



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**EFFECTO DE LA VACUNACIÓN CON MICROVESÍCULAS DERIVADAS DE
GLIOMA C6 EN UN MODELO DE GLIOBLASTOMA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
OLASCOAGA ARELLANO NORA KAREN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. BENJAMÍN PINEDA OLVERA
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA
COMITÉ TUTOR: DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., ENERO, 2018



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**EFFECTO DE LA VACUNACIÓN CON MICROVESÍCULAS DERIVADAS DE
GLIOMA C6 EN UN MODELO DE GLIOBLASTOMA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

OLASCOAGA ARELLANO NORA KAREN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. BENJAMÍN PINEDA OLVERA

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA

COMITÉ TUTOR: DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

MÉXICO, CD. MX., ENERO, 2018

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 06 de noviembre de 2017, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **OLASCOAGA ARELLANO NORA KAREN** con número de cuenta **306142732**, con la tesis titulada **"EFECTO DE LA VACUNACIÓN CON MICROVESÍCULAS DERIVADAS DE GLIOMA C6 EN UN MODELO DE GLIOBLASTOMA"**, realizada bajo la dirección del **DR. BENJAMÍN PINEDA OLVERA**:

Presidente: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
Vocal: DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE
Secretario: DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN
Suplente: DR. JOSÉ LUIS MARAVILLAS MONTERO
Suplente: DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 07 de diciembre de 2017


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por permitirme realizar mis estudios de Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de Maestría otorgada (no de beca: 417258) y el financiamiento para la realización de esta tesis (proyecto CB180851 y FOSISS 262010).

A mi tutor principal, el Dr. Benjamín Pineda Olvera y a los miembros del Comité Tutor, el Dr. Karen Manoutcharian Airapetian y el Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade.

Índice

1. Resumen	1
2. Abstract	3
3. Introducción	4
3.1 Gliomas.....	4
3.1.1 Etiología de los gliomas.....	4
3.2 Astrocitomas	5
3.3 Glioblastoma	7
3.3.1 Tratamiento para el glioblastoma	8
3.4 Respuesta inmune antitumoral	8
3.5 Respuesta inmune en glioblastoma	10
3.6 Patrones Moleculares Asociados a Daño	13
3.7 Inmunoterapia en GBM	16
3.8 Microvesículas	17
4. Objetivo general	20
4.1 Objetivos particulares.....	20
5. Hipótesis.....	20
6. Antecedentes.....	21
7. Metodología.....	23
7.1 Cultivos celulares.....	23
7.2 Implante intraperitoneal de C6	23
7.3 Modelo subcutáneo de glioma	23
7.4 Aislamiento de microvesículas	24
7.5 Cuantificación de microvesículas	24
7.6 Microscopía electrónica de transmisión	24
7.6 Análisis de rastreo de nanopartículas	25
7.7 Electroforesis de proteínas	25

7.8 Diseño experimental	25
7. 9 Determinación del volumen tumoral.....	26
7. 10 Evaluación de las poblaciones de macrófagos, células NK y linfocitos T	26
7. 11 Determinación de apoptosis y necrosis.....	26
7. 12 Análisis estadístico.....	27
8. Resultados.....	28
8.1 Aislamiento y caracterización de las microvesículas.....	28
8.2 Vacunación con microvesículas en un modelo de glioblastoma subcutáneo	32
8.3 Evaluación de la apoptosis y necrosis en tumor	34
8.4 Efecto de la vacunación con MV en el porcentaje de linfocitos T cooperadores, T citotóxicos y T reguladores, macrófagos y células natural killer.....	36
9. Discusión	43
11. Conclusión.....	47
12. Literatura citada.....	48

1. Resumen

Los gliomas son tumores derivados de células gliales clasificados por la Organización Mundial de Salud en cuatro grados, donde el glioblastoma es el estadio más agresivo con una media de supervivencia menor a 2 años. El tratamiento convencional consiste en cirugía, radiación y quimioterapia; sin embargo, el pronóstico tan desfavorable deja ver la necesidad de desarrollar nuevas terapias, tales como las estrategias inmunoterapéuticas. Las microvesículas son producidas por casi todas las células, incluyendo las tumorales y tienen un papel importante en la regulación de la inmunidad. La posibilidad de que estas entreguen antígenos tumorales hace a las vacunas basadas en microvesículas un acercamiento terapéutico atractivo contra el glioblastoma. Diversos estudios han empleado vesículas extracelulares como vacunación, demostrando su viabilidad y seguridad, pero pobre inmunogenicidad. En este trabajo determinamos el efecto de la vacunación con microvesículas derivadas de células previamente irradiadas en un modelo de glioblastoma subcutáneo en rata. Para ello se cultivaron e irradiaron células C6 de glioma de rata. Se colectó el medio de cultivo y se ultracentrifugó para obtener las microvesículas, que fueron luego analizadas mediante análisis de rastreo de nanopartículas, microscopia electrónica de transmisión y electroforesis desnaturizante de proteínas. Se realizó un implante subcutáneo de células C6 en tres grupos de ratas (n=10). Una vez que los tumores alcanzaron 2 cm de diámetro, las microvesículas de C6 irradiadas o sin radiación emulsificadas en adyuvante completo de Freund, o solo adyuvante completo de Freund para el grupo control, se administraron por vía subcutánea en los días los días 0 y 7. Posteriormente, se determinó el crecimiento tumoral semanalmente durante 21 días y se evaluaron las poblaciones de linfocitos T cooperadores, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T reguladores, células NK y macrófagos en sangre, bazo y tumor mediante citometría de flujo. Observamos una disminución significativa de más de 60% en el volumen tumoral en el grupo tratado con microvesículas de C6 irradiadas en comparación al grupo control, además de un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos T cooperadores, linfocitos T citotóxicos y linfocitos T reguladores infiltrantes del tumor. De igual manera, se encontró un incremento en el porcentaje de células apoptóticas en tumor en el mismo grupo. Las poblaciones de NK y

