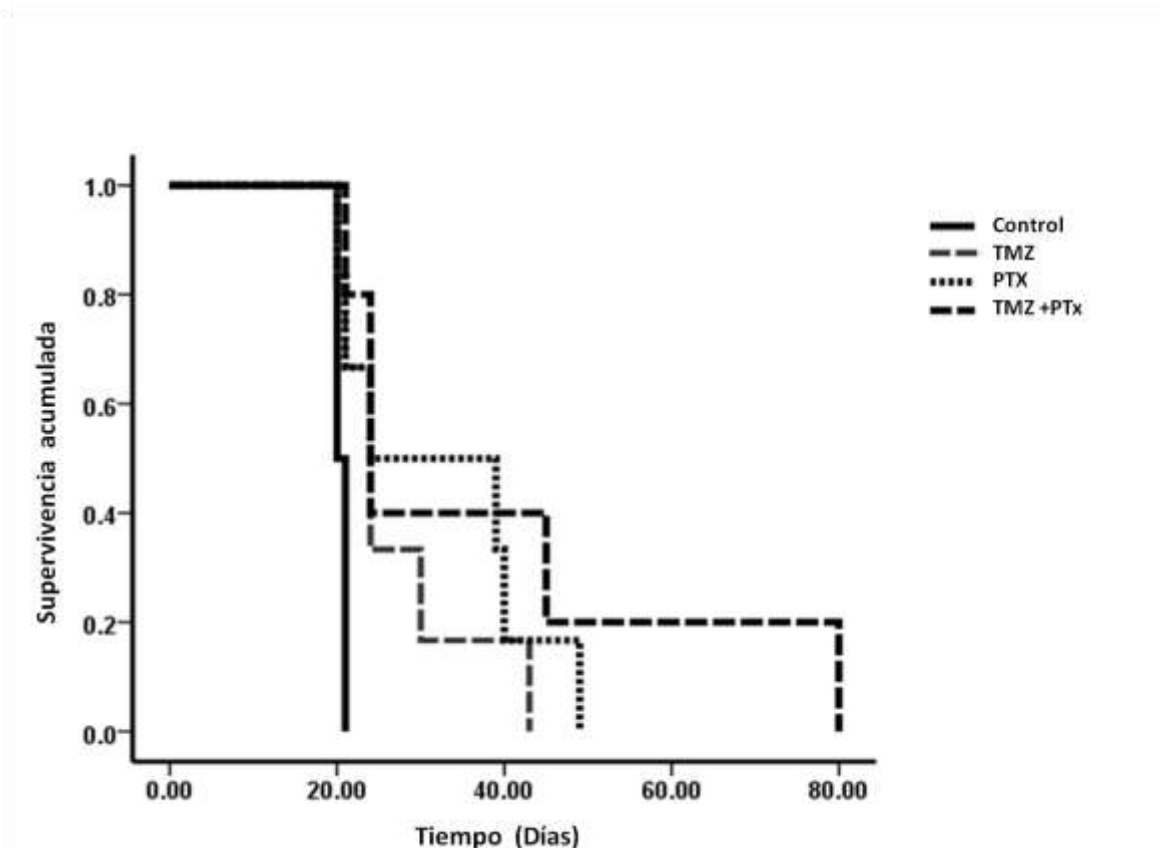


Figura 7. Análisis de supervivencia de Kaplan–Meier de ratas con glioma intracerebral. Administración sistémica (vía intraperitoneal) de PTx (2 μ g al día 0 y 1 μ g al día 2), la TMZ se administró vía oral (10mg/Kg) durante 5 días. Curvas de supervivencia y el análisis de Kaplan-Meier de ratas implantadas con células RG2 (1×10^6 células/rata) y tratadas con TMZ, PTx y TMZ+PTx. Se utilizaron 7 ratas por grupo de tratamiento.

Sobrevida de las ratas implantadas con células de glioma RG2 y sometidas a los tratamientos con PTx, vacunación y PTx+vacunación

Se realizó el análisis de sobrevida de Kaplan–Meier de las ratas con glioma intracerebral sometidas a tratamiento con PTx, vacunación con células de glioma RG2 irradiadas y la combinación PTx + vacunación. En la **Figura 8** se observa que la sobrevida media para el grupo control es de 21 días post-implante. El periodo de sobrevida incrementa en las ratas sometidas al tratamiento con PTx (27 días, $p=0.017$), y con vacunación (30 días, $p=0.003$); sin embargo, el grupo PTx+vacunación (24 días, $p=0.272$) no mejora la supervivencia, sugiriendo que sólo los tratamientos individuales presentan un incremento en la sobrevida de las ratas con implante de glioma RG2.

Figura 8

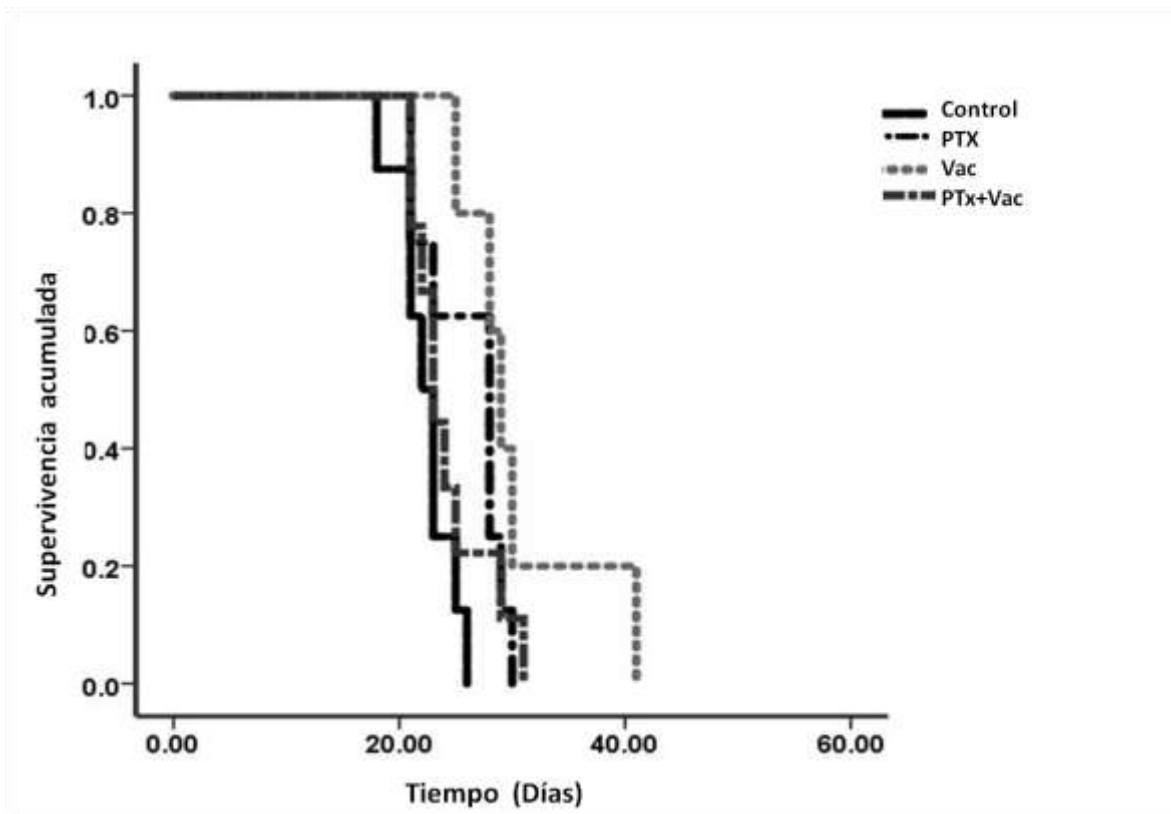


Figura 8. Análisis de supervivencia de Kaplan–Meier de ratas con glioma intracerebral. Administración sistémica (vía intraperitoneal) de PTx (2 μg al día 0 y 1 μg al día 2), la vacunación se realizó vía subcutánea con 2.5×10^6 células RG2 irradiadas con 50Gy. Curvas de supervivencia y el análisis de Kaplan-Meier de ratas implantadas con células RG2 (1×10^6 células/rata) y tratadas con PTx, Vac y PTx+Vac. Se utilizaron 7 ratas por grupo de tratamiento.

Monitoreo del Crecimiento Tumoral

Se monitoreo el crecimiento tumoral de las ratas implantadas con células de glioma RG2 intracerebral, sometidas a los tratamientos de PTx, Vac y PTx+Vac. En la **Figura 9** se observa que el volumen tumoral correlaciona con la sobrevida, mostrando una disminución en el tamaño del tumor en las ratas tratadas con PTx así como las de vacunación.

Figura 9

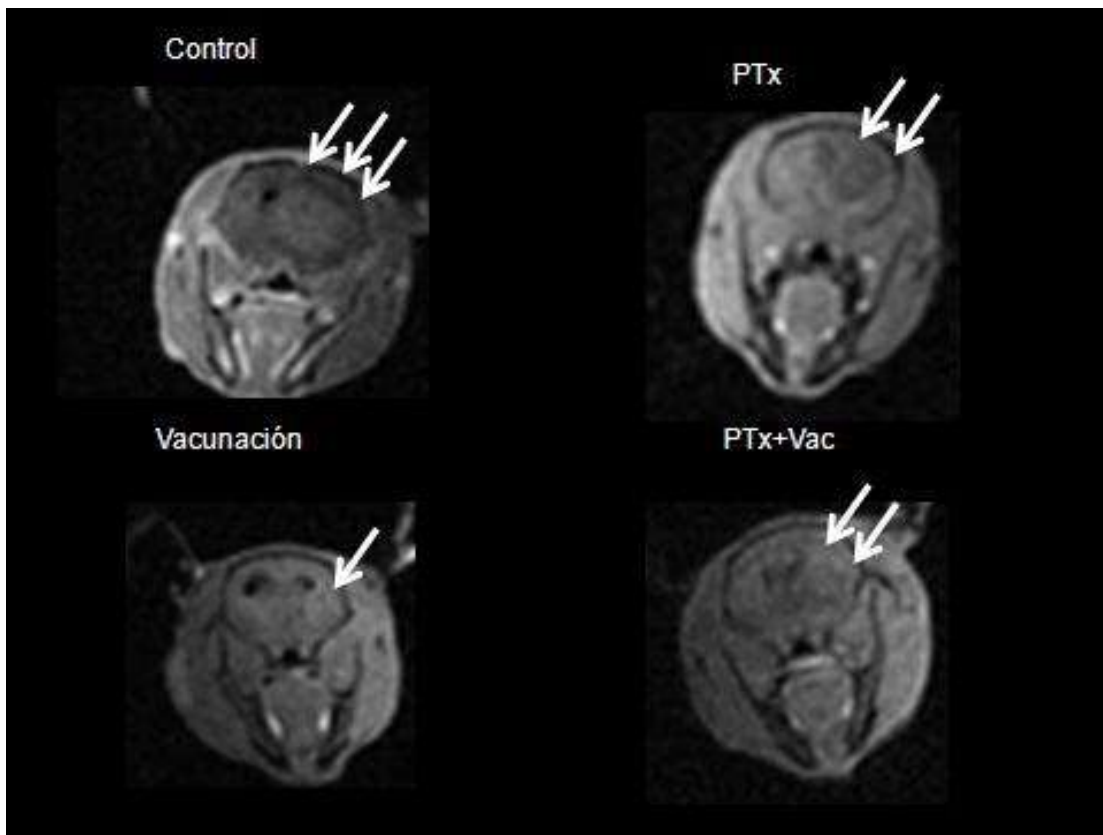
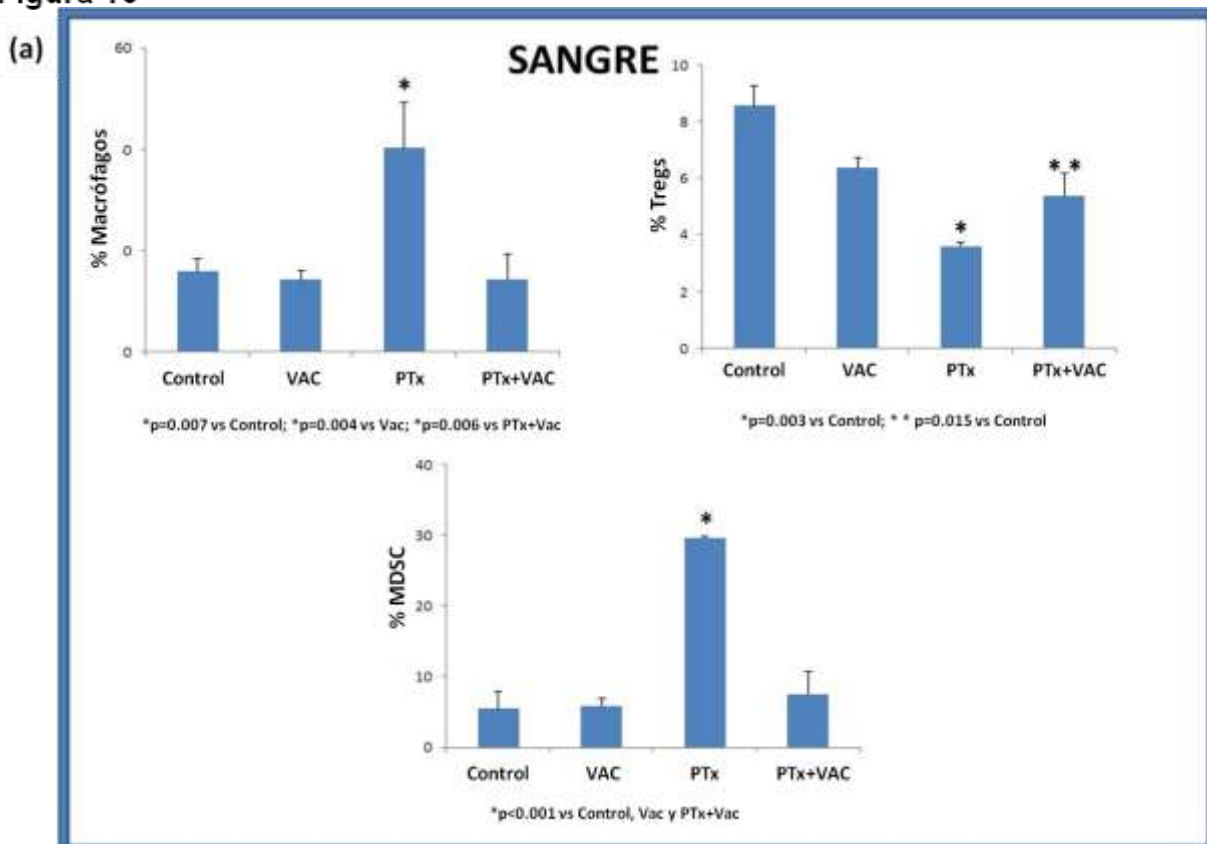


Figura 9. Monitoreo del crecimiento tumoral. Ratas Fisher implantadas con 1×10^6 /ml células de glioma RG2 intracerebral, tratadas con PTx, Vac y PTx+Vac fueron monitoreadas mediante Resonancia Magnética Nuclear.

Cuantificación de las distintas subpoblaciones celulares presentes en sangre

Para determinar si los tratamientos PTx, Vac y PTx+Vac tienen efecto sobre la respuesta inmune anti- y pro-tumoral en las ratas implantadas con células de glioma RG2 intracerebral, se cuantificaron las subpoblaciones de células inmunológicas presentes en sangre. Se muestran análisis de las subpoblaciones de linfocitos Tregs (CD4+CD25+FoxP3+), macrófagos (CD68+), células NK (CD56+), linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y células MDSC (CD11bc+His48+) en sangre de las ratas sometidas a los tratamientos descritos. En la **Figura 10 (a y b)** se observa que el tratamiento con PTx incrementa el número de macrófagos y de células MDSC, además se presenta una disminución en el número de linfocitos Tregs, ésta disminución también se observa en los tratamientos Vac y PTx+Vac. En el tratamiento con vacunación no se aprecian cambios en las otras subpoblaciones inmunológicas, mientras que el tratamiento con PTx+Vac muestra un incremento en las células NK.