macrófagos no presentaron cambios significativos. Así, podemos sugerir que las MV de C6 irradiadas inducen una respuesta antitumoral mediada por linfocitos T que incrementa la muerte celular por la apoptosis de las células tumorales.

2. Abstract

Gliomas are tumors derived from glial cells classified in four grades by the World Health Organization, where glioblastoma is the most aggressive stage with a mean survival of less than 2 years. Conventional treatment consists of surgery, radiation and chemotherapy; however, the poor prognosis reveals the need of developing new therapies, such as immunotherapeutic strategies. Microvesicles are produced by almost all cells, including tumor cells, and play an important role in immune system regulation. The possibility that microvesicles deliver tumor antigens, makes microvesicles-based vaccines an attractive therapeutic approach against glioblastoma. Several studies have used extracellular vesicles as vaccination, demonstrating their feasibility and safety, but poor immunogenicity. In this work, we determined the effect of microvesicles vaccination derived from irradiated cells in a subcutaneous glioblastoma model in rat. To achieve this, C6 cells from rat glioma were cultured and irradiated. The culture medium was collected and ultracentrifuged to obtain the microvesicles, which were then analyzed by nanoparticle tracking analysis, transmission electron microscopy and denaturing protein electrophoresis. Subcutaneous implantation of C6 cells in three groups of rats (n=10) was performed. Once tumors reached 2 cm in diameter, C6 microvesicles irradiated or not irradiated emulsified in Freund's complete adjuvant or Freund's complete adjuvant alone were administered subcutaneously on days 7 and 14. Subsequently, tumor growth was determined weekly for 21 days and subpopulations of T helper, T cytotoxic and T regulatory cells, NK cells and macrophages were evaluated in blood, spleen and tumor by flow cytometry. We observed a significant decrease of more than 60% in tumor volume in the group treated with irradiated C6 microvesicles compared to the control group and a significant increase in the percentage in infiltrating T helper, T cytotoxic and T regulatory cells. An increase in the percentage of apoptotic cells in tumors in the same group was also found. The populations of NK and macrophages did not show significant changes. Thus, we can suggest that irradiated C6 MV induce an anti-tumor response mediated by T lymphocytes that increases tumor cell death by apoptosis.

3. Introducción

3.1 Gliomas

La glía son células del sistema nervioso central (SNC) con funciones principalmente homeostáticas, incluyendo el mantenimiento del entorno iónico de las células nerviosas, la modulación de la velocidad de propagación de la señal nerviosa, la modulación de la acción sináptica controlando la captación de neurotransmisores, proporcionar andamiaje para algunos aspectos del desarrollo neuronal, y ayudar (o prevenir, en algunos casos) en la recuperación de la lesión neural (Purves et al., 2001). Los gliomas son tumores cerebrales que derivan de las células gliales o sus precursores. Estos constituyen los tumores primarios más comunes del SNC y presentan una incidencia anual estimada de 6.60 por cada 100,000 individuos en Estados Unidos (Ostrom et al., 2016). Con base en criterios histológicos, la Organización Mundial de la Salud clasifica a los gliomas en astrocitoma, oligodendroglioma, ependimoma, oligoastrocitoma, glioma maligno, no específico, y algunas histologías atípicas (D. N. Louis et al., 2016).

3.1.1 Etiología de los gliomas

La etiología de los gliomas no se ha esclarecido a la fecha. Sin embargo, diversos factores se han correlacionado con un mayor riesgo de desarrollar tumores cerebrales. Un estudio realizado en México, encontró un incremento de la incidencia de glioblastoma (GBM) con la exposición a pesticidas, herbicidas y fertilizantes, ya que una gran proporción de pacientes eran habitantes de comunidades rurales (Lopez-Gonzalez & Sotelo, 2000). Por otro lado, la radiación ionizante terapéutica se ha considerado también como un factor de riesgo. Hodges y colaboradores mostraron una prevalencia de 17% de irradiación terapéutica previa entre pacientes con GBM (Hodges, Smith, Garrett, & Tate, 1992). Otro estudio reportó dos veces más riesgo de presentar tumores cerebrales en personas expuestas a tomografías computarizadas en la infancia y adolescencia, con una relación dosis-respuesta (Mathews et al., 2013). En cuanto a la agregación familiar de los gliomas, se ha reportado en 5% de los casos (Malmer et al., 2001; Wrensch et al., 1997).