Figura 10



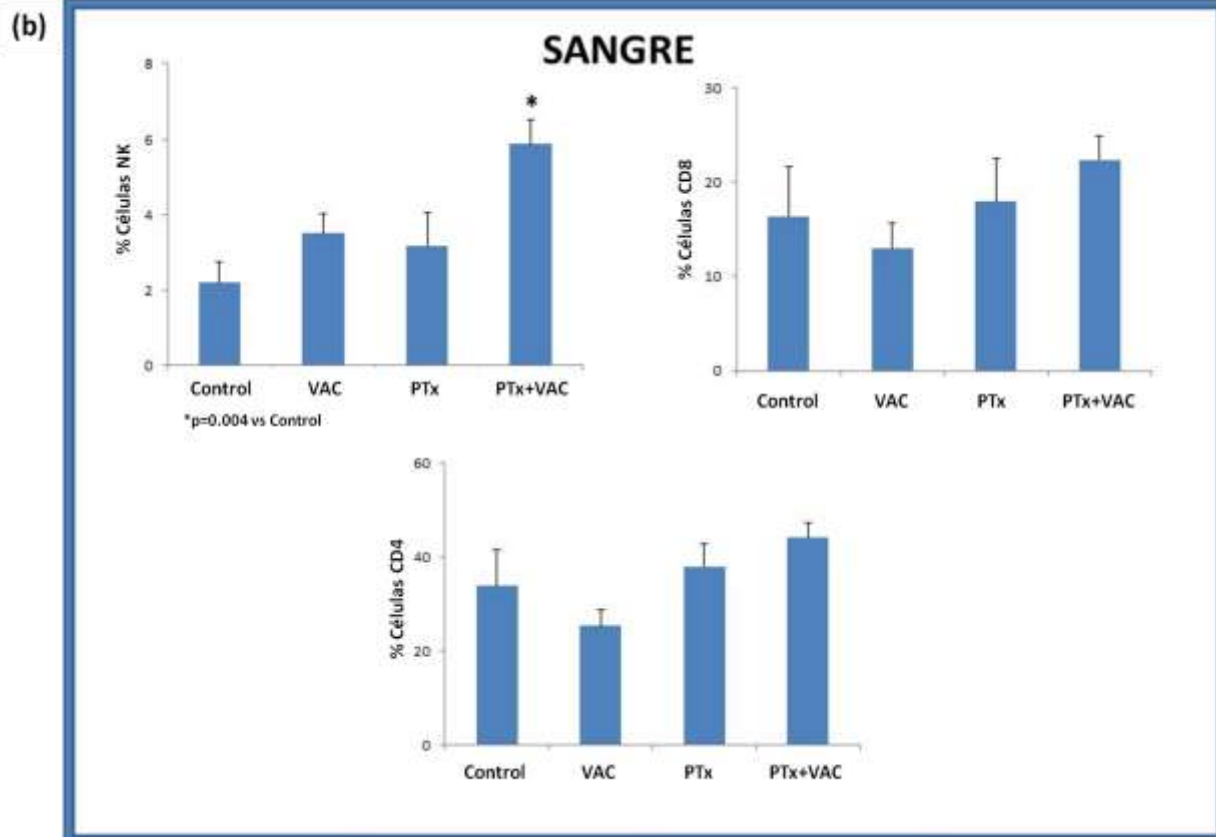
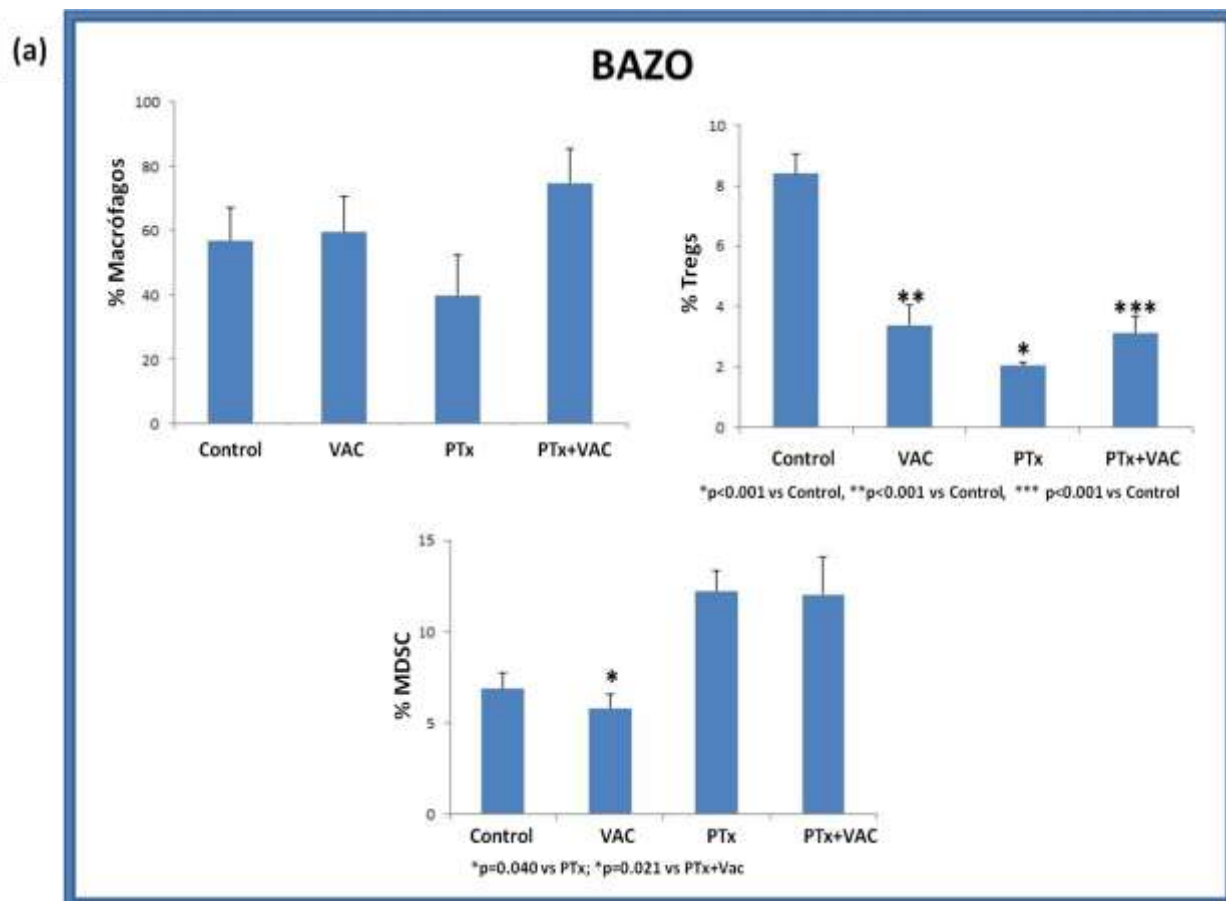


Figura 10. Estudio comparativo de la caracterización de linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, células NK, células MDSC y linfocitos Tregs en sangre periférica. Se realizó el análisis por citometría de flujo de linfocitos Tregs (CD4+CD25+FoxP3+), macrófagos (CD68+), células NK (CD56+), linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y células MDSC (CD11bc+His48+) en sangre de ratas ontlol y tratadas con PTx, Vac y PTx+Vac. Los resultados se expresan como la media +/- DE. Se utilizaron 7 ratas por grupo de tratamiento.

Cuantificación de las distintas subpoblaciones celulares presentes en bazo

Se realizó el estudio comparativo de la caracterización de linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, células NK, células MDSC y linfocitos Tregs en bazo, para determinar si los tratamientos PTx, Vac y PTx+Vac tiene efecto sobre la respuesta inmune anti- y pro-tumoral en las ratas implantadas con células de glioma RG2 intracerebral. En la **Figura 11 (a y b)** se observa que el tratamiento con PTx induce una disminución en el número de linfocitos Tregs y un incremento en las células MDSC. En el tratamiento con vacunación se observa una disminución en el número de linfocitos Tregs, mientras que no se aprecian cambios en las otras subpoblaciones inmunológicas. En el grupo PTx+Vac se observa una disminución en el número de linfocitos T CD4+ y de linfocitos Tregs, así como un incremento en la subpoblación de células MDSC.

Figura 11



(b)

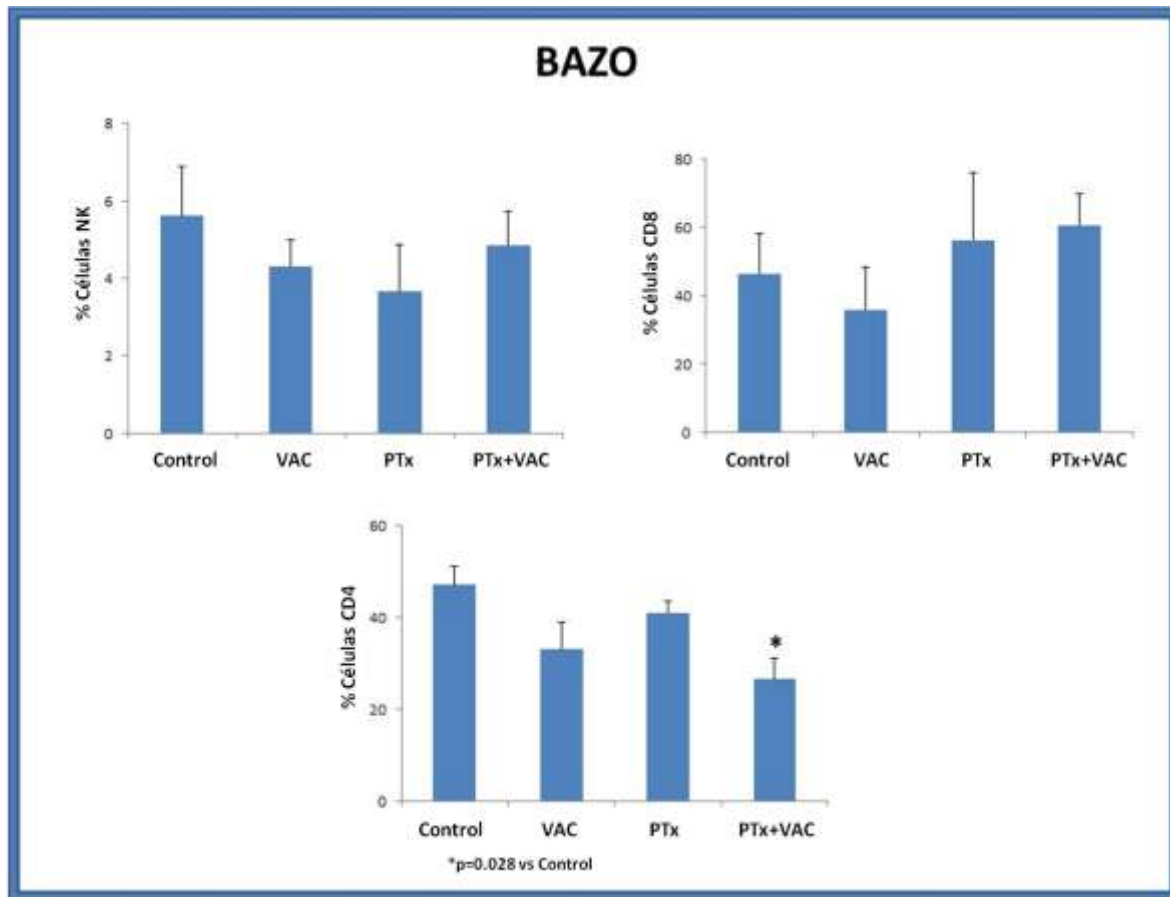
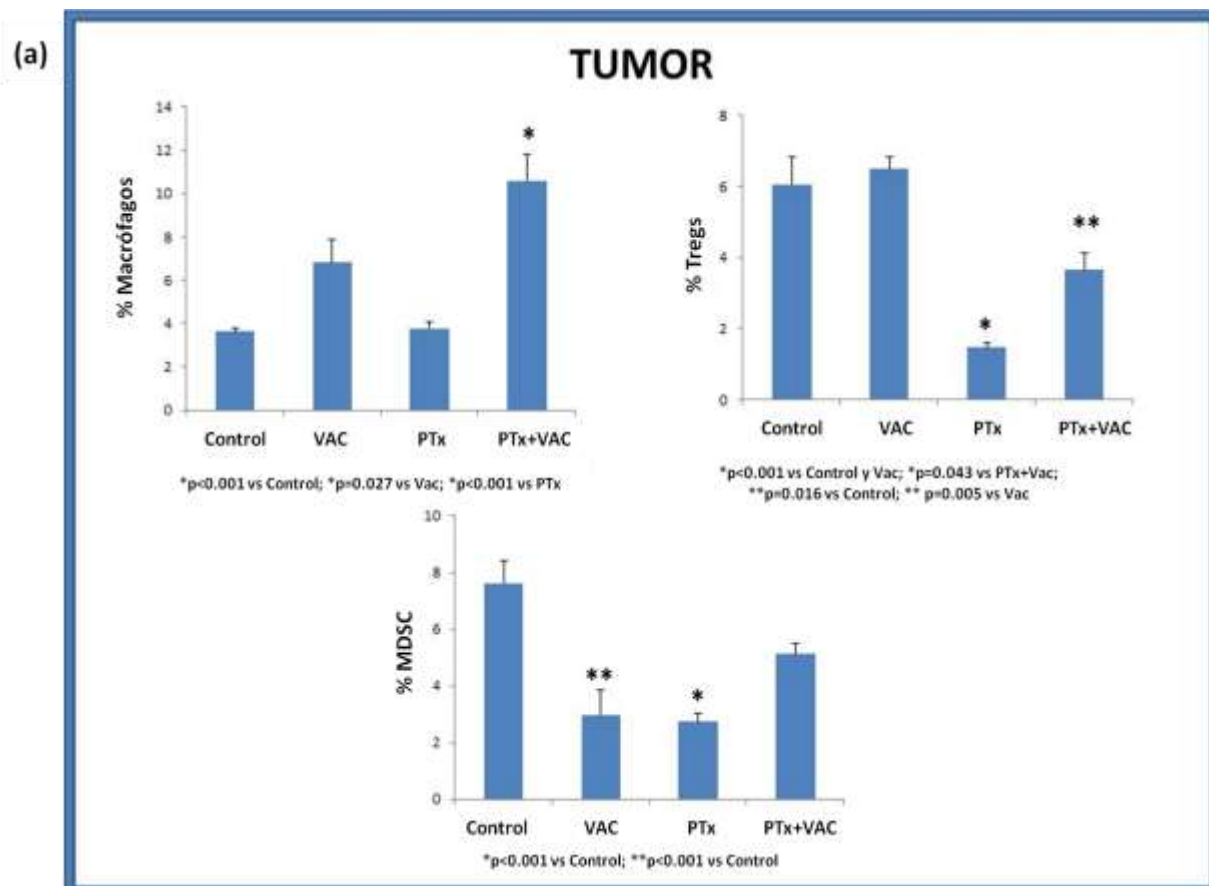


Figura 11. Estudio comparativo de la caracterización linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, células NK, células MDSC y linfocitos Tregs en bazo. Se realizó el análisis por citometría de flujo de linfocitos Tregs (CD4+CD25+FoxP3+), macrófagos (CD68+), células NK (CD56+), linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y células MDSC (CD11bc+His48+) en bazo de ratas Control y tratadas con PTx, Vac y PTx+Vac. Los resultados se expresan como la media +/- DE. Se utilizaron 7 ratas por grupo de tratamiento.

Cuantificación de las distintas subpoblaciones celulares presentes en tumor

Para determinar si los tratamientos PTx, Vac y PTx+Vac tiene efecto sobre el infiltrado inmune tumoral en las ratas implantadas con células de glioma RG2 intracerebral. Se muestran análisis de las subpoblaciones de linfocitos Tregs (CD4+CD25+FoxP3+), macrófagos (CD68+), células NK (CD56+), linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y células MDSC (CD11bc+His48+) presentes en el tumor de las ratas sometidas a los tratamientos descritos. En la **Figura 12 (a y b)** se observa que en el tratamiento con PTx hay una disminución de linfocitos Tregs y de células MDSC, mientras que incrementa el número de linfocitos T CD8+ y células NK. En el tratamiento de vacunación se observa una disminución en el número de células MDSC, mientras que se observa un incremento en los macrófagos y las células NK. En el grupo PTx+Vac se observa un incremento en los macrófagos y una disminución en el número de linfocitos Tregs y células MDSC.

Figura 12



(b)

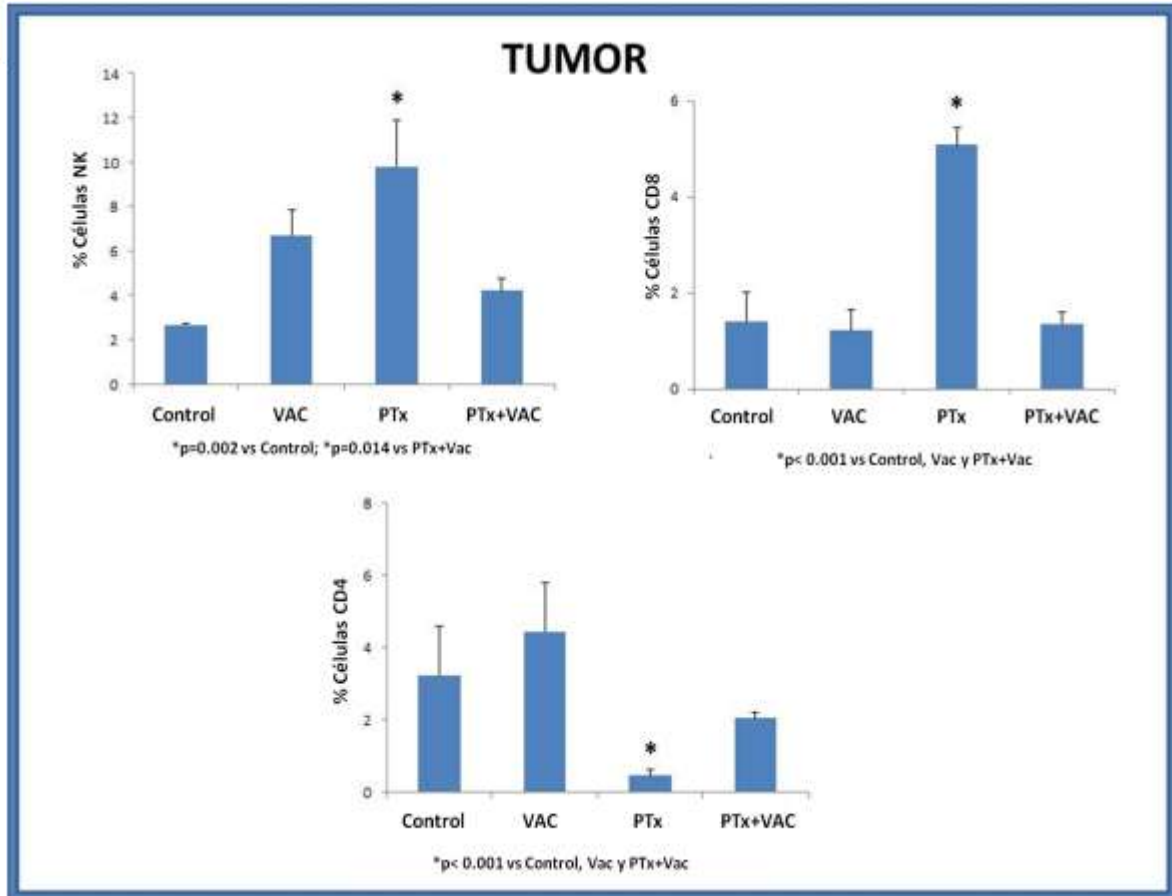


Figura 12. Estudio comparativo de la caracterización del infiltrado inmune tumoral de linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, células NK, MDSC y linfocitos Tregs. Se realizó el análisis por citometría de flujo de linfocitos Tregs (CD4+CD25+FoxP3+), macrófagos (CD68+), células NK (CD56+), linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y células MDSC (CD11bc+His48+) en tumor de ratas Control y tratadas con PTx, Vac y PTx+Vac. Los resultados se expresan como la media +/- DE. Se utilizaron 7 ratas por grupo de tratamiento.