Hemminki y colaboradores reportaron que la Tasa de Incidencia Estandarizada para hijos de padres diagnosticados con astrocitomas fue del doble, mientras que entre hermanos la proporción fue del triple (Hemminki y Li, 2003a). Los gliomas se han asociado con diversos síndromes de predisposición genética. La neurofibromatosis tipo 1 se relaciona con una mayor incidencia de astrocitoma pilocítico, la neurofibromatosis tipo 2 está asociada con ependimomas espinales y la esclerosis tuberosa se asocia con astrocitomas de células gigantes. Así también, los individuos con síndrome de Li-Faumeni y el síndrome de Turcot muestran una mayor incidencia de gliomas (Weller et al., 2015).

3.2 Astrocitomas

Los astrocitomas son los gliomas más comunes y, con base en sus características histopatológicas, se dividen clínicamente en 4 grados: Grado I o astrocitoma pilocítico, grado II o astrocitoma difuso, grado III o astrocitoma anaplásico y grado IV o GBM, siendo este último el más común (Figura 1) (D. N. Louis et al., 2016, Ostrom et al., 2016). Los astrocitomas de bajo grado (I y II) son tumores bien diferenciados y de lento crecimiento, mientras que los gliomas de alto grado (III y IV) son menos diferenciados o anaplásicos, e infiltran fuertemente en el parénquima cerebral (Tabla 1) (David N. Louis et al., 2007).

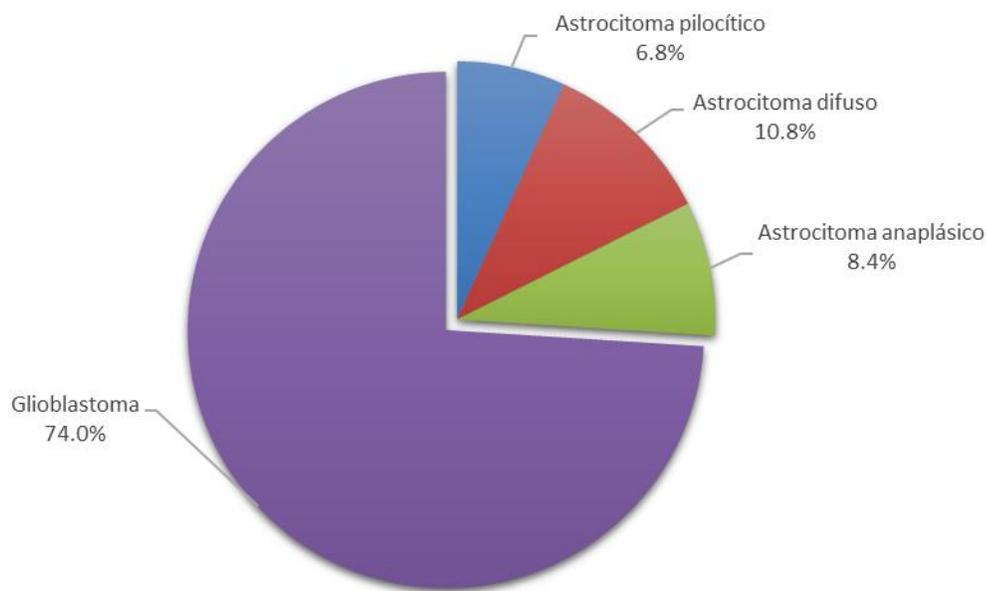
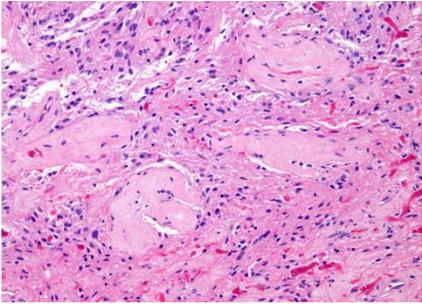
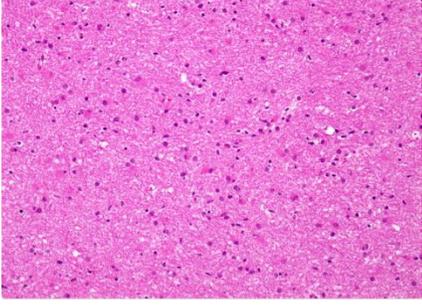
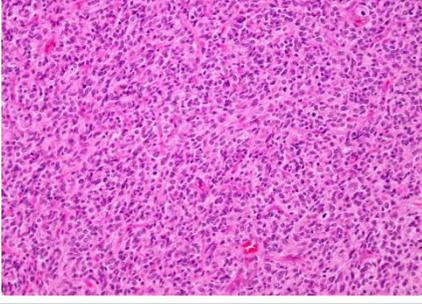
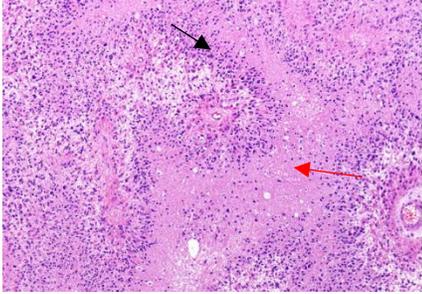


Figura 1. Distribución de los diferentes grados de astrocitomas en Estados Unidos en el periodo de 2009-2013. Modificado de Ostrom et al., 2016.