DISCUSIÓN

A pesar de las múltiples modalidades de tratamiento para los gliomas, el pronóstico continua siendo desfavorable. Actualmente, la TMZ es considerada el fármaco más efectivo en el tratamiento del GBM; sin embargo, su efectividad es limitada frecuentemente por la recurrencia tumoral y la quimioresistencia a la TMZ. Debido a la insatisfactoria respuesta del tratamiento convencional contra el GBM, evaluamos el tratamiento con PTx ó en combinación con el agente alquilante, TMZ.

Los resultados muestran que la viabilidad de las células RG2 disminuyó en los grupos tratados con TMZ , PTx y en la combinación de tratamiento TMZ+PTx. Cuando se analizó la inducción de apoptosis, se observa un 20% de células apoptóticas en el grupo tratado con TMZ y PTx. Por otra parte, no se encontraron cambios en el ciclo celular con los diferentes tratamientos. Estos datos correlacionan con los reportados por (Sato, Kurose et al. 2009), donde no observan cambios significativos tanto en apoptosis como en ciclo celular en la línea de glioma T98G tratadas con TMZ. Similarmente, (Carmo, Carvalheiro et al. 2011) encontraron que la expresión de LC3, una proteína del proceso autofágico, estaba incrementada y sólo un reducido porcentaje de células se encontraban en apoptosis en células de glioma U-118 tratadas con TMZ. Controversialmente, (Hirose, Berger et al. 2001) reportan que células de glioma tratadas con TMZ, muestran arresto en el ciclo celular en G2/M y bajo nivel de apoptosis. Otros estudios han propuesto que la inducción del arresto en G2/M en células de glioma ocurre de manera dosis dependiente (Kanzawa, Germano et al. 2004). La hipermetilación del promotor de MGMT reduce la habilidad de la TMZ para inducir apoptosis. De manera similar, nosotros previamente reportamos que el tratamiento de PTx es capaz de disminuir la viabilidad celular e inducir apoptosis en el modelo de glioma C6 (Orozco-Morales, Sanchez-Garcia et al. 2012).

Debido al bajo nivel de inducción de apoptosis, determinamos la inducción de autofagia en las células de glioma RG2 tratadas con TMZ y PTx; además, analizamos los niveles de expresión de LC3 I, II, Beclina-1 y la formación de AVO's después del tratamiento con 3-MA. Nosotros encontramos que el tratamiento con TMZ y PTx

inducen autofagia, caracterizada por altos niveles de la proteína autofágica, beclina-1, así como el incremento en la expresión de LC3-II. Notablemente, este efecto fue incrementado con la combinación de tratamientos TMZ+PTx. Además, con el tratamiento con el inhibidor de autofagia 3-MA (3-metil adenina) , encontramos una disminución en el número de vesículas autofágicas y la formación del autofagosoma, en los grupos tratados con TMZ, PTx, TMZ+PTx. Aún no ha sido elucidado completamente el mecanismo de acción de TMZ así como las vías de escape de las células de glioma a la muerte celular. Sin embargo, se ha propuesto que la TMZ es capaz de inducir autofagia, y dependiendo del contexto celular, puede promover la supervivencia ó inducir la muerte celular (Kanzawa, Bedwell et al. 2003, Thorburn 2008). En el contexto de los tumores cerebrales, niveles citoplásmicos de la proteína beclina-1 y el mRNA estaban disminuidos en comparación con el astrocitoma de bajo grado y tejido cerebral normal (Miracco, Cosci et al. 2007). Adicionalmente, altos niveles citoplásmicos de beclina-1 han mostrado una correlación positiva con la supervivencia de los pacientes, mientras que bajos niveles de expresión correlacionan con un incremento en la proliferación celular y disminución de la apoptosis. Se han descrito, bajos niveles de las proteínas beclina-1 y LC3B-II en gliomas de alto grado, sugiriendo que una disminuida actividad autofágica puede contribuir en la progresión de los tumores astrocíticos (Huang, Bai et al. 2010).

Los estudios *in vivo* se realizaron para determinar si los tratamientos con TMZ, PTx ó TMZ+PTx podrían incrementar la supervivencia de la ratas implantadas con células de glioma RG2. Los resultados muestran un incremento significativo en la supervivencia con los diferentes tratamientos; sin embargo, la combinación de tratamientos TMZ+PTx mostró un mayor incremento comparado con los tratamientos individuales. Por otra parte, diversos estudios demuestran que la vacunación con antígenos tumorales incrementa la respuesta inmune (Mahaley, Bigner et al. 1983, Sampson, Archer et al. 1996, Iwadate, Yamaura et al. 2003, Reardon, Wucherpfennig et al. 2013). Se evaluó si la vacunación con células de glioma irradiadas en combinación con PTx podría incrementar la sobrevida, observando un incremento significativo en la sobrevida sólo en los tratamientos individuales (PTx y vacunación), mientras que la combinación de PTx con vacunación no mostró resultados favorables.

Se ha reportado que la toxina pertussis tiene un efecto selectivo inhibiendo a los linfocitos Tregs (Cassan, Piaggio et al. 2006, Chen, Howard et al. 2007), lo cual también es observado en la combinación de tratamientos, sin embargo consideramos que la combinación no resulta efectiva debido a que la PTx podría inhibir migración linfocitaria de manera inespecífica. Al evaluar las poblaciones infiltrantes de tumor, se observó que el tratamiento con PTx incrementa el número de linfocitos T CD8+ y células NK, mientras que disminuye el número de linfocitos Tregs y células MDSC; mientras que la vacunación disminuye las células MDSC e incrementa macrófagos infiltrantes de tumor y células NK.

Nuestro grupo, previamente demostró que PTx reduce hasta en un 77% el volumen tumoral en un modelo subcutáneo de glioma. Además, induce de manera selectiva la apoptosis de los linfocitos Tregs y disminuye el número de macrófagos infiltrantes de tumor (Orozco-Morales, Sanchez-Garcia et al. 2012). Grandes cantidades de linfocitos Tregs están presentes en sangre de pacientes de una variedad de neoplasias, estas células tienen un importante papel en suprimir la inmunidad antitumoral (Woo, Chu et al. 2001, Liyanage, Moore et al. 2002, Ichihara, Kono et al. 2003, Curiel, Coukos et al. 2004). Se ha descrito que pacientes con glioma maligno tiene un incremento en la población de linfocitos Tregs en sangre periférica y en el tumor, tal incremento de los linfocitos Tregs en sangre periférica correlaciona con alterada respuesta proliferativa de los linfocitos T y la inducción de una respuesta Th2 (Fecci, Mitchell et al. 2006). Debido a la relevante participación de los linfocitos Tregs en la respuesta inmune, su modulación podría mejorar la respuesta inmune contra las células de glioma.

Es posible que el efecto dual de PTx sobre la modulación de la respuesta inmune y la inducción de autofagia produzca un incremento en la sobrevida de ratas implantadas intracranialmente con células de glioma RG2. Nosotros atribuimos este efecto a la modulación producida por PTx, además del efecto citotóxico y autofagia inducido por TMZ. Adicionalmente, PTx ejerce efectos pleiotrópicos sobre el sistema inmune, y tiene un papel importante en la activación del receptor tipo Toll 4 (TLR4). Recientemente, se ha mostrado que el TLR4 actúa como un sensor ambiental para la

autofagia, datos recientes han revelado que la regulación de TLR4 en líneas celulares de glioma tiene un importante papel en la respuesta autofágica, progresión tumoral y quimioresistencia(Waltz, Carchman et al. 2011, Tewari, Choudhury et al. 2012). Es posible que PTx cause autofagia irreversible activando la muerte celular por TLR4, incrementando la eficacia de la TMZ (Ogier-Denis and Codogno 2003, Marino and Lopez-Otin 2004). Además, PTx es frecuentemente usada en estudios inmunológicos para potenciar enfermedades autoinmunes en modelos animales experimentales (Locht, Coutte et al. 2011). PTx induce permeabilidad de la barrera hematoencefálica a través de las vías PKC y PI3 cinasa (Bruckener, el Baya et al. 2003). Es posible que los múltiples efectos de PTx sobre el sistema inmune, inducción de autofagia y permeabilización de la barrera hematoencefálica, tiene como consecuencia un incremento de la cantidad de TMZ en el tumor cerebral.

El presente trabajo demostró que la PTx ejerce diversos efectos moduladores del sistema inmune. El esquema de administración aquí reportado favorece la modulación local del microambiente tumoral. Dada la alta posibilidad de inducir la formación de anticuerpos neutralizantes en pacientes vacunados previamente con PTx, al utilizar un esquema de tratamiento multidosis; el esquema aquí propuesto presenta la ventaja de producir efectos duales de la PTx sobre la inducción de autofagia y modulación del sistema inmune con solo dos administraciones. Por lo que existiría una remota posibilidad de bloqueo de la PTx por anticuerpos neutralizantes, ya que se requieren 28 días para tener títulos detectables de anticuerpos neutralizantes en personas previamente vacunadas que recibieron refuerzos de la vacuna acelular de PTx (Rieber, Graf et al. 2008).Existe la posibilidad de mejorar el esquema de tratamiento aquí planteado, aumentando una dosificación local (intratumoral) (Debinski and Tatter 2009); sin embargo, se requieren mayores estudios para explorar esta posibilidad.

CONCLUSIONES

*El tratamiento con la toxina pertussis induce apoptosis alrededor del 16% en la línea celular de glioma RG2, induce autofagia *in vitro* e incrementa la supervivencia en un modelo de glioma RG2.

*El tratamiento concomitante de PTx con TMZ incrementa la inducción de autofagia y presenta un mayor incremento en la sobrevida en comparación con los tratamientos individuales.

*El tratamiento PTx y vacunación muestran un incremento en la sobrevida; sin embargo, la combinación no resulta efectiva.

*La toxina pertussis incrementa el número de linfocitos T CD8+ y células NK, mientras que disminuye el número de linfocitos Tregs y células MDSC en el tumor. La vacunación con células tumorales irradiadas disminuye las células MDSC e incrementa las células NK en el tumor.

Debido al efecto dual de la toxina pertussis sobre la modulación de la respuesta inmune y la inducción de autofagia, ésta podría ser una alternativa terapéutica en el tratamiento de tumores cerebrales.

PERSPECTIVAS

*Evaluar la citotoxicidad de la PTx detoxificada en el modelo de glioma RG2.

*Evaluar la PTx en combinación con otros esquemas de tratamiento, tales como radioterapia ó utilizando anticuerpos monoclonales, así como otras vías de administración.

*Incrementar la citotoxicidad inducida por PTx y TMZ mediante la inhibición de autofagia.

PRODUCTIVIDAD

PUBLICACIONES

ARTICULOS

- **Magaña Maldonado R.**, Manoutcharian K., Hernández Pedro N.Y., Rangel López E., Pérez de la Cruz V., Rodríguez Balderas C., Sotelo J., Pineda B. (2014). Concomitant treatment with pertussis toxin plus temozolomide increases the survival of rats bearing intracerebral RG2 glioma. J Cancer Res Clin Oncol, 140: 291-301
- Hernández Pedro N.Y., Rangel López E., **Magaña Maldonado R.**, Pérez de la Cruz V., del Angel A.S., Pineda B., Sotelo J. (2013). Application of nanoparticles on diagnosis and therapy in gliomas. Biomed Res Int. 2013: 351031

CAPITULOS DE LIBRO

- Leon V. Berhardt. Advances in Medicine and Biology. Chapter 2: "Pertussis: Symptoms, Prevention and Treatment" (Authors: **Roxana Magaña**, Norma Hernandez-Pedro, Edgar Rangel, Karen Manoutcharian, Benjamin Pineda, Julio Sotelo). Novapublisher; Volume 55 (pp.41-68); September 2012. ISBN: 978-1-62257-144-4
- David C. Adamson. Gliomas: Classification, Symptoms, Treatment and Prognosis. Chapter 1:"Classification, Histology, Genomic Alterations and New Therapeutic Concepts"(Authors: Benjamín Pineda, Norma Hernández-Pedro, **Roxana Magaña Maldonado**, Gustavo Vargas Félix, Alelí Salazar Ramiro, Verónica Pérez de la Cruz y Julio Sotelo). Nova Science Publisher; (pp.1-30. 2014. ISBN: 978-1-63117-875-7

- David Andrew Phoenix and Waqar Ahmed. Nanobiotechnology. Chapter 3:"Carbon nanotubes: A new biotechnological tool on the diagnosis and treatment of cancer"(Authors: Benjamín Pineda, Norma Y. Hernández-Pedro, **Roxana Magaña Maldonado** y Julio Sotelo). One Central Press. 2014. ISBN: 978-1-910086-03-2

ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN

- Estancia Profesional en el Laboratorio de Células Madre de Glioma del Dr. Alfredo Quiñones Hinojosa, participando en el proyecto" Papel del co-transportador NKCC1 en la migración celular del GBM". Departamento de Neurocirugía y Oncología. Escuela de Medicina. Universidad Johns Hopkins. Baltimore, Maryland, USA. Diciembre-Mayo 2014
- Asistencia al curso: "In vivo preclinical imaging: an introductory workshop". Marzo 11-13, 2014. Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA

CONGRESOS Y RESÚMENES

- Schiapparelli P, **Magaña-Maldonado R**, Hamilla S, Martinez-Gutierrez JC, Sibener L, Aranda-Espinoza H, Quinones-Hinojosa A." NKCC1 regulates migration capacity of glioblastoma tumor initiating cells by modulating actin cytoskeleton through small RHO GTPases". 8th Annual Symposium Institute for NanoBioTechnology (INBT) "Stem Cell Science and Engineering: State of the Art" Johns Hopkins School of Medicine. Mayo(2014) Baltimore, MD. USA
- **Roxana Magaña Maldonado**, Norma Hernández-Pedro, Edgar Rangel, Laura Sánchez Chapul, Oscar René Marrufo Meléndez, Jesús Taboada Barajas, José Manuel Lárraga Gutiérrez, Sergio Moreno Jiménez, Karen Manoutcharian

Airapetian, Benjamín Pineda Olvera, Julio Sotelo Morales. Efecto de la toxina pertussis y vacunación con células tumorales sobre la modulación de la respuesta inmune en un modelo de glioma RG2. . XXVIII Reunión Anual de Investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. (2013)

- **Roxana Magaña**, Norma Hernández-Pedro, Edgar Rangel, Mario Orozco-Morales, Cristina Trejo-Solís, Benjamín Pineda, Julio Sotelo. Tratamiento con la toxina pertussis y temozolamida induce autofagia en células de glioma RG2. XXVII Reunión Anual de Investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. (2012)

DISTINCIONES

- Primer lugar en la modalidad básica de la XXVII Reunión Anual de Investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.(2012)

REFERENCIAS

Alt, C., M. Laschinger and B. Engelhardt (2002). "Functional expression of the lymphoid chemokines CCL19 (ELC) and CCL 21 (SLC) at the blood-brain barrier suggests their involvement in G-protein-dependent lymphocyte recruitment into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis." Eur J Immunol **32**(8): 2133-2144.

Backlund, P. S., Jr., B. D. Meade, C. R. Manclark, G. L. Cantoni and R. R. Aksamit (1985). "Pertussis toxin inhibition of chemotaxis and the ADP-ribosylation of a membrane protein in a human-mouse hybrid cell line." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(9): 2637-2641.

Ben-Shoshan, J., S. Maysel-Auslender, A. Mor, G. Keren and J. George (2008). "Hypoxia controls CD4+CD25+ regulatory T-cell homeostasis via hypoxia-inducible factor-1alpha." Eur J Immunol **38**(9): 2412-2418.

Bhondeley, M. K., R. D. Mehra, N. K. Mehra, A. K. Mohapatra, P. N. Tandon, S. Roy and V. Bijlani (1988). "Imbalances in T cell subpopulations in human gliomas." J Neurosurg **68**(4): 589-593.

Biernat, W., Y. Tohma, Y. Yonekawa, P. Kleihues and H. Ohgaki (1997). "Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas." Acta Neuropathol **94**(4): 303-309.

Bigner, S. H., M. R. Matthews, B. K. Rasheed, R. N. Wiltshire, H. S. Friedman, A. H. Friedman, T. T. Stenzel, D. M. Dawes, R. E. McLendon and D. D. Bigner (1999). "Molecular genetic aspects of oligodendrogliomas including analysis by comparative genomic hybridization." Am J Pathol **155**(2): 375-386.

Black, K. L., K. Chen, D. P. Becker and J. E. Merrill (1992). "Inflammatory leukocytes associated with increased immunosuppression by glioblastoma." J Neurosurg **77**(1): 120-126.

Bokoch, G. M., T. Katada, J. K. Northup, E. L. Hewlett and A. G. Gilman (1983). "Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet activating protein." J Biol Chem **258**(4): 2072-2075.

Brito, G. A., M. H. Souza, A. A. Melo-Filho, E. L. Hewlett, A. A. Lima, C. A. Flores and R. A. Ribeiro (1997). "Role of pertussis toxin A subunit in neutrophil migration and vascular permeability." Infect Immun **65**(3): 1114-1118.