Tabla 1. Clasificación de la OMS para Astrocitomas

Grado/ Nomenclatura	Características histológicas	
I Astrocitoma pilocítico	Circunscrito; bifásico: células piloides y multipolares; microquistes, fibras de Rosenthal, cuerpos granulares; puede o no presentar figuras mitóticas poco comunes, proliferación vascular o necrosis focal.	
II Astrocitoma difuso	Celularidad de células monótonas moderada; atipia nuclear moderada; actividad mitótica limitada o ausente; sin proliferación vascular o necrosis.	
III Astrocitoma anaplásico	Celularidad e infiltración difusa incrementadas; atipia nuclear incrementada; actividad mitótica incrementada; sin proliferación vascular ni necrosis.	
IV Glioblastoma	Celularidad muy elevada; proliferación vascular y necrosis, células anaplásicas abundantes; atipia nuclear incrementada, actividad mitótica incrementada.	

Tomada de Louis DN, Ohgaki H, World Health Organization classification of tumors: pathology and genetics of the nervous system. IARC press 2007. Imágenes obtenidas de la página <http://www.webpathology.com/>, consultada el 22 de agosto de 2017.

3.3 Glioblastoma

El GBM es el tumor maligno del SNC más común en adultos, con incidencia de 3.20 por 100,000 habitantes en Estados Unidos (Ostrom et al., 2016). En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México (INNN), el GBM representa el 28% de los gliomas y el 9% de todos los tumores intracraneales. Este tipo de tumor es encontrado con una mayor frecuencia en hombres que en mujeres, con una proporción de 1.8:1 (Lopez-Gonzalez & Sotelo, 2000) y es dos veces más común en personas de raza blanca que de raza negra (Ostrom et al., 2016). El GBM es diagnosticado principalmente en edades avanzadas, con una media de 64.0 años. (Ostrom et al., 2016).

El GBM se caracteriza histopatológicamente por presentar crecimiento infiltrativo, heterogeneidad regional, alto índice de proliferación, atipia nuclear, proliferación microvascular y vascularización anormal altamente disfuncional, además de una gran región central necrótica (flecha negra Tabla 1) y células en pseudoempalizada (flecha roja Tabla 1) (Dimberg, 2014).

Por su desarrollo, el GBM se clasifica en primario y secundario. El GBM primario representa la mayoría de los casos (>90%), se manifiesta *de novo*, y al momento del diagnóstico se presenta como tumor completo, sin evidencia clínica, radiológica o histopatológica de una lesión precursora de menor malignidad (Wrensch, Minn, Chew, Bondy, & Berger, 2002). Predomina en pacientes mayores (62 años) y se distingue por rápida progresión y corto tiempo de supervivencia. Genéticamente, el GBM primario se caracteriza principalmente por pérdida completa del cromosoma 10, amplificación de *EGFR* (gen que codifica el receptor del factor de crecimiento epidérmico), delección de *p16^{INK4a}* y mutaciones en *PTEN* (gen que codifica la fosfatidilinositol-3, 4, 5-trisfosfato 3-fosfatasa). Por otro lado, el GBM secundario se desarrolla a través de la evolución de un astrocitoma grado II o III y se observa típicamente en pacientes más jóvenes (45 años), donde las mutaciones en *TP53*, pérdida en el cromosoma 19q y mutaciones en *IDH1* (gen que codifica la isocitrato deshidrogenasa 1) tienen un alta incidencia (Ohgaki & Kleihues, 2007, 2013).

3.3.1 Tratamiento para el glioblastoma

El tratamiento de referencia actual para el GBM consiste en cirugía, radioterapia y quimioterapia (R. Stupp et al., 2005). La cirugía es el primer paso en la intervención terapéutica, donde los pacientes se someten a una biopsia para proporcionar un diagnóstico histológico, cirugía citorreductiva, o resección máxima; dependiendo de la localización anatómica del tumor y estado clínico del paciente. La resección tumoral es de valor pronóstico, por lo que se busca que ésta sea máxima, siempre que la función neurológica no se vea comprometida. Sin embargo, es especialmente desafiante la extracción de estos tumores debido a su naturaleza infiltrante y difusa (Stupp, Tonn, Brada, & Pentheroudakis, 2010; Watts & Sanai, 2016). Después de la cirugía, se inicia la radioterapia fraccionada de haz externo, con una dosis estándar total de 60 Gy en 30 fracciones (Yang, Zhou, & Lin, 2014). Por otro lado, la quimioterapia se basa principalmente en el uso del agente alquilante temozolamida, que se administra de manera concomitante a la radioterapia y posterior a esta como quimioterapia adyuvante (R. Stupp et al., 2005).

A pesar de este tratamiento multimodal, la media de supervivencia de los pacientes con GBM es de 14.6 meses y solo el 5.5% de pacientes sobreviven más de 5 años, perspectiva que no ha cambiado en las últimas dos décadas (Ostrom et al., 2016; R. Stupp et al., 2005). La dificultad radica principalmente en la heterogeneidad entre pacientes y la heterogeneidad genética intratumoral, la inmunosupresión, la limitada penetración terapéutica de la barrera hematoencefálica y la recurrencia (Srinivasan et al., 2017).

3.4 Respuesta inmune antitumoral

El sistema inmune es capaz de identificar y eliminar células tumorales nacientes en un proceso denominado vigilancia inmune, donde células del sistema inmune innato y adaptativo, moléculas efectoras, y vías de señalización actúan como mecanismos supresores de tumor (Vesely, Kershaw, Schreiber, & Smyth, 2011).

Cuando un tumor comienza a crecer invasivamente, su requerimiento de sangre se incrementa, conduciendo a la producción de citocinas estromagénicas y angiogénicas. El crecimiento invasivo produce microlesiones en el tejido circundante, que inducen señales inflamatorias y con ello el reclutamiento de células del sistema inmune innato, como células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés), macrófagos y células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés) (Dunn, Bruce, Ikeda, Old, & Schreiber, 2002).

Las células NK juegan un papel importante en la supresión de metástasis y el rechazo de tumor, además son importantes productoras de interferón gamma (INF- γ). El INF- γ producido tiene el potencial de ejercer efectos antitumorales directos, como inhibición de la proliferación de las células cancerosas o apoptosis (Kim, Iizuka, Aguila, Weissman, & Yokoyama, 2000; Parker, Rautela, & Hertzog, 2016).

Las quimiocinas producidas durante el proceso inflamatorio reclutan más células NK y macrófagos al sitio. Éstas células infiltrantes del tumor se transactivan unas a las otras por la producción recíproca de IFN- γ e Interleucina 12 (IL-12), eliminando un mayor número de células tumorales por mecanismos que involucran el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis (TRAIL, por sus siglas en inglés), la proteína formadora de poros (perforina) y las proteasas de serina llamadas granzimas, así como intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno (Dunn et al., 2002). Estudios *in vitro* han demostrado que las células NK ejercen actividad citolítica contra una variedad de líneas celulares tumorales (Adam, Odhav, & Bhoola, 2003).

Los antígenos tumorales liberados a la periferia del tumor tras la muerte de las células cancerosas pueden ser capturados por DC. Estas DC pueden ser activadas mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por sus siglas en inglés), mediado por receptores tipo Toll (TLRs, por sus siglas en inglés). Los DAMPs en condiciones patológicas como el cáncer, se liberan de tejidos lesionados o inflamados, células muertas, o se secretan activamente de forma no convencional a través de lisosomas. La activación de las DC se caracteriza por la inducción de la expresión de moléculas de superficie involucradas en la presentación de antígenos y coestimulación

como moléculas del MHC clase II, CD40, CD80 y CD86, junto con la liberación de citocinas inflamatorias como las interleucinas IL-1b, IL-6, IL-12 y el factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés) (Gardner & Ruffell, 2016; Sologuren, Rodríguez-Gallego, & Lara, 2014). Las células dendríticas activadas migran a los órganos linfoides secundarios donde los péptidos derivados de antígenos tumorales son presentados a linfocitos CD4+ de manera dependiente de moléculas del MHC de clase II.

Los linfocitos T CD4+ funcionan como cooperadores produciendo citocinas para activar a linfocitos T CD8+ citotóxicos antitumorales, células NK y macrófagos. Los linfocitos T CD4+ (particularmente Th1) secretan IFN- γ , el cual induce la expresión de moléculas del MHC de clase I en células tumorales, además de inhibir la angiogénesis (Haabeth et al., 2014; Sologuren et al., 2014).

Los linfocitos T CD8+ que expresan receptores de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés) que reconocen péptidos en moléculas del MCH de clase I sobre la superficie de células cancerosas, juegan un papel central en la inmunidad antígeno-específica contra tumores (Kershaw, Trapani, & Smyth, 1995). La estimulación a través del TCR de linfocitos T CD8+ induce la activación de mecanismos efectores, incluyendo la expresión de ligandos de muerte, como el ligando de Fas (Fas L) y el ligando inductor de apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral (TRAIL, por sus siglas en inglés), así como la exocitosis de gránulos que contienen granzimas y perforina. Esta última facilita la translocación de las granzimas hacia el citosol, donde escinden diversos sustratos para inducir la muerte de la célula blanco (Martínez-Lostao, Anel, & Pardo, 2015).