Bruckener, K. E., A. el Baya, H. J. Galla and M. A. Schmidt (2003). "Permeabilization in a cerebral endothelial barrier model by pertussis toxin involves the PKC effector

pathway and is abolished by elevated levels of cAMP." J Cell Sci **116**(Pt 9): 1837-1846.

Buckner, J. C. (2003). "Factors influencing survival in high-grade gliomas." Semin Oncol **30**(6 Suppl 19): 10-14.

Burns, D. L. (1988). "Subunit structure and enzymic activity of pertussis toxin." Microbiol Sci **5**(9): 285-287.

Burns, D. L. and C. R. Manclark (1986). "Adenine nucleotides promote dissociation of pertussis toxin subunits." J Biol Chem **261**(9): 4324-4327.

Carmeliet, P., Y. Dor, J. M. Herbert, D. Fukumura, K. Brusselmans, M. Dewerchin, M. Neeman, F. Bono, R. Abramovitch, P. Maxwell, C. J. Koch, P. Ratcliffe, L. Moons, R. K. Jain, D. Collen and E. Keshert (1998). "Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis." Nature **394**(6692): 485-490.

Carmo, A., H. Carneiro, I. Crespo, I. Nunes and M. C. Lopes (2011). "Effect of temozolomide on the U-118 glioma cell line." Oncol Lett **2**(6): 1165-1170.

Cassan, C., E. Piaggio, J. P. Zappulla, L. T. Mars, N. Couturier, F. Bucciarelli, S. Desbois, J. Bauer, D. Gonzalez-Dunia and R. S. Liblau (2006). "Pertussis toxin reduces the number of splenic Foxp3+ regulatory T cells." J Immunol **177**(3): 1552-1560.

Charles, N. A., E. C. Holland, R. Gilbertson, R. Glass and H. Kettenmann (2012). "The brain tumor microenvironment." Glia **60**(3): 502-514.

Chen, X., O. M. Howard and J. J. Oppenheim (2007). "Pertussis toxin by inducing IL-6 promotes the generation of IL-17-producing CD4 cells." J Immunol **178**(10): 6123-6129.

Clausen, C., J. Munoz and R. K. Bergman (1968). "Lymphocytosis and histamine sensitization of mice by fractions from Bordetella pertussis." J Bacteriol **96**(5): 1484-1487.

Curiel, T. J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J. R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M. L. Disis, K. L. Knutson, L. Chen and W. Zou (2004). "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." Nat Med **10**(9): 942-949.

Curtin, J. F., M. Candolfi, T. M. Fakhouri, C. Liu, A. Alden, M. Edwards, P. R. Lowenstein and M. G. Castro (2008). "Treg depletion inhibits efficacy of cancer immunotherapy: implications for clinical trials." PLoS One **3**(4): e1983.

Cyster, J. G. and C. C. Goodnow (1995). "Pertussis toxin inhibits migration of B and T lymphocytes into splenic white pulp cords." J Exp Med **182**(2): 581-586.

Darabi, K., A. Y. Karulin, B. O. Boehm, H. H. Hofstetter, Z. Fabry, J. C. LaManna, J. C. Chavez, M. Tary-Lehmann and P. V. Lehmann (2004). "The third signal in T cell-mediated autoimmune disease?" J Immunol **173**(1): 92-99.

DeAngelis, L. M. (2001). "Brain tumors." N Engl J Med **344**(2): 114-123.

Debinski, W. and S. B. Tatter (2009). "Convection-enhanced delivery for the treatment of brain tumors." Expert Rev Neurother **9**(10): 1519-1527.

Dolan, M. E. and A. E. Pegg (1997). "O6-benzylguanine and its role in chemotherapy." Clin Cancer Res **3**(6): 837-847.

Fecci, P. E., D. A. Mitchell, J. F. Whitesides, W. Xie, A. H. Friedman, G. E. Archer, J. E. Herndon, 2nd, D. D. Bigner, G. Dranoff and J. H. Sampson (2006). "Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma." Cancer Res **66**(6): 3294-3302.

Filipazzi, P., R. Valenti, V. Huber, L. Pilla, P. Canese, M. Iero, C. Castelli, L. Mariani, G. Parmiani and L. Rivoltini (2007). "Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine." J Clin Oncol **25**(18): 2546-2553.

Fooksman, D. R., S. Vardhana, G. Vasiliver-Shamis, J. Liese, D. A. Blair, J. Waite, C. Sacristan, G. D. Victora, A. Zanin-Zhorov and M. L. Dustin (2010). "Functional anatomy of T cell activation and synapse formation." Annu Rev Immunol **28**: 79-105.

Garcia-Lora, A., I. Algarra and F. Garrido (2003). "MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape." J Cell Physiol **195**(3): 346-355.

Garcia-Sainz, J. A. (1981). "Decreased sensitivity to alpha 2 adrenergic amines, adenosine and prostaglandins in white fat cells from hamsters treated with pertussis vaccine." FEBS Lett **126**(2): 306-308.

Garcia-Sainz, J. A., M. T. Romero-Avila, A. Ruiz-Arriaga, J. Ruiz-Puente, C. Agundis, V. Ortiz and A. Isibasi (1992). "Characterization and detoxification of an easily prepared acellular pertussis vaccine. Antigenic role of the A protomer of pertussis toxin." Vaccine **10**(5): 341-344.

Gerson, S. L. (2004). "MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics." Nat Rev Cancer **4**(4): 296-307.

Gravendeel, L. A., M. C. Kouwenhoven, O. Gevaert, J. J. de Rooi, A. P. Stubbs, J. E. Duijm, A. Daemen, F. E. Bleeker, L. B. Bralten, N. K. Kloosterhof, B. De Moor, P. H.

Eilers, P. J. van der Spek, J. M. Kros, P. A. Sillevis Smitt, M. J. van den Bent and P. J. French (2009). "Intrinsic gene expression profiles of gliomas are a better predictor of survival than histology." Cancer Res **69**(23): 9065-9072.

Gray, M. J., J. Zhang, L. M. Ellis, G. L. Semenza, D. B. Evans, S. S. Watowich and G. E. Gallick (2005). "HIF-1alpha, STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas." Oncogene **24**(19): 3110-3120.

Griffin, C. A., P. Burger, L. Morsberger, R. Yonescu, S. Swierczynski, J. D. Weingart and K. M. Murphy (2006). "Identification of der(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss." J Neuropathol Exp Neurol **65**(10): 988-994.

Guermontprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery and S. Amigorena (2002). "Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells." Annu Rev Immunol **20**: 621-667.

Hazeki, O. and M. Ui (1981). "Modification by islet-activating protein of receptor-mediated regulation of cyclic AMP accumulation in isolated rat heart cells." J Biol Chem **256**(6): 2856-2862.

Hazes, B., A. Boodhoo, S. A. Cockle and R. J. Read (1996). "Crystal structure of the pertussis toxin-ATP complex: a molecular sensor." J Mol Biol **258**(4): 661-671.

Hazes, B. and R. J. Read (1997). "Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subvert the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells." Biochemistry **36**(37): 11051-11054.

He, J., S. Gurunathan, A. Iwasaki, B. Ash-Shaheed and B. L. Kelsall (2000). "Primary role for Gi protein signaling in the regulation of interleukin 12 production and the induction of T helper cell type 1 responses." J Exp Med **191**(9): 1605-1610.

Hermanson, M., K. Funa, J. Koopmann, D. Maintz, A. Waha, B. Westermark, C. H. Heldin, O. D. Wiestler, D. N. Louis, A. von Deimling and M. Nister (1996). "Association of loss of heterozygosity on chromosome 17p with high platelet-derived growth factor alpha receptor expression in human malignant gliomas." Cancer Res **56**(1): 164-171.

Hirose, Y., M. S. Berger and R. O. Pieper (2001). "p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells." Cancer Res **61**(5): 1957-1963.

Hofstetter, H. H., C. L. Shive and T. G. Forsthuber (2002). "Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells." J Immunol **169**(1): 117-125.

Hotta, T., Y. Saito, H. Fujita, T. Mikami, K. Kurisu, K. Kiya, T. Uozumi, G. Isowa, K. Ishizaki and M. Ikenaga (1994). "O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity of human malignant glioma and its clinical implications." J Neurooncol **21**(2): 135-140.

Hou, W., Y. Wu, S. Sun, M. Shi, Y. Sun, C. Yang, G. Pei, Y. Gu, C. Zhong and B. Sun (2003). "Pertussis toxin enhances Th1 responses by stimulation of dendritic cells." J Immunol **170**(4): 1728-1736.

Houslay, M. D. and G. Milligan (1997). "Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity." Trends Biochem Sci **22**(6): 217-224.

Hsia, J. A., S. C. Tsai, R. Adamik, D. A. Yost, E. L. Hewlett and J. Moss (1985). "Amino acid-specific ADP-ribosylation. Sensitivity to hydroxylamine of [cysteine(ADP-ribose)]protein and [arginine(ADP-ribose)]protein linkages." J Biol Chem **260**(30): 16187-16191.

Huang, X., H. M. Bai, L. Chen, B. Li and Y. C. Lu (2010). "Reduced expression of LC3B-II and Beclin 1 in glioblastoma multiforme indicates a down-regulated autophagic capacity that relates to the progression of astrocytic tumors." J Clin Neurosci **17**(12): 1515-1519.

Ichihara, F., K. Kono, A. Takahashi, H. Kawaida, H. Sugai and H. Fujii (2003). "Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers." Clin Cancer Res **9**(12): 4404-4408.

Iwadate, Y., A. Yamaura, S. Sakiyama, Y. Sato and M. Tagawa (2003). "Glioma-specific cytotoxic T cells can be effectively induced by subcutaneous vaccination of irradiated wild-type tumor cells without artificial cytokine production." Int J Oncol **23**(2): 483-488.

Jenkins, R. B., H. Blair, K. V. Ballman, C. Giannini, R. M. Arusell, M. Law, H. Flynn, S. Passe, S. Felten, P. D. Brown, E. G. Shaw and J. C. Buckner (2006). "A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma." Cancer Res **66**(20): 9852-9861.

Jensen, R. L. (2009). "Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogression, and as a therapeutic target." J Neurooncol **92**(3): 317-335.

Jia, W., C. Jackson-Cook and M. R. Graf (2010). "Tumor-infiltrating, myeloid-derived suppressor cells inhibit T cell activity by nitric oxide production in an intracranial rat glioma + vaccination model." J Neuroimmunol **223**(1-2): 20-30.

Jung, J. E., H. G. Lee, I. H. Cho, D. H. Chung, S. H. Yoon, Y. M. Yang, J. W. Lee, S. Choi, J. W. Park, S. K. Ye and M. H. Chung (2005). "STAT3 is a potential modulator of

HIF-1-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells." FASEB J **19**(10): 1296-1298.

Kabeya, Y., N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi and T. Yoshimori (2000). "LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing." EMBO J **19**(21): 5720-5728.

Kanzawa, T., J. Bedwell, Y. Kondo, S. Kondo and I. M. Germano (2003). "Inhibition of DNA repair for sensitizing resistant glioma cells to temozolomide." J Neurosurg **99**(6): 1047-1052.

Kanzawa, T., I. M. Germano, T. Komata, H. Ito, Y. Kondo and S. Kondo (2004). "Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells." Cell Death Differ **11**(4): 448-457.

Katada, T., M. Tamura and M. Ui (1983). "The A protomer of islet-activating protein, pertussis toxin, as an active peptide catalyzing ADP-ribosylation of a membrane protein." Arch Biochem Biophys **224**(1): 290-298.

Katada, T. and M. Ui (1980). "Slow interaction of islet-activating protein with pancreatic islets during primary culture to cause reversal of alpha-adrenergic inhibition of insulin secretion." J Biol Chem **255**(20): 9580-9588.

Katada, T. and M. Ui (1982). "Direct modification of the membrane adenylate cyclase system by islet-activating protein due to ADP-ribosylation of a membrane protein." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(10): 3129-3133.

Kiefer, R., M. L. Supler, K. V. Toyka and W. J. Streit (1994). "In situ detection of transforming growth factor-beta mRNA in experimental rat glioma and reactive glial cells." Neurosci Lett **166**(2): 161-164.

Kim, J. and D. J. Klionsky (2000). "Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells." Annu Rev Biochem **69**: 303-342.

Ko, J. S., A. H. Zea, B. I. Rini, J. L. Ireland, P. Elson, P. Cohen, A. Golshayan, P. A. Rayman, L. Wood, J. Garcia, R. Dreicer, R. Bukowski and J. H. Finke (2009). "Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients." Clin Cancer Res **15**(6): 2148-2157.

Kobayashi, N., N. Allen, N. R. Clendenon and L. W. Ko (1980). "An improved rat brain-tumor model." J Neurosurg **53**(6): 808-815.

Kroemer, G., L. Galluzzi, O. Kepp and L. Zitvogel (2013). "Immunogenic cell death in cancer therapy." Annu Rev Immunol **31**: 51-72.

Kurose, H., T. Katada, T. Amano and M. Ui (1983). "Specific uncoupling by islet-activating protein, pertussis toxin, of negative signal transduction via alpha-adrenergic, cholinergic, and opiate receptors in neuroblastoma x glioma hybrid cells." J Biol Chem **258**(8): 4870-4875.

Li, H. and W. S. Wong (2001). "Pertussis toxin activates tyrosine kinase signaling cascade in myelomonocytic cells: a mechanism for cell adhesion." Biochem Biophys Res Commun **283**(5): 1077-1082.

Li, J., C. Yen, D. Liaw, K. Podsypanina, S. Bose, S. I. Wang, J. Puc, C. Miliarensis, L. Rodgers, R. McCombie, S. H. Bigner, B. C. Giovanella, M. Ittmann, B. Tycko, H. Hibshoosh, M. H. Wigler and R. Parsons (1997). "PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer." Science **275**(5308): 1943-1947.

Linthicum, D. S. (1982). "Development of acute autoimmune encephalomyelitis in mice: factors regulating the effector phase of the disease." Immunobiology **162**(3): 211-220.

Linthicum, D. S. and J. A. Frelinger (1982). "Acute autoimmune encephalomyelitis in mice. II. Susceptibility is controlled by the combination of H-2 and histamine sensitization genes." J Exp Med **156**(1): 31-40.

Liyanage, U. K., T. T. Moore, H. G. Joo, Y. Tanaka, V. Herrmann, G. Doherty, J. A. Drebin, S. M. Strasberg, T. J. Eberlein, P. S. Goedegebuure and D. C. Linehan (2002). "Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma." J Immunol **169**(5): 2756-2761.

Locht, C., L. Coutte and N. Mielcarek (2011). "The ins and outs of pertussis toxin." FEBS J **278**(23): 4668-4682.

Lopez-Gonzalez, M. A. and J. Sotelo (2000). "Brain tumors in Mexico: characteristics and prognosis of glioblastoma." Surg Neurol **53**(2): 157-162.

Louis, D. N., H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvet, B. W. Scheithauer and P. Kleihues (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." Acta Neuropathol **114**(2): 97-109.

Mahaley, M. S., Jr., D. D. Bigner, L. F. Dudka, P. R. Wilds, D. H. Williams, T. W. Bouldin, J. N. Whitaker and J. M. Bynum (1983). "Immunobiology of primary intracranial tumors. Part 7: Active immunization of patients with anaplastic human glioma cells: a pilot study." J Neurosurg **59**(2): 201-207.

Mangmool, S. and H. Kurose (2011). "G(i/o) protein-dependent and -independent actions of Pertussis Toxin (PTX)." Toxins (Basel) **3**(7): 884-899.

Marino, G. and C. Lopez-Otin (2004). "Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology." Cell Mol Life Sci **61**(12): 1439-1454.

Markovic, D. S., K. Vinnakota, S. Chirasani, M. Synowitz, H. Raguet, K. Stock, M. Sliwa, S. Lehmann, R. Kalin, N. van Rooijen, K. Holmbeck, F. L. Heppner, J. Kiwit, V. Matyash, S. Lehnardt, B. Kaminska, R. Glass and H. Kettenmann (2009). "Gliomas induce and exploit microglial MT1-MMP expression for tumor expansion." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(30): 12530-12535.

Mascart, F., V. Verscheure, A. Malfroot, M. Hainaut, D. Pierard, S. Temerman, A. Peltier, A. S. Debie, J. Levy, G. Del Giudice and C. Locht (2003). "Bordetella pertussis infection in 2-month-old infants promotes type 1 T cell responses." J Immunol **170**(3): 1504-1509.

Mazzoni, A., V. Bronte, A. Visintin, J. H. Spitzer, E. Apolloni, P. Serafini, P. Zanovello and D. M. Segal (2002). "Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism." J Immunol **168**(2): 689-695.

Melien, O., D. Sandnes, E. J. Johansen and T. Christoffersen (2000). "Effects of pertussis toxin on extracellular signal-regulated kinase activation in hepatocytes by hormones and receptor-independent agents: evidence suggesting a stimulatory role of G(i) proteins at a level distal to receptor coupling." J Cell Physiol **184**(1): 27-36.

Mielcarek, N., E. H. Hornquist, B. R. Johansson, C. Locht, S. N. Abraham and J. Holmgren (2001). "Interaction of Bordetella pertussis with mast cells, modulation of cytokine secretion by pertussis toxin." Cell Microbiol **3**(3): 181-188.

Miracco, C., E. Cosci, G. Oliveri, P. Luzi, L. Pacenti, I. Monciatti, S. Mannucci, M. C. De Nisi, M. Toscano, V. Malagnino, S. M. Falzarano, L. Pirtoli and P. Tosi (2007). "Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumours." Int J Oncol **30**(2): 429-436.

Moreno, F. J., I. Mills, J. A. Garcia-Sainz and J. N. Fain (1983). "Effects of pertussis toxin treatment on the metabolism of rat adipocytes." J Biol Chem **258**(18): 10938-10943.

Morimura, T., C. Neuchrist, K. Kitz, H. Budka, O. Scheiner, D. Kraft and H. Lassmann (1990). "Monocyte subpopulations in human gliomas: expression of Fc and complement receptors and correlation with tumor proliferation." Acta Neuropathol **80**(3): 287-294.

Moss, J., S. J. Stanley, P. A. Watkins, D. L. Burns, C. R. Manclark, H. R. Kaslow and E. L. Hewlett (1986). "Stimulation of the thiol-dependent ADP-ribosyltransferase and NAD glycohydrolase activities of Bordetella pertussis toxin by adenine nucleotides, phospholipids, and detergents." Biochemistry **25**(9): 2720-2725.

Munafò, D. B. and M. I. Colombo (2001). "A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation." J Cell Sci **114**(Pt 20): 3619-3629.

Munn, D. H. and A. L. Mellor (2004). "IDO and tolerance to tumors." Trends Mol Med **10**(1): 15-18.

Munoz, J. J., H. Arai, R. K. Bergman and P. L. Sadowski (1981). "Biological activities of crystalline pertussigen from *Bordetella pertussis*." Infect Immun **33**(3): 820-826.

Munoz, J. J., C. C. Bernard and I. R. Mackay (1984). "Elicitation of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice with the aid of pertussigen." Cell Immunol **83**(1): 92-100.

Nencioni, L., M. G. Pizza, G. Volpini, M. T. De Magistris, F. Giovannoni and R. Rappuoli (1991). "Properties of the B oligomer of pertussis toxin." Infect Immun **59**(12): 4732-4734.

Nigro, J. M., S. J. Baker, A. C. Preisinger, J. M. Jessup, R. Hostetter, K. Cleary, S. H. Bigner, N. Davidson, S. Baylin, P. Devilee and et al. (1989). "Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types." Nature **342**(6250): 705-708.

Nishida, M., R. Suda, Y. Nagamatsu, S. Tanabe, N. Onohara, M. Nakaya, Y. Kanaho, T. Shibata, K. Uchida, H. Sumimoto, Y. Sato and H. Kurose (2010). "Pertussis toxin up-regulates angiotensin type 1 receptors through Toll-like receptor 4-mediated Rac activation." J Biol Chem **285**(20): 15268-15277.

O'Reilly, S. M., E. S. Newlands, M. G. Glaser, M. Brampton, J. M. Rice-Edwards, R. D. Illingworth, P. G. Richards, C. Kennard, I. R. Colquhoun, P. Lewis and et al. (1993). "Temozolomide: a new oral cytotoxic chemotherapeutic agent with promising activity against primary brain tumours." Eur J Cancer **29A**(7): 940-942.

Ogier-Denis, E. and P. Codogno (2003). "Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer." Biochim Biophys Acta **1603**(2): 113-128.

Ohgaki, H. and P. Kleihues (2007). "Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma." Am J Pathol **170**(5): 1445-1453.

Omar, A. I. and W. P. Mason (2010). "Temozolomide: The evidence for its therapeutic efficacy in malignant astrocytomas." Core Evid **4**: 93-111.

Orozco-Morales, M., F. J. Sanchez-Garcia, P. Guevara-Salazar, O. Arrieta, N. Y. Hernandez-Pedro, A. Sanchez-Garcia, R. Perez-Madriral, E. Rangel-Lopez, B. Pineda and J. Sotelo (2012). "Adjuvant immunotherapy of C6 glioma in rats with pertussis toxin." J Cancer Res Clin Oncol **138**(1): 23-33.

Ostrom, Q. T., H. Gittleman, P. Farah, A. Ondracek, Y. Chen, Y. Wolinsky, N. E. Stroup, C. Kruchko and J. S. Barnholtz-Sloan (2013). "CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2006-2010." Neuro Oncol **15 Suppl 2**: ii1-ii56.

Papaspyridonos, M., E. McNeill, J. P. de Bono, A. Smith, K. G. Burnand, K. M. Channon and D. R. Greaves (2008). "Galectin-3 is an amplifier of inflammation in atherosclerotic plaque progression through macrophage activation and monocyte chemoattraction." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(3): 433-440.

Pietra, G., R. Mortarini, G. Parmiani and A. Anichini (2001). "Phases of apoptosis of melanoma cells, but not of normal melanocytes, differently affect maturation of myeloid dendritic cells." Cancer Res **61**(22): 8218-8226.

Prins, R. M., G. P. Scott, R. E. Merchant and M. R. Graf (2002). "Irradiated tumor cell vaccine for treatment of an established glioma. II. Expansion of myeloid suppressor cells that promote tumor progression." Cancer Immunol Immunother **51**(4): 190-199.

Reardon, D. A., K. W. Wucherpfennig, G. Freeman, C. J. Wu, E. A. Chiocca, P. Y. Wen, W. T. Curry, Jr., D. A. Mitchell, P. E. Fecci, J. H. Sampson and G. Dranoff (2013). "An update on vaccine therapy and other immunotherapeutic approaches for glioblastoma." Expert Rev Vaccines **12**(6): 597-615.

Rieber, N., A. Graf, B. H. Belohradsky, D. Hartl, S. Urschel, M. Riffelmann, C. H. Wirsing von Konig and J. Liese (2008). "Differences of humoral and cellular immune response to an acellular pertussis booster in adolescents with a whole cell or acellular primary vaccination." Vaccine **26**(52): 6929-6935.

Riemenschneider, M. J. and G. Reifenberger (2009). "Astrocytic tumors." Recent Results Cancer Res **171**: 3-24.

Rodriguez, P. C. and A. C. Ochoa (2008). "Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives." Immunol Rev **222**: 180-191.

Ryan, M., L. McCarthy, R. Rappuoli, B. P. Mahon and K. H. Mills (1998). "Pertussis toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28." Int Immunol **10**(5): 651-662.

Ryu, C. H., W. S. Yoon, K. Y. Park, S. M. Kim, J. Y. Lim, J. S. Woo, C. H. Jeong, Y. Hou and S. S. Jeun (2012). "Valproic acid downregulates the expression of MGMT and sensitizes temozolomide-resistant glioma cells." J Biomed Biotechnol **2012**: 987495.

Sampson, J. H., G. E. Archer, D. M. Ashley, H. E. Fuchs, L. P. Hale, G. Dranoff and D. D. Bigner (1996). "Subcutaneous vaccination with irradiated, cytokine-producing tumor cells stimulates CD8+ cell-mediated immunity against tumors located in the "immunologically privileged" central nervous system." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(19): 10399-10404.

Sato, Y., A. Kurose, A. Ogawa, K. Ogasawara, F. Traganos, Z. Darzynkiewicz and T. Sawai (2009). "Diversity of DNA damage response of astrocytes and glioblastoma cell lines with various p53 status to treatment with etoposide and temozolomide." Cancer Biol Ther **8**(5): 452-457.

Schneider, O. D., A. A. Weiss and W. E. Miller (2007). "Pertussis toxin utilizes proximal components of the T-cell receptor complex to initiate signal transduction events in T cells." Infect Immun **75**(8): 4040-4049.

Shive, C. L., H. Hofstetter, L. Arredondo, C. Shaw and T. G. Forsthuber (2000). "The enhanced antigen-specific production of cytokines induced by pertussis toxin is due to clonal expansion of T cells and not to altered effector functions of long-term memory cells." Eur J Immunol **30**(8): 2422-2431.

Siegel, R., D. Naishadham and A. Jemal (2013). "Cancer statistics, 2013." CA Cancer J Clin **63**(1): 11-30.

Siveen, K. S. and G. Kuttan (2009). "Role of macrophages in tumour progression." Immunol Lett **123**(2): 97-102.

Sonabend, A. M., C. E. Rolle and M. S. Lesniak (2008). "The role of regulatory T cells in malignant glioma." Anticancer Res **28**(2B): 1143-1150.

Stavrou, D., A. P. Anzil, W. Weidenbach and H. Rodt (1977). "Immunofluorescence study of lymphocytic infiltration in gliomas. Identification of T-lymphocytes." J Neurol Sci **33**(1-2): 275-282.

Strnad, C. F. and R. A. Carchman (1987). "Human T lymphocyte mitogenesis in response to the B oligomer of pertussis toxin is associated with an early elevation in cytosolic calcium concentrations." FEBS Lett **225**(1-2): 16-20.

Strojnik, T., R. Kavalari, I. Zajc, E. P. Diamandis, K. Oikonomopoulou and T. T. Lah (2009). "Prognostic impact of CD68 and kallikrein 6 in human glioma." Anticancer Res **29**(8): 3269-3279.

Stupp, R., M. E. Hegi, M. R. Gilbert and A. Chakravarti (2007). "Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions." J Clin Oncol **25**(26): 4127-4136.

Stupp, R., W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer and R. O. Mirimanoff (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." N Engl J Med **352**(10): 987-996.

Talmadge, J. E. (2007). "Pathways mediating the expansion and immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells and their relevance to cancer therapy." Clin Cancer Res **13**(18 Pt 1): 5243-5248.

Tamura, M., K. Nogimori, S. Murai, M. Yajima, K. Ito, T. Katada, M. Ui and S. Ishii (1982). "Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model." Biochemistry **21**(22): 5516-5522.

Tewari, R., S. R. Choudhury, S. Ghosh, V. S. Mehta and E. Sen (2012). "Involvement of TNF α -induced TLR4-NF- κ B and TLR4-HIF-1 α feed-forward loops in the regulation of inflammatory responses in glioma." J Mol Med (Berl) **90**(1): 67-80.

Thaci, B., A. U. Ahmed, I. V. Ulasov, D. A. Wainwright, P. Nigam, B. Auffinger, A. L. Tobias, Y. Han, L. Zhang, K. S. Moon and M. S. Lesniak (2014). "Depletion of myeloid-derived suppressor cells during interleukin-12 immunogene therapy does not confer a survival advantage in experimental malignant glioma." Cancer Gene Ther **21**(1): 38-44.

Thorburn, A. (2008). "Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes." Apoptosis **13**(1): 1-9.

Tohma, Y., C. Gratas, W. Biernat, A. Peraud, M. Fukuda, Y. Yonekawa, P. Kleihues and H. Ohgaki (1998). "PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas." J Neuropathol Exp Neurol **57**(7): 684-689.

Tonon, S., S. Goriely, E. Aksoy, O. Pradier, G. Del Giudice, E. Trannoy, F. Willems, M. Goldman and D. De Wit (2002). "Bordetella pertussis toxin induces the release of inflammatory cytokines and dendritic cell activation in whole blood: impaired responses in human newborns." Eur J Immunol **32**(11): 3118-3125.

Traganos, F. and Z. Darzynkiewicz (1994). "Lysosomal proton pump activity: supravital cell staining with acridine orange differentiates leukocyte subpopulations." Methods Cell Biol **41**: 185-194.

Turcan, S., D. Rohle, A. Goenka, L. A. Walsh, F. Fang, E. Yilmaz, C. Campos, A. W. Fabius, C. Lu, P. S. Ward, C. B. Thompson, A. Kaufman, O. Guryanova, R. Levine, A. Heguy, A. Viale, L. G. Morris, J. T. Huse, I. K. Mellinghoff and T. A. Chan (2012). "IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype." Nature **483**(7390): 479-483.

Ui, M., T. Katada, T. Murayama, H. Kurose, M. Yajima, M. Tamura, T. Nakamura and K. Nogimori (1984). "Islet-activating protein, pertussis toxin: a specific uncoupler of receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase." Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res **17**: 145-151.

Velasquez-Perez, L. and M. E. Jimenez-Marcial (2003). "Clinical-histopathologic concordance of tumors of the nervous system at the Manuel Velasco Suarez National Institute of Neurology and Neurosurgery in Mexico City." Arch Pathol Lab Med **127**(2): 187-192.

Verhaak, R. G., K. A. Hoadley, E. Purdom, V. Wang, Y. Qi, M. D. Wilkerson, C. R. Miller, L. Ding, T. Golub, J. P. Mesirov, G. Alexe, M. Lawrence, M. O'Kelly, P. Tamayo, B. A. Weir, S. Gabriel, W. Winckler, S. Gupta, L. Jakkula, H. S. Feiler, J. G. Hodgson, C. D. James, J. N. Sarkaria, C. Brennan, A. Kahn, P. T. Spellman, R. K. Wilson, T. P. Speed, J. W. Gray, M. Meyerson, G. Getz, C. M. Perou and D. N. Hayes (2010). "Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1." Cancer Cell **17**(1): 98-110.

Vesely, M. D., M. H. Kershaw, R. D. Schreiber and M. J. Smyth (2011). "Natural innate and adaptive immunity to cancer." Annu Rev Immunol **29**: 235-271.

Vitucci, M., D. N. Hayes and C. R. Miller (2011). "Gene expression profiling of gliomas: merging genomic and histopathological classification for personalised therapy." Br J Cancer **104**(4): 545-553.

Waltz, P., E. H. Carchman, A. C. Young, J. Rao, M. R. Rosengart, D. Kaczorowski and B. S. Zuckerbraun (2011). "Lipopolysaccharide induces autophagic signaling in macrophages via a TLR4, heme oxygenase-1 dependent pathway." Autophagy **7**(3): 315-320.

Wang, Z. Y., D. Yang, Q. Chen, C. A. Leifer, D. M. Segal, S. B. Su, R. R. Caspi, Z. O. Howard and J. J. Oppenheim (2006). "Induction of dendritic cell maturation by pertussis toxin and its B subunit differentially initiate Toll-like receptor 4-dependent signal transduction pathways." Exp Hematol **34**(8): 1115-1124.

Watanabe, K., O. Tachibana, K. Sata, Y. Yonekawa, P. Kleihues and H. Ohgaki (1996). "Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas." Brain Pathol **6**(3): 217-223; discussion 223-214.

Watters, J. J., J. M. Scharfner and B. Badie (2005). "Microglia function in brain tumors." J Neurosci Res **81**(3): 447-455.

Weber, R. G., M. Sabel, J. Reifenberger, C. Sommer, J. Oberstrass, G. Reifenberger, M. Kiessling and T. Cremer (1996). "Characterization of genomic alterations

associated with glioma progression by comparative genomic hybridization." Oncogene **13**(5): 983-994.

Woo, E. Y., C. S. Chu, T. J. Goletz, K. Schlienger, H. Yeh, G. Coukos, S. C. Rubin, L. R. Kaiser and C. H. June (2001). "Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer." Cancer Res **61**(12): 4766-4772.

Xiang, X., A. Poliakov, C. Liu, Y. Liu, Z. B. Deng, J. Wang, Z. Cheng, S. V. Shah, G. J. Wang, L. Zhang, W. E. Grizzle, J. Mobley and H. G. Zhang (2009). "Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes." Int J Cancer **124**(11): 2621-2633.

Zea, A. H., P. C. Rodriguez, M. B. Atkins, C. Hernandez, S. Signoretti, J. Zabaleta, D. McDermott, D. Quiceno, A. Youmans, A. O'Neill, J. Mier and A. C. Ochoa (2005). "Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion." Cancer Res **65**(8): 3044-3048.

Concomitant treatment with pertussis toxin plus temozolomide increases the survival of rats bearing intracerebral RG2 glioma

Roxana Magaña-Maldonado · Karen Manoutcharian · Norma Y. Hernández-Pedro · Edgar Rangel-López · Verónica Pérez-De la Cruz · César Rodríguez-Balderas · Julio Sotelo · Benjamín Pineda

Received: 3 December 2013 / Accepted: 4 December 2013 / Published online: 14 December 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract

Purpose Glioblastoma multiforme is the most frequent primary brain tumor, it has poor prognosis, and it remains refractory to current treatment. The success of temozolomide (TMZ) appears to be limited by the occurrence of chemoresistance. Recently, we report the use of pertussis toxin as adjuvant immunotherapy in a C6 glioma model; showing a decrease in tumoral size, it induced selective cell death in Treg cells, and it elicited less infiltration of tumoral macrophages. Here, we evaluated the cytotoxic effect of pertussis toxin in combination with TMZ for glioma treatment, both in vitro and in vivo RG2 glioma model.

Methods We determined cell viability, cell cycle, apoptosis, and autophagy on treated RG2 cells through flow cytometry, immunofluorescence, and Western blot assays.

Twenty-eight rats were divided in four groups ($n = 7$) for each treatment. After intracranial implantation of RG2 cells, animals were treated with TMZ (10 mg/Kg/200 μ l of apple juice), PTx (2 μ g/200 μ l of saline solution), and TMZ + PTx. Animals without treatment were considered as control.

Results We found an induction of apoptosis in around 20 % of RG2 cells, in both single treatments and in their combination. Also, we determined the presence of autophagy vesicles, without any modifications in the cell cycle in the TMZ – PTx-treated groups. The survival analyses showed an increase due to individual treatments; while in the group treated with the combination TMZ – PTx, this effect was enhanced.

Conclusion We show that the concomitant use of pertussis toxin plus TMZ could represent an advantage to improve the glioma treatment.