3.5 Respuesta inmune en glioblastoma

El sistema nervioso central, y particularmente el cerebro, se han considerado como órganos “inmunoprivilegiados” debido a que se encuentran protegidos contra la entrada de patógenos, células inmunitarias y factores circulantes en sangre, por una barrera hematoencefálica intacta, aunado a la escasez de células presentadoras de antígeno profesionales (APC, por sus siglas en inglés), baja expresión de moléculas del MHC de

clase I y II, y la aparente ausencia de un sistema linfático clásico (Forrester, Xu, Lambe, & Cornall, 2008).

Sin embargo, a pesar de esta barrera física, las interacciones entre el SNC y el sistema inmune ocurren tanto en estado de homeóstasis como en enfermedad. Se ha demostrado que los antígenos derivados del SNC inducen una respuesta inmune en los ganglios linfáticos cervicales profundos, que la respuesta inmune en el SNC tiene efectos benéficos y perjudiciales sobre la función cerebral, y que el SNC posee un sistema linfático funcional dentro de las meninges que drenan los constituyentes solubles y celulares del líquido cefalorraquídeo hacia los ganglios linfáticos cervicales profundos (Louveau, Harris, & Kipnis, 2015).

Además, la función y organización de la barrera hematoencefálica puede alterarse en presencia de diversas condiciones patológicas, tales como esclerosis múltiple, epilepsia, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, demencia, accidente cerebrovascular y cáncer cerebral (van Tellingen et al., 2015).

En tumores cerebrales de bajo grado, tales como los gliomas grado I y II, la vascularización y la función de la barrera hematoencefálica tumoral permanecen casi intactas y se asemeja a la barrera hematoencefálica en condiciones normales (Bhowmik, Khan, & Ghosh, 2015). En cambio, se ha observado que los tumores cerebrales de alto grado, tal como el GBM, se caracterizan por alteraciones importantes de la función vascular normal, lo que produce disrupción de la barrera hematoencefálica, además de necrosis tumoral y expulsión de antígenos (Dhermain, Hau, Lanfermann, Jacobs, & van den Bent, 2010; Lyon, Mokarram, Saxena, Carroll, & Bellamkonda, 2017). Dicha interrupción es importante para la atracción e invasión de macrófagos, DC y linfocitos desde la periferia al lecho tumoral (Lyon et al., 2017).

Una característica común de los gliomas, es la acumulación de macrófagos asociados a tumor (TAM) y/o células inmunes residentes como la microglia, que en el GBM pueden comprender hasta un 40% de la masa tumoral. Se ha considerado que, bajo la influencia

de las células de glioma, los TAM pueden desempeñar un papel importante en la creación de un microambiente inmunosupresor que promueve el crecimiento tumoral. Las células de glioma favorecen la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo inmunosupresor (tipo M2) en lugar de un fenotipo inflamatorio (tipo M1), por lo que el microambiente es rico en factores proangiogénicos y factores solubles que favorecen la invasión, como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , por sus siglas en inglés), IL-10, factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, por sus siglas en inglés), y metalopeptidasa de matriz 9 (Kennedy et al., 2013; Lapa et al., 2015)

Entre los linfocitos infiltrantes se han encontrado linfocitos T citotóxicos vírgenes (CD8+) y linfocitos T cooperadores (CD4+). Además, en tumores de alto grado ocurre una importante infiltración de linfocitos T reguladores (Treg) que son atraídos por quimiocinas, como CCL22 y TGF- β , y que cuando se encuentran activados pueden suprimir la proliferación y producción de citocinas de linfocitos efectores llevando a fenotipos de tumores cerebrales más agresivos. (Lyon et al., 2017).

Las DC, particularmente las DC plasmacitoides (pDC), son las células presentadoras de antígenos mayoritarias en los gliomas y se caracterizan por segregar gran cantidad de Interferón alfa (IFN- α), llevar a cabo el procesamiento de antígenos e inducir inmunidad o tolerancia a las células T. Sin embargo, en tumores cerebrales, su función inmunológica está típicamente atrofiada, ya que son deficientes en la producción de IFN- α , limitando así la maduración de las células T (Dey et al., 2015).

Por otro lado, las células NK, son la población celular menos abundante dentro del microambiente tumoral cerebral (Kmiecik, Zimmer, & Chekenya, 2014). Se ha observado un número disminuido de NK en células mononucleares de sangre periférica aisladas de pacientes con GBM tratados con radioterapia y temozolamida combinadas. Además, se han mostrado niveles plasmáticos elevados de moléculas antiinflamatorias en el contexto de tumores cerebrales, como TGF- β , que podrían inhibir funciones de las células NK y la expresión de su receptor activador NKG2D, un mecanismo común de escape inmunológico que se encuentra también en otros tumores sólidos (Poli et al., 2013).