R. Magaña-Maldonado · N. Y. Hernández-Pedro · J. Sotelo · B. Pineda (✉)

Neuroimmunology and Neuro-Oncology Unit, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), Insurgentes Sur 3877, 14269 Mexico City, Mexico
e-mail: benpio76@hotmail.com

R. Magaña-Maldonado · K. Manoutcharian
Immunology Departament, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

E. Rangel-López
Excitatory Amino Acids Laboratory, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), Mexico City, Mexico

V. Pérez-De la Cruz
Neurochemistry Unit, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), Mexico City, Mexico

C. Rodríguez-Balderas
Animal Housing Unit, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), Mexico City, Mexico

Keywords Pertussis toxin · Glioblastoma multiforme · RG2 glioma · Survival · Temozolomide

Introduction

Cancer is the most common cause of death in many countries. Worldwide, central nervous system (CNS) tumors are an important cause of morbidity and mortality. It was estimated that approximately 30 % of all primary and 80 % of all malignant brain tumors are accounted for by the broad category of gliomas, while 54 % of all malignant brain tumors are glioblastoma multiforme (GBM) and they occur at a rate of 3.2 per 100,000 person per year (National Cancer Institute 2011; Deorah et al. 2006). At the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía of Mexico, GBM represents 9 % of all brain tumors and the

45.7 % of primary gliomas (Velasquez-Perez and Jimenez-Marcial 2003; Lopez-Gonzalez and Sotelo 2000). GBM comprises a heterogeneous group of neoplasms that differ in their location within the CNS, age and gender distribution, growth potential, extent of invasiveness, morphological features, tendency for progression, and response to treatments.

Although several innovative therapies are being developed for GBM, the mainstays of conventional treatment combine surgical resection with radiation and an oral DNA alkylating agent, temozolomide (TMZ); the overall median survival does not extend beyond 14 months (Stupp et al. 2005, 2007; Buckner 2003). TMZ is considered as a standard chemotherapeutic regimen for the first-line treatment for malignant gliomas (Ryu et al. 2012). TMZ exerts its cytotoxic effects mainly through the induction of apoptosis. It interferes with methylation process, and it is known that the persistence of some methylated guanine residues in DNA is necessary for the triggering of the programmed cell death process (Denny et al. 1994). However, TMZ does not exhibit uniform sensitivity to malignant gliomas, and its survival benefit remains unsatisfactory, mainly because the success of TMZ in GBM tumors appears to be limited by the occurrence of chemo resistance that allows glioma cells to escape from death signaling pathways (Carmo et al. 2011; Ryu et al. 2012).

Due to a lack of response to treatment in gliomas, some of the current challenges may be overcome by the integration of novel study designs, the selective use of targeted agents depending on tumor molecular characteristics, and simultaneous inhibition of several survival cellular pathways. Pertussis toxin (PTx), an exotoxin produced by *Bordetella pertussis*, regulates the activation induced of apoptotic cell death and autophagic process (Carracedo et al. 1995; Ogier-Denis and Codogno 2003). Previously, we reported the potential use of PTx as an immunomodulatory molecule on glial tumors induced by C6 glioma cells, demonstrating the selective induction of apoptosis on Treg cells with decrements in C6 cell viability and the increment of apoptosis in glioma cells. Also, PTx had an effect blocking the migration of glioma invading macrophages (Orozco-Morales et al. 2012). Therefore, the aim of this study was to determine the cytotoxic effect of PTx treatment in combination with TMZ as adjuvant therapy both in vivo and in vitro assays in RG2 glioma model.

Materials and methods

Reagents

Temozolomide (TMZ, 3,4-dihydro-3-methyl-4-oxoimidazo [5,1-d]-as-tetrazine-8-carboxamide) was purchased from

Sigma-Aldrich. It was dissolved in DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) for assays. Acridine orange was obtained from Polysciences (Warrington, PA, USA). Lyophilized powder of PTx was purchased from Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), and it was dissolved in saline solution.

Cell culture

Tumor cell line RG2 was purchased from ATCC (American Tissue Culture Collection, Rockville, MD, USA). Cells were cultured under sterile conditions at 37 °C in a humid environment with 5 % of CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10 % fetal bovine serum (GIBCO BRL), 4 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin. Cultures were regularly checked and split when the cell confluence reached 85 %.

In vitro assays

Cells were seeded at a density of 3×10^5 cells/well in 6-well Costar plates precoated with poly-L-lysine (5 µg/ml) and incubated overnight at 37 °C. After exposure to DMSO (1 µl/ml) for control group, TMZ (100 µM), PTx (20 ng/ml), or TMZ + PTx for 48 h, the cells were trypsinized and collected for apoptosis detection (Annexin V/7AAD), LC3 detection by immunofluorescence, immunoblotting, cell cycle, and acridine orange vesicles analysis. The number of living cells was estimated by trypan blue exclusion. To inhibit autophagy, we used 3-methyladenine (3-MA), an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), which inhibits autophagic sequestration (Kabeya et al. 2000; Mizushima et al. 2001; Kim and Klionsky 2000). According to this, experimental groups were previously exposed for 24 h to DMSO 1 µl/ml (Control), TMZ (100 µM), PTx (20 and 200 ng/ml), or TMZ + PTx, respectively, as previously was described, and then, 1.0 mM of 3-MA was added for additional 48 h. Cells were monitored under light microscope and later examined by immunofluorescence to detect LC3 protein.

Detection of acidic vesicular organelles

Autophagy is characterized by the formation and promotion of acidic vesicular organelles (AVOs) (Kanzawa et al. 2003a). We take advantage of the lysosomotropic agent acridine orange that moves freely across biological membranes when it is uncharged. Its protonated form accumulates in acidic cell compartments, where it forms aggregates that fluorescence bright red (Paglin et al. 2001; Kanzawa et al. 2003b). Flow cytometry with acridine orange staining was employed to detect and quantify the AVOs. In acridine

orange-stained cells, the cytoplasm and nucleus fluoresce bright green and dim red, respectively, whereas acidic compartments fluoresce bright red, as it is described elsewhere (Kanzawa et al. 2003a). Therefore, we could measure a change in the intensity of the red fluorescence to represent the percentage of their cellular acidic compartment. After treatment with TMZ alone or TMZ combined with PTx, 1×10^5 cells were collected in phenol red-free RPMI 1640 medium. The green (FL-1) and red (FL-3) fluorescence of acridine orange was measured with a flow cytometer using the CellQuest software (Becton–Dickinson, San Jose, CA, USA). The sum of the upper-left and the upper-right quadrants of the dot plot was used to represent the percentage of autophagy. These assays were done by triplicate.

LC3 and Beclin immunofluorescence staining

The microtubule-associated protein 1 light-chain 3 (LC3) is essential for amino-acid starvation-induced autophagy, and it is associated with the autophagosome membrane (Kabeya et al. 2000) (Munafò and Colombo 2001). Tumor cells were cultured on chamber slide dishes (BD Biosciences, Bedford, MA, USA). Once the treatments previously mentioned were assayed, cells were fixed in 4 % paraformaldehyde, blocked with 3 % normal goat serum, and then incubated in 1 % BSA/10 % normal goat serum/0.3 M glycine in 0.1 % PBS-Tween for 1 h to permeabilize the cells and to block non-specific protein–protein interactions. After that, cells were incubated either with the goat polyclonal anti-LC3A/B or with the rabbit polyclonal anti-Becclin 1 antibody (abcam, Cambridge, UK) for 30 min. Then, cells were washed twice with PBS and incubated by additional 30 min in darkness with an anti-goat IgG antibody or anti-rabbit IgG antibody (abcam, Cambridge, UK), washed again with PBS, and finally mounted with mounting fluid. Images were obtained on a Leica microscope.

Apoptosis detection with Annexin V assay and PI double stain

After the experimental treatments described above were administered, cells were rinsed with PBS and resuspended in 1 ml of filtered PBS and adjusted to a final concentration of 1×10^6 cells/ml. Cell suspensions were incubated with APC-labeled Annexin V (Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Pharmingen) and propidium iodide (PI) in 100 μ l of binding buffer. After gently vortexing, cells were incubated for 15 min at room temperature in darkness and 400 μ l of binding buffer was added and analyzed by flow cytometry within 1 h after treatments. A total of 10,000 events were evaluated. Data were collected on a FACSCalibur instrument (BD Biosciences). Cell QuestPro and Flow Jo ver. 7.6.1 software were used for data analysis.

The dot plot of the four quadrants in the figures was used to distinguish the normal (annexin V–/PI–), early apoptotic (annexin V+/PI–), late apoptotic (annexin V+/PI+), and necrotic (annexin V–/PI+) cells (Pietra et al. 2001).

Determination of cell cycle

The cell distribution in the cell cycle was determined by flow cytometry using PI staining. After experimental treatments, 1×10^6 cells were rinsed with PBS, collected, fixed in cold 70 % ethanol, and stored at -20°C until analysis. Cells were washed with PBS, centrifuged and resuspended in permeabilization buffer (0.2 M Na_2HPO_4 , 0.1 M acetic acid), and incubated 30 min at 37°C . Then, cells were centrifuged and resuspended in RNase (100 $\mu\text{g/ml}$) and PI (25 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Cells were incubated in the dark for 30 min at room temperature. Cell cycle was determined on a FACSCalibur Flow cytometer FL-4 (Becton–Dickinson, USA). Measurements were obtained at 488 nm gating out doublets and clumps for each sample. A total of 10,000 events were evaluated. Cell QuestPro and Flow Jo ver. 7.6.1 software were used for data analysis.

Immunoblotting

Cells were disrupted with lysis buffer (25 mM Hepes, 1.5 % Triton X-100, 0.1 % SDS, 0.5 M NaCl, 5 mM EDTA, and 0.1 mM sodium deoxycholate) containing a protease inhibitor cocktail (Wang et al. 2008). Total cellular extracts were analyzed using the Bio-Rad protein assay dye reagent, and an equal amount of proteins from each group was separated using SDS–PAGE, followed by transfer to PVDF membranes. Membranes were incubated with 5 % skim milk solution (blocking solution) for 1 h and then incubated with the goat polyclonal anti-LC3A/B (abcam, Cambridge, UK) at 4°C for 16 h. Membranes were probed with the appropriate HRP-conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature. The immunoreactive proteins were detected using enhanced chemiluminescence reagent (SuperSignal West Pico chemiluminescence substrate; Pierce Biotechnology) and then exposed to X-ray film (FujiFilmCorp.).

Animal care

Twenty-eight Wistar male rats (weight of 180 g) were housed in plastic containers, kept at room temperature at 23°C and artificial lighting of 24 h cycles consisting in 12 h light/12 h dark. Rats were fed with pellets (Laboratory Rodent Diet Harlan) and water ad libitum. All experiments were reviewed and approved by the Research and Experimental Animal Care Committees of the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México.

In vivo treatment

Before intracranial implantation, RG2 cells were briefly trypsinized to detach them from culture bottles, centrifuged and resuspended in the corresponding medium. The cell suspensions were regularly shaken to avoid cell sedimentation and kept in a sterile vial at 4 °C until stereotactic implantation.

Orthotopic glioma model

For the rat RG2 glioma cell implantation model, Fischer 344 male rats (Bioinvert, Mexico City), 3-months-old ($n = 28$), were fed ad libitum. The cell implantation

procedure was conducted based on the method developed by Kobayashi et al. (1980). Briefly, each animal was anesthetized (ketamine—40–90 mg/Kg intraperitoneally administered plus xylazine 5–10 mg/Kg subcutaneously administered) and immobilized on a stereotaxic unit (Stoelting Co., Wood Dale, IL). After disinfection and incision of the skin of the head with a scalpel, a hole was drilled through the skull 2 mm lateral and 2 mm anterior to the bregma, on the right-hand side of the skull. 1×10^6 rat glioma cells suspended in 10 μ l of saline solution were injected at 3 mm in depth from the dura at a rate of 2 μ l/min, using a 25-gauge Hamilton needle mounted on a 25- μ l Hamilton glass syringe (Hamilton, Reno, NV). A waiting time of 2 min was implemented following injection.

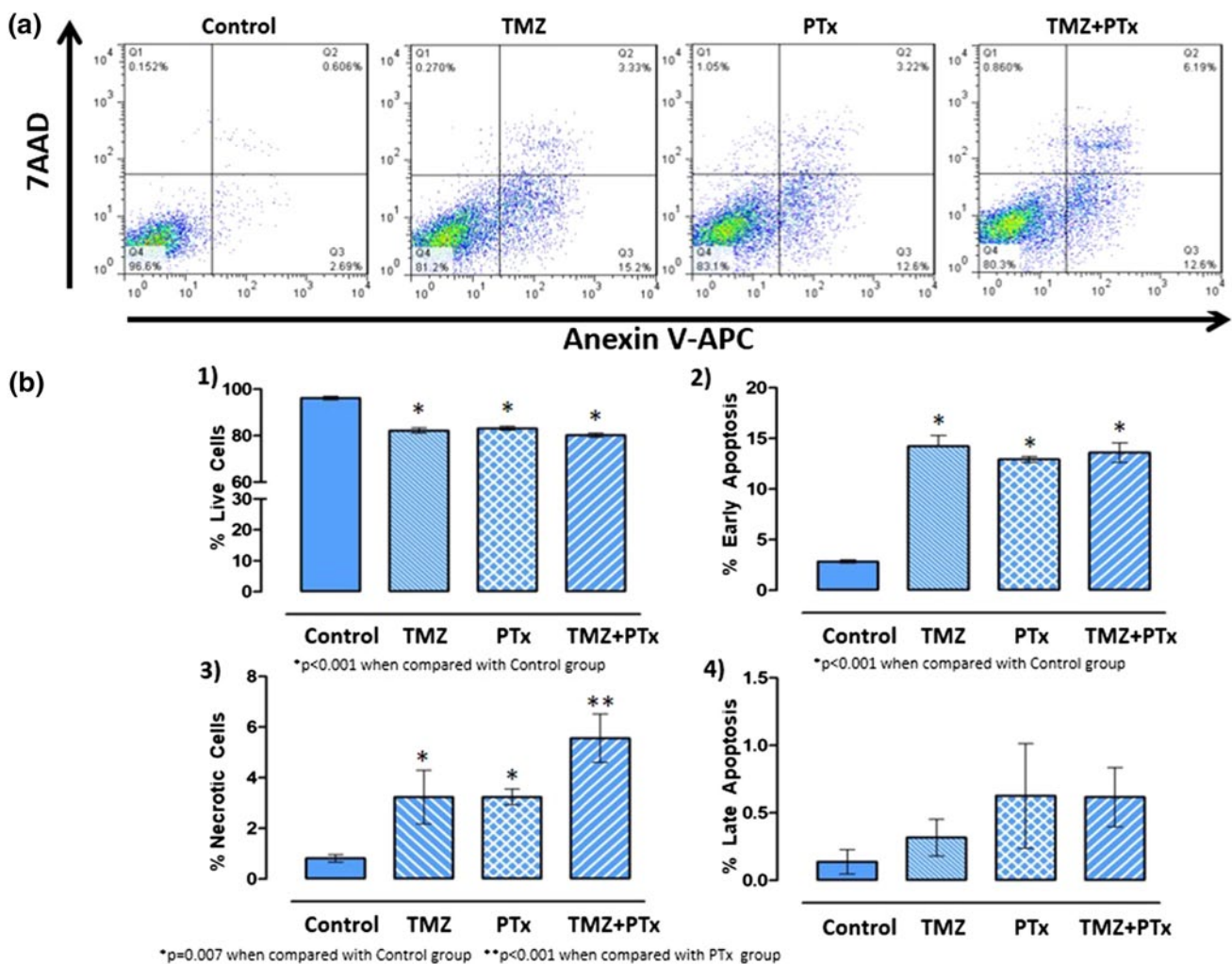


Fig. 1 TMZ or PTx effect on apoptosis induction in malignant RG2 glioma cells. Tumor cells were seeded at 3×10^5 cells per well (1 ml) in 6-well flat-bottomed plates and incubated overnight at 37 °C. After exposure to TMZ (100 mM), PTx (20 ng/ml) for 3 days, the cells were trypsinized, and the number of viable cells, necrotic, and apoptotic cells was determined by flow cytometry. Results showed the

mean \pm SD of three independent experiments. **a** Representative dot plots of apoptosis induction by TMZ, PTx, or TMZ + PTx. **b** Representative percentages of viability (*b1*), early apoptosis (*b2*), necrotic cells (*b3*), and late apoptosis (*b4*) from RG2 cells treated with TMZ, PTx, or TMZ + PTx

After implant, animals were divided into four groups ($n = 7$ each), according to the treatment: the first group (control) was untreated, the second group (TMZ) was treated with temozolomide (10 mg/Kg in 200 μ l of apple juice) administered by oral route for 5 days, the third group (PTx) was treated with 2 μ g of PTx dissolved in 200 μ l of saline solution 2 days after implant and 1 μ g of PTx 4 days after implant, and the fourth group (TMZ + PTx) was treated with the combination of TMZ and PTx as previously mentioned.

Statistical analyses

For descriptive purpose, continuous variables were summarized as arithmetic means and standard deviations (SD). One-way analysis of variance and post hoc (Tukey) test were conducted. Statistical significance was determined with $p < 0.05$ in a two-sided test. Cumulative survival was determined from day of implantation until the rats showed disabling alterations, until death or the last day of follow-up, respectively. Data were analyzed by the Kaplan–Meier test. SPSS software package V 18.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL) was employed for data analysis.

Results

Cell viability and apoptosis induction in malignant RG2 glioma cell line

Figure 1a shows representative dot plots from cells treated with TMZ, PTx, and TMZ + PTx, respectively. The

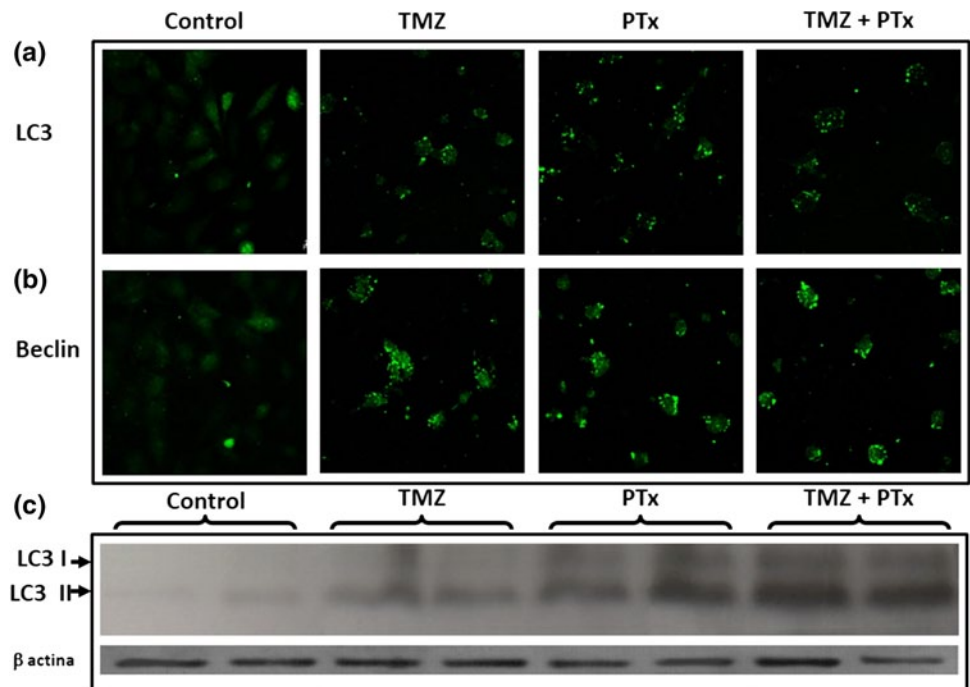
cytotoxicity effect of TMZ, PTx, or TMZ + PTx on RG2 glioma cell was determined by flow cytometric analysis assays to determine cell viability. After 48 h of exposure to treatments, a significant decrease in cell viability was observed in groups treated with TMZ (82.2 ± 0.91), PTx (83.1 ± 0.06), and TMZ + PTx (80.2 ± 0.65) compared to control group (96.2 ± 0.55) ($p < 0.001$). Figure 1b1.

The degree of early and late apoptosis of glioma cells induced by TMZ, PTx, or TMZ + PTx was analyzed by FACS. The early apoptotic fraction in cells treated with TMZ (14.2 ± 1.05), PTx (12.9 ± 0.03), and TMZ + PTx (13.6 ± 0.95) was significantly higher than in control group (2.8 ± 0.15) ($p < 0.001$) after 48 h. Regarding late apoptosis induced in cells by the treatments, there were significant differences in TMZ (3.2 ± 0.21), PTx (3.2 ± 0.32), and TMZ + PTx (5.5 ± 1.11) groups compared to control group (0.81 ± 0.44) ($p = 0.007$ and $p < 0.001$). See Fig. 1b2, b3. We did not find differences between groups in the percentage of necrotic cells ($p = 0.795$). See Fig. 1b4. These results indicate that the observed cytotoxicity of TMZ or PTx is not due to necrosis induction.

Effect of TMZ, PTx, and TMZ + PTx treatments on cell cycle

To address more information whether the antiproliferative effects of TMZ, PTx, or their combination with malignant glioma are associated with cell cycle regulation, cell cycle analysis was carried out in RG2 cells treated with TMZ, PTx, or TMZ + PTx by DNA flow cytometric analysis. The TMZ treatment (100 mM, 48 h), PTx (20 ng/ml), and

Fig. 2 Autophagy induction by TMZ, PTx, or TMZ + PTx in RG2 cells. Tumor cells were cultured on the chamber slide dish and incubated overnight at 37 °C. After exposure to TMZ (100 mM), PTx (20 ng/ml) for 3 days, cells were fixed and stained with the goat polyclonal anti-LC3A/B (a) or rabbit polyclonal anti-Beclin 1 antibody (b). Representative images of punctuate signal of a LC3 or b Beclin 1 in PTx, TMZ, or TMZ + PTx-treated RG2 cells were seen after treatment with TMZ (100 mM), PTx (20 ng/ml), or TMZ + PTx for 72 h. Cells were examined by fluorescence microscopy. c Western blot analysis of LC3 I and II expression in RG2 cells after 72 h of treatment with TMZ (100 mM), PTx (20 ng/ml), or TMZ + PTx



TMZ + PTx did not produce any influence in the induction of cell cycle in RG2 malignant glioma when treatments were administrated (data not shown).

Induction of autophagy in RG2 glioma cells

It is well known that radiation or chemotherapeutic agents such as tamoxifen, arsenic trioxide or TMZ induce autophagy, but not apoptosis in several cancer cells including malignant glioma cells (Kanzawa et al. 2004). To evaluate whether TMZ, PTx, or their combination induced morphological alterations compatible with autophagy, RG2 malignant glioma cells were exposed to TMZ (100 mM), PTx (20 ng/ml), or TMZ + PTx for 3 days. After that, chamber slides were stained with LC3 and Beclin, and the morphological changes were analyzed by microscopy. As shown in Fig. 2a, b, numerous autophagy vacuoles LC3 and Beclin 1 were observed in all the treatments. To determine autophagy activity, the expression of LC3 I and II (one of the autophagosome membrane proteins) was analyzed by Western blot (Fig. 2c). An increase in the amounts in both LC3-I and II was found in groups treated with TMZ, PTx, and TMZ + PTx. Similarly, up-regulated autophagy-related protein Beclin 1 was increased in groups that received these treatments (Fig. 2b).

Development of acidic vesicular organelles (AVOs) in RG2 glioma cells

To detect and quantify the development of AVOs, we performed a flow cytometric analysis to determine whether TMZ, PTx, and TMZ + PTx could induce changes in fractional volume and/or acidity of AVOs. TMZ (7.0 ± 2.5), PTx (11.0 ± 6.5), and TMZ + PTx (49.0 ± 9.54) increased the strength of the bright red fluorescence (y -axis) in RG2 glioma cells from control (4.0 ± 1.30) after 48 h of treatment (Fig. 3b $p < 0.05$), respectively. These results could be attributable to the development of AVOs associated with autophagy.

Morphological changes and autophagy induction in RG2 cells

To reveal whether the observed cell damage was a cause or consequence of autophagy, the autophagy inhibitor, 3-methyladenine (3-MA, 1.0 mM), was administrated in RG2 cells treated with TMZ (100 mM), PTx (20 ng/ml), PTx (200 ng/ml), TMZ (100 mM) + PTx (20 ng/ml), or TMZ (100 mM) + PTx (200 ng/ml) after 24, 48, and 72 h of exposure.

After 24 h of exposure to treatments, some cells show vacuoles mainly in the groups treated with PTx (20 and 200 ng/ml) or in combination with TMZ (Fig. 4a). However, after 48 h of treatment, the number of cells showing

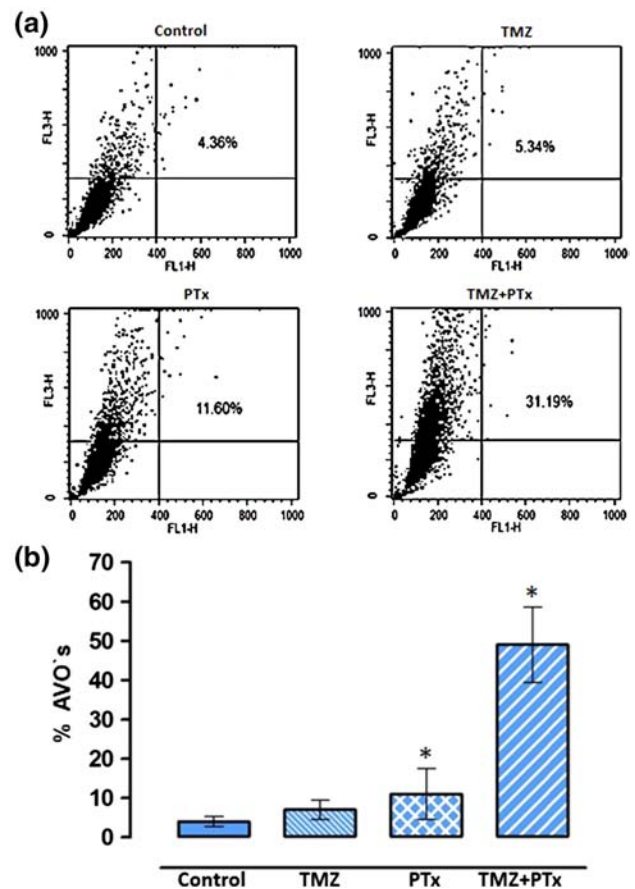


Fig. 3 Development of AVOs in TMZ, PTx, or TMZ + PTx-treated RG2 cells. Detection of *green* and *red* fluorescence in acridine orange-stained cells using FACS analysis (a). FL1-H indicates *green* color intensity, while FL3-H shows *red* color intensity. Graph shows the percentage of AVOs induction \pm SD. Data shown are representative of three independent experiments. **b** For cell cycle analysis, malignant glioma cells treated with TMZ, PTx, or TMZ + PTx for 3 days were collected and stained with propidium iodide and analyzed in the FACSCalibur. The percentage of cells in different phases of the cell cycle was determined by using Flow jo Software version

autophagy membranes was increased, while the number of cells that maintain integrity in their membranes was reduced after addition 3-MA, an inhibitor of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K), which is known to inhibit autophagy sequestration (Fig. 4b). After 72 h of addition of 3MA, cells were stained with an anti-LC3 antibody, and we found that the treatment with TMZ, PTx, or TMZ + PTx diminished significantly the number of viable cells indicating an autophagy process stage (Fig. 4c).

TMZ + PTx increased survival in rats bearing intracerebral RG2 glioma

In rats bearing intracranial RG2 glioma tumors, the mean survival period determined was estimated from 19 to

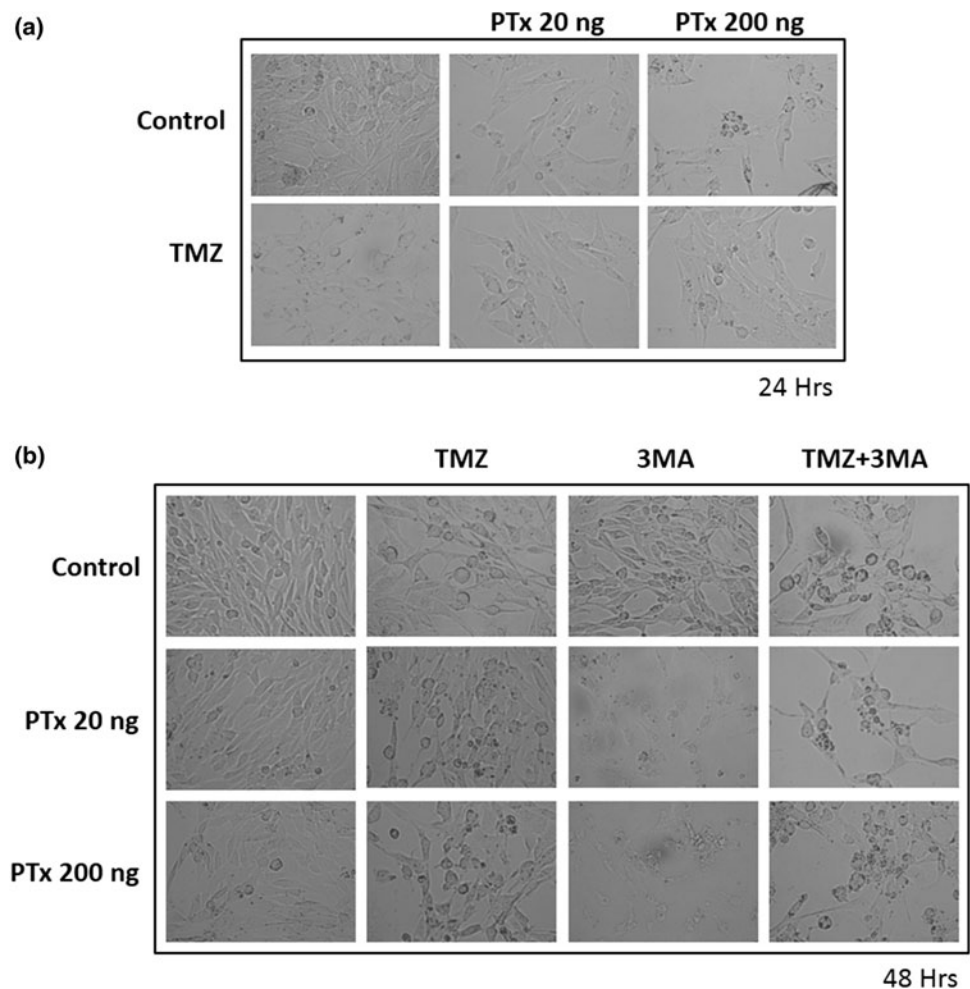
21 days for the untreated group. A slight increase in the mean survival period was observed in the groups treated with TMZ (25 days $p = 0.05$) and PTx (28 days $p = 0.048$), but in the TMZ + PTx group, a synergistic effect was seen in the survival curve (31 days $p = 0.014$), suggesting that the combination of TMZ + PTx is effective for rat survival (Fig. 5).

Discussion

Despite the multimodality treatments available, the prognosis of malignant glioma remains poor. Currently, TMZ is considered the most effective drug in the treatment for gliomas; however, its efficacy is often limited by tumor recurrence and the development of resistance to TMZ. Due to an unsatisfactory response of conventional treatment against gliomas, we tested a PTx treatment alone or in combination with the clinical alkylating agent, TMZ. Our results showed that the viability of RG2 cells was diminished in the groups treated with TMZ or PTx alone and also when these drugs were combined. However, when we analyzed the induction

of apoptosis, we observed around 20 % of apoptotic cells in the groups treated with TMZ and PTx and we did not find any changes in the cell cycle arrest. These data agree with others previously reported by Sato et al. (2009) who did not observe significant changes in either apoptosis or cell cycle kinetics in treated glioma (T98G) cells. Similarly, Carmo et al. (2011) found that the expression of LC3, the autophagy-associated protein, was increased and only a reduced percentage of cells underwent apoptosis in TMZ-treated U-118 glioma cells. Conversely, Hirose et al. reported that in TMZ-treated glioma cells, the drug induced a cell cycle arrest in G2/M and a low level of apoptosis as compared with lymphoid cells. Other studies have proposed that the induction of G2/M arrest of malignant glioma cells occurs in a dose-dependent manner (Kanzawa et al. 2004; Hirose et al. 2001). We observed that TMZ decreased the level of apoptosis and also elicited the induction of the cell cycle by TMZ, which could be associated with the activity of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and Pi3 K/Akt. It is known that the hypermethylation of the MGMT promoter reduces the ability to TMZ to induce apoptosis. Furthermore, an active state of

Fig. 4 Kinetics of autophagy induction. Kinetics of cell damage induced by TMZ, PTx (20, 200 ng/ml), TMZ + PTx (20 ng/ml), or TMZ + PTx (200 ng/ml) treatment after 24 h (a). The same treatments were tested with or without 3MA after 48 h (b) and 72 h (c). Images were taken in bright field and later by fluorescence microscopy at 72 h posttreatment (d). Nuclei were counterstained with propidium iodide (red), and LC3 antibody was used to show cells expressing LC3 aggregation after treatment (green). 3MA was used to inhibit autophagy



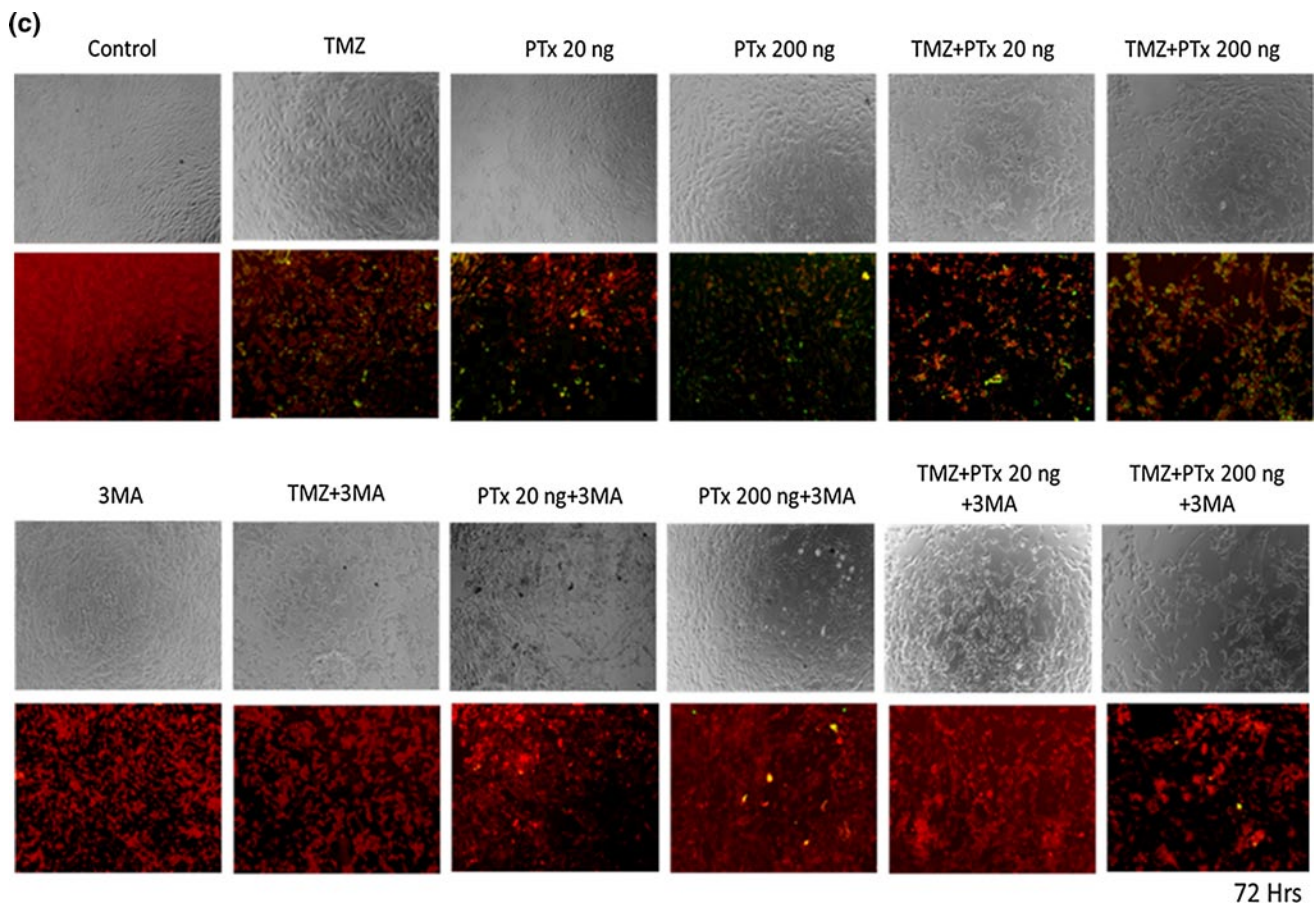


Fig. 4 continued

Pi3 K/Akt overcomes the G2 checkpoint, thereby avoiding the effect of TMZ (Carmo et al. 2011; Law 2005; Meloche and Pouyssegur 2007; Tran et al. 2001). Similarly, we previously reported that PTx treatment is capable to decrease the cell viability and induce around 25 % of apoptosis in the glioma C6 model (Orozco-Morales et al. 2012).