3.6 Patrones Moleculares Asociados a Daño

Los patrones moleculares asociados a daño o a peligro, DAMPs, son moléculas endógenas que bajo condiciones fisiológicas normales se encuentran secuestradas intracelularmente sin ser reconocidas por el sistema inmune, pero que bajo condiciones de estrés o daño como trauma mecánico, isquemia, radiación ultravioleta o radiación gamma son expuestas en la membrana celular o liberadas al ambiente extracelular (Land, 2015).

Evidencia reciente sugiere que ciertas formas de muerte celular programada, como la muerte celular inmunogénica (ICD, por sus siglas en inglés), pueden también desencadenar la emisión de DAMPs al espacio extracelular luego de tratamientos antitumorales como la radioterapia y algunos agentes quimioterapéuticos, fomentando una potente respuesta inmune antitumoral de refuerzo terapéutico (Hernandez, Huebener, & Schwabe, 2016).

La liberación de los DAMPs a partir de diversos componentes celulares como la mitocondria, el núcleo, el citoplasma y el retículo endoplásmico (Tabla 2), puede ocurrir tanto de manera pasiva por células necróticas como de forma activa por células apoptóticas en respuesta a la radioterapia o quimioterapia. (Krysko, Love Aaes, Bachert, Vandenabeele, & Krysko, 2013).

Los DAMPs son reconocidos por una amplia familia de receptores de reconocimiento de patrones citoplasmáticos o de membrana, incluyendo receptores tipo Toll (TRLs), receptores de productos finales de glicación avanzada (RAGE, por sus siglas en inglés), receptores tipo NOD (NLRs, por sus siglas en inglés), receptores tipo RIG-I (RLRs, por sus siglas en inglés), receptores de purinas, entre otros. (Krysko et al., 2013). La señalización mediante estos receptores, induce la liberación de citocinas proinflamatorias y el aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras que resultan en la activación del sistema inmune adaptativo (Akira, Uematsu, & Takeuchi, 2006) (Figura 2).

Tabla 2. Fuente de DAMPs intracelulares y sus receptores

Compartimento celular/organelo	DAMP	Receptor
Citosol	Ácido úrico	NLRP3
	Proteínas S100	TRL2, TLR4, RAGE
	Proteínas de choque térmico	TLR2, TLR4
Membrana plasmática	Proteoglicanos	TLR4
Mitocondria	mtDNA	TLR9
	Péptidos formilados	FRP1
	ATP	P2X7
	mROS	NLRP3
	Mitocondria intacta	-
Núcleo	HMGB1	TLR2, TLR4, NLRP3
	Histonas	TLR2, TLR4, NLRP3
	DNA	TLR9
Retículo endoplásmico	Calreticulina	CD91

FPR1: receptor de péptidos formilados; mROS; especies reactivas de oxígeno mitocondriales, HMGB1: proteína de alta movilidad del grupo de caja 1; DNA: ácido desoxirribonucleico, ATP: trifosfato de adenosina; P2X7: receptor purinérgico. Traducido y modificado de (Schaefer, 2014).