Regarding to the low level of induction of apoptosis, we determined whether the observed autophagy was induced in RG2 cell after treatment with TMZ and PTx; therefore, we analyzed the level of expression of LC3 I, II, Beclin 1, and the formation and promotion of AVOs after 3MA addition. We found that TMZ and PTx treatments elicited autophagic cell death characterized by the high level of autophagic protein Beclin-1 and a cellular redistribution of the marker LC3. Notoriously, this effect was increased when TMZ + PTx was combined in the treatment. Furthermore, after 3MA was added, we found a decrease in the number of autophagic vesicles and the formation of autophagosome, in the groups treated with TMZ, PTx, and TMZ + PTx. The mechanisms of action of TMZ and the pathways involved in the escape of glioma cells from death have not yet been completely elucidated. However, it has

been proposed that TMZ is able to induce autophagy which can be either survival promoting or death inducing depending on the cellular context (Kanzawa et al. 2003b; Thorburn 2008). In the context of brain tumors, cytoplasmic levels of the protein BECLIN1 and its mRNA were found to be lower in GBMs compared to lower-grade astrocytomas as well as in normal brain tissue (Miracco et al. 2007). Additionally, high cytoplasmic levels of the protein BECLIN1 have been found to show a positive correlation with the survival and the performance status of patients, whereas a low expression of BECLIN1 correlates with an increase in cell proliferation and a decrease in apoptosis (Huang et al. 2010). Interestingly, high levels of expression of LC3 have been associated with improved survival in GBM patients with poor performance scores, whereas in patients with normal performance scores, low levels of expression of LC3 correlate with better survival rates (Aoki et al. 2008). It has been described that low levels of BECLIN1 and LC3B-II proteins have been found in higher grade astrocytomas (Huang et al. 2010), suggesting that a decrease in autophagic activity may drive the progression of astrocytic tumors.

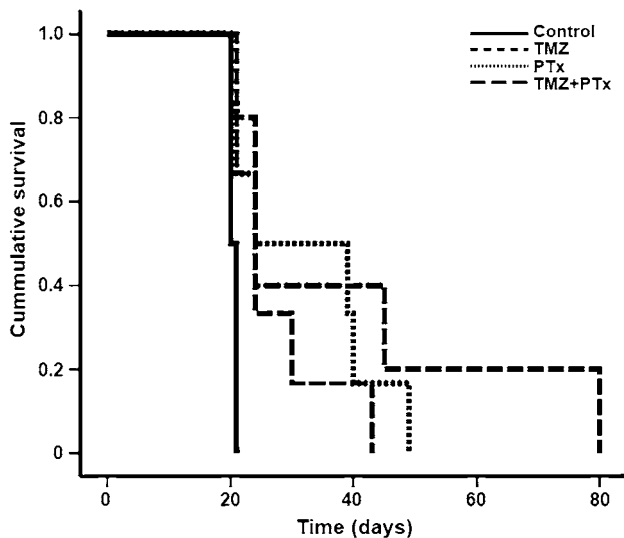


Fig. 5 Kaplan–Meier survival of rats with intracranial RG2 cells. Systemic (i.p.) administration of PTx (2 μ g at day 0 and 1 μ g at day 2), TMZ 10 mg/Kg/5 days (p.o), or TMZ + PTx prolonged survival of immunocompetent rats bearing intracranial RG2 glioma. Survival curves and Kaplan–Meier survival analysis of rats implanted with RG2 (1×10^6 cells/rat) and treated with TMZ, PTx, or TMZ + PTx ($n = 7$). The combination of TMZ + PTx potentiates rat survival

Subsequently, we perform an in vivo study in order to determine whether the treatments for TMZ, PTx, or TMZ + PTx could increase the survival of rats implanted intracranially with RG2 glioma cells (Fig. 5). Our results demonstrated a significant increase in survival when animals were treated both with TMZ and PTx. However, the combined treatment with TMZ + PTx increased two times more the survival registered compared when the treatments were administered individually. Our group previously demonstrated that the treatment with PTx alone reduces the subcutaneous glioma size until 80 % compared to the control group. Furthermore, we demonstrated that PTx was capable to induce selectively apoptosis of Treg cells, and it elicited a decrease in the number of tumor-invading macrophages (Orozco-Morales et al. 2012). It is possible that the dual effect observed for PTx over the modulation of immune response and autophagy induction produces an increase in the survival of rats intracranially implanted with RG2 glioma cells. We attribute this effect to the immunomodulation produced by PTx plus the cytotoxic effect and autophagy induction by TMZ. Additionally, PTx exerts pleiotropic effects on the immune system, and it plays an important role in the activation of toll-like receptor 4 (TLR4). Recently, it was shown that TLR 4 acts as an environmental sensor for autophagy, and recent data have revealed that the regulation of TLR4 in several glioma cell lines plays an important role in the autophagy response, tumor

progression, and chemoresistance (Sarrazy et al. 2011; Yu et al. 2012; Tewari et al. 2012; Waltz et al. 2011; Xu et al. 2007; Magaña et al. 2012). It is possible that PTx caused irreversibly autophagy activating the cell death by TLR4, increasing the efficacy given by TMZ, which may be a pivotal mechanism in mediating Pi3 K/Akt and ERK1/2 MAP kinase signaling pathways (Ogier-Denis and Codogno 2003; Marino and Lopez-Otin 2004; Fu et al. 2010; Thorburn 2008; Katayama et al. 2007). Furthermore, PTx is frequently used in immunological studies to enhance the onset of autoimmune disease in experimental animals (Locht et al. 2011). PTx-induced permeability of cerebral endothelial barriers is mediated through the PKC and PI3-kinase pathways, and it is abrogated by high cAMP levels (Bruckener et al. 2003). Therefore, it is possible that the multiple effects of the PTx over the immune system, autophagy induction and blood brain barrier permeabilization with consequent increase in the amount of TMZ inside the brain tumor, could warrant the use of PTx in combination with the actual regimen of chemotherapy.

In conclusion, the concomitant treatment with TMZ and PTx induced autophagy in vitro and increased the survival in RG2 glioma model studied here.

Acknowledgments Animals were kindly donated by Bioinvert Mexico City. This work was supported by the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACyT, Grant 180851) and Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (PICSA 10-143).

Conflict of interest None.

References

- Aoki H, Kondo Y, Aldape K, Yamamoto A, Iwado E, Yokoyama T, Hollingsworth EF, Kobayashi R, Hess K, Shinjima N, Shingu T, Tamada Y, Zhang L, Conrad C, Bogler O, Mills G, Sawaya R, Kondo S (2008) Monitoring autophagy in glioblastoma with antibody against isoform B of human microtubule-associated protein 1 light chain 3. *Autophagy* 4(4):467–475
- Bruckener KE, el Baya A, Galla HJ, Schmidt MA (2003) Permeabilization in a cerebral endothelial barrier model by pertussis toxin involves the PKC effector pathway and is abolished by elevated levels of cAMP. *J Cell Sci* 116(Pt 9):1837–1846
- Buckner JC (2003) Factors influencing survival in high-grade gliomas. *Semin Oncol* 30(6 Suppl 19):10–14
- Carmo A, Carvalheiro H, Crespo I, Nunes I, Lopes MC (2011) Effect of temozolomide on the U-118 glioma cell line. *Oncol Lett* 2(6):1165–1170. doi:10.3892/ol.2011.406ol-02-06-1165
- Carracedo J, Ramirez R, Marchetti P, Pintado OC, Baixeras E, Martinez C, Kroemer G (1995) Pertussis toxin-sensitive GTP-binding proteins regulate activation-induced apoptotic cell death of human natural killer cells. *Eur J Immunol* 25(11):3094–3099. doi:10.1002/eji.1830251116
- Denny BJ, Wheelhouse RT, Stevens MF, Tsang LL, Slack JA (1994) NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry* 33(31):9045–9051

- Deorah S, Lynch CF, Sibenaller ZA, Ryken TC (2006) Trends in brain cancer incidence and survival in the United States: surveillance, Epidemiology, and End Results Program, 1973 to 2001. *Neurosurg Focus* 20(4):E1. doi:[10.3171/foc.2006.20.4.E1](https://doi.org/10.3171/foc.2006.20.4.E1)
- Fu J, Shao CJ, Chen FR, Ng HK, Chen ZP (2010) Autophagy induced by valproic acid is associated with oxidative stress in glioma cell lines. *Neuro Oncol* 12(4):328–340. doi:[10.1093/neuonc/nop005](https://doi.org/10.1093/neuonc/nop005)
- Hirose Y, Berger MS, Pieper RO (2001) p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer Res* 61(5):1957–1963
- Huang X, Bai HM, Chen L, Li B, Lu YC (2010) Reduced expression of LC3B-II and Beclin 1 in glioblastoma multiforme indicates a down-regulated autophagic capacity that relates to the progression of astrocytic tumors. *J Clin Neurosci* 17(12):1515–1519. doi:[10.1016/j.jocn.2010.03.051](https://doi.org/10.1016/j.jocn.2010.03.051)
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 19(21):5720–5728. doi:[10.1093/emboj/19.21.5720](https://doi.org/10.1093/emboj/19.21.5720)
- Kanzawa T, Bedwell J, Kondo Y, Kondo S, Germano IM (2003a) Inhibition of DNA repair for sensitizing resistant glioma cells to temozolomide. *J Neurosurg* 99(6):1047–1052. doi:[10.3171/jns.2003.99.6.1047](https://doi.org/10.3171/jns.2003.99.6.1047)
- Kanzawa T, Kondo Y, Ito H, Kondo S, Germano I (2003b) Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer Res* 63(9):2103–2108
- Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S (2004) Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ* 11(4):448–457. doi:[10.1038/sj.cdd.4401359](https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401359)
- Katayama M, Kawaguchi T, Berger MS, Pieper RO (2007) DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells. *Cell Death Differ* 14(3):548–558. doi:[10.1038/sj.cdd.4402030](https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402030)
- Kim J, Klionsky DJ (2000) Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 69:303–342. doi:[10.1146/annurev.biochem.69.1.303](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.303)
- Kobayashi N, Allen N, Clendenon NR, Ko LW (1980) An improved rat brain-tumor model. *J Neurosurg* 53(6):808–815. doi:[10.3171/jns.1980.53.6.0808](https://doi.org/10.3171/jns.1980.53.6.0808)
- Law BK (2005) Rapamycin: an anti-cancer immunosuppressant? *Crit Rev Oncol Hematol* 56(1):47–60. doi:[10.1016/j.critrevonc.2004.09.009](https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2004.09.009)
- Locht C, Coutte L, Mielcarek N (2011) The ins and outs of pertussis toxin. *FEBS J* 278(23):4668–4682. doi:[10.1111/j.1742-4658.2011.08237.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08237.x)
- Lopez-Gonzalez MA, Sotelo J (2000) Brain tumors in Mexico: characteristics and prognosis of glioblastoma. *Surg Neurol* 53(2):157–162
- Magaña R, Hernandez-Pedro N, Rangel E, Manoutcharian K, Pineda B, Sotelo J (2012) Pertussis: symptoms, prevention and treatment. *Adv Med Biol* 55:41–68
- Marino G, Lopez-Otin C (2004) Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cell Mol Life Sci* 61(12):1439–1454. doi:[10.1007/s00018-004-4012-4](https://doi.org/10.1007/s00018-004-4012-4)
- Meloche S, Pouyssegur J (2007) The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26(22):3227–3239. doi:[10.1038/sj.onc.1210414](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210414)
- Miracco C, Cosci E, Oliveri G, Luzi P, Pacenti L, Monciatti I, Mannucci S, De Nisi MC, Toscano M, Malagnino V, Falzarano SM, Pirtoli L, Tosi P (2007) Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumours. *Int J Oncol* 30(2):429–436
- Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, Tokuhisa T, Ohsumi Y, Yoshimori T (2001) Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* 152(4):657–668
- Munafò DB, Colombo MI (2001) A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *J Cell Sci* 114(Pt 20):3619–3629
- National Cancer Institute (2011) Central brain tumor registry of the United States
- Ogier-Denis E, Codogno P (2003) Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochim Biophys Acta* 1603(2):113–128
- Orozco-Morales M, Sanchez-Garcia FJ, Guevara-Salazar P, Arrieta O, Hernandez-Pedro NY, Sanchez-Garcia A, Perez-Madrigal R, Rangel-Lopez E, Pineda B, Sotelo J (2012) Adjuvant immunotherapy of C6 glioma in rats with pertussis toxin. *J Cancer Res Clin Oncol* 138(1):23–33. doi:[10.1007/s00432-011-1069-y](https://doi.org/10.1007/s00432-011-1069-y)
- Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahlill M, Sphicas E, Domingo D, Yahalom J (2001) A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res* 61(2):439–444
- Pietra G, Mortarini R, Parmiani G, Anichini A (2001) Phases of apoptosis of melanoma cells, but not of normal melanocytes, differently affect maturation of myeloid dendritic cells. *Cancer Res* 61(22):8218–8226
- Ryu CH, Yoon WS, Park KY, Kim SM, Lim JY, Woo JS, Jeong CH, Hou Y, Jeun SS (2012) Valproic acid downregulates the expression of MGMT and sensitizes temozolomide-resistant glioma cells. *J Biomed Biotechnol* 2012:987495. doi:[10.1155/2012/987495](https://doi.org/10.1155/2012/987495)
- Sarrazy V, Vedrenne N, Billet F, Bordeau N, Lepreux S, Vital A, Jauberteau MO, Desmouliere A (2011) TLR4 signal transduction pathways neutralize the effect of Fas signals on glioblastoma cell proliferation and migration. *Cancer Lett* 311(2):195–202. doi:[10.1016/j.canlet.2011.07.018](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.07.018)
- Sato Y, Kurose A, Ogawa A, Ogasawara K, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Sawai T (2009) Diversity of DNA damage response of astrocytes and glioblastoma cell lines with various p53 status to treatment with etoposide and temozolomide. *Cancer Biol Ther* 8(5):452–457
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352(10):987–996. doi:[10.1056/NEJMoa043330](https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330)
- Stupp R, Hegi ME, Gilbert MR, Chakravarti A (2007) Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *J Clin Oncol* 25(26):4127–4136. doi:[10.1200/JCO.2007.11.8554](https://doi.org/10.1200/JCO.2007.11.8554)
- Tewari R, Choudhury SR, Ghosh S, Mehta VS, Sen E (2012) Involvement of TNF α -induced TLR4-NF- κ B and TLR4-HIF-1 α feed-forward loops in the regulation of inflammatory responses in glioma. *J Mol Med (Berl)* 90(1):67–80. doi:[10.1007/s00109-011-0807-6](https://doi.org/10.1007/s00109-011-0807-6)
- Thorburn A (2008) Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. *Apoptosis* 13(1):1–9. doi:[10.1007/s10495-007-0154-9](https://doi.org/10.1007/s10495-007-0154-9)
- Tran SE, Holmstrom TH, Ahonen M, Kahari VM, Eriksson JE (2001) MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors. *J Biol Chem* 276(19):16484–16490. doi:[10.1074/jbc.M010384200](https://doi.org/10.1074/jbc.M010384200)
- Velasquez-Perez L, Jimenez-Marcial ME (2003) Clinical-histopathologic concordance of tumors of the nervous system at the Manuel Velasco Suarez National Institute of Neurology and Neurosurgery in Mexico City. *Arch Pathol Lab Med* 127(2):187–192

- Waltz P, Carchman EH, Young AC, Rao J, Rosengart MR, Kaczorowski D, Zuckerbraun BS (2011) Lipopolysaccharide induces autophagic signaling in macrophages via a TLR4, heme oxygenase-1 dependent pathway. *Autophagy* 7(3):315–320. doi:[10.4161/auto.7.3.14044](https://doi.org/10.4161/auto.7.3.14044)
- Wang SH, Shih YL, Ko WC, Wei YH, Shih CM (2008) Cadmium-induced autophagy and apoptosis are mediated by a calcium signaling pathway. *Cell Mol Life Sci* 65(22):3640–3652. doi:[10.1007/s00018-008-8383-9](https://doi.org/10.1007/s00018-008-8383-9)
- Xu Y, Jagannath C, Liu XD, Sharafkhaneh A, Kolodziejaska KE, Eissa NT (2007) Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity* 27(1):135–144. doi:[10.1016/j.immuni.2007.05.022](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.05.022)
- Yu L, Wang L, Chen S (2012) Exogenous or endogenous Toll-like receptor ligands: which is the MVP in tumorigenesis? *Cell Mol Life Sci* 69(6):935–949. doi:[10.1007/s00018-011-0864-6](https://doi.org/10.1007/s00018-011-0864-6)