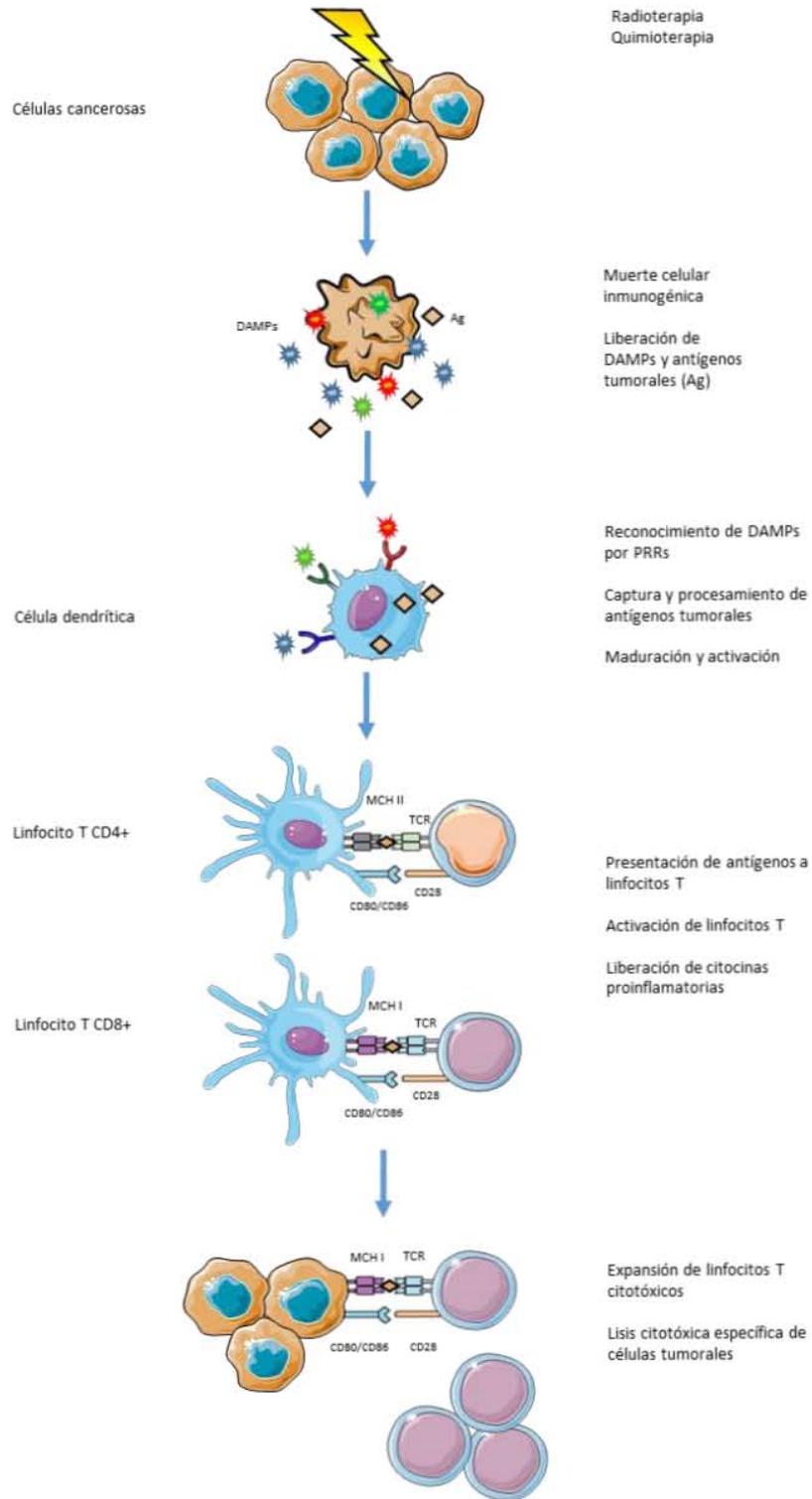


Figura 2. La radioterapia y quimioterapia pueden promover la muerte inmunogénica de células cancerosas que se acompaña de la liberación de señales de daño o DAMPs. Los DAMPs funcionan como adyuvantes endógenos para la maduración y activación de DC que posteriormente activan al sistema inmune adaptativo para la erradicación de células tumorales.

3.7 Inmunoterapia en GBM

Debido al pobre pronóstico de los pacientes con GBM, es una prioridad el desarrollo de terapias más eficaces. Entre las más estudiadas actualmente se encuentra la inmunoterapia. Esta es una estrategia de tratamiento que aprovecha la capacidad del sistema inmunológico del paciente, incluyendo células, anticuerpos y citocinas, para atacar y eliminar células malignas (Alatrash, Jakher, Stafford, & Mittendorf, 2013).

La inmunoterapia puede clasificarse en dos grandes categorías: pasiva y activa. La inmunoterapia pasiva involucra la administración de anticuerpos contra antígenos asociados a tumor o alternativamente, la transferencia adoptiva de linfocitos T específicos de antígeno a los pacientes, sin inducir o expandir específicamente una respuesta antitumoral. Por otro lado, la inmunoterapia activa involucra la generación o aumento de la respuesta inmune propia del paciente a antígenos tumorales, típicamente mediante la vacunación. (Mitchell, Fecci, & Sampson, 2008; Sayegh, Oh, Fakurnejad, Bloch, & Parsa, 2014).

Las vacunas para el GBM han sido el foco de gran interés en los últimos años, representando la estrategia inmunoterapéutica más estudiada. Estas se caracterizan con base en la forma en que se presentan los antígenos al sistema inmune. Las vacunas basadas en células consisten en APC (p. ej. células dendríticas) que son puestas en contacto con antígenos *ex vivo* y reintroducidas al hospedero vía vacunación. Las células dendríticas han sido cultivadas con péptidos derivados de glioma, lisado tumoral, mRNA (ácido ribonucleico mensajero) derivado de tumor, células troncales de glioma y antígenos virales. Por otra parte, con las vacunas basadas en antígenos los pacientes con glioma son inoculados con antígenos asociados a tumor que a su vez son presentados a APC del hospedero para despertar una respuesta inmune dirigida hacia el tumor. Se ha estudiado el uso de péptidos (EGFRvIII, IDH1, WT-1 y survivina), proteínas de choque térmico (HSP70 y HSP90) y vacunas multipeptídicas para este objetivo (Han, Zygourakis, Lim, & Parsa, 2012; Srinivasan et al., 2017).

Una forma eficiente de presentar múltiples antígenos asociados a tumor, es el uso de vesículas extracelulares (VE) (microvesículas (MV) y exosomas) de células cancerosas. Las VE están rodeadas por una membrana de fosfolípidos y contienen combinaciones específicas de proteínas, incluyendo enzimas, factores de crecimiento, receptores y citocinas, así como lípidos y ácidos nucleicos; y se han empleado como vacunación en estudios clínicos con diversos tipos de cáncer (Lener et al., 2015), por lo que podrían ser una alternativa novedosa en la inmunoterapia contra el GBM.

3.8 Microvesículas

Las vesículas extracelulares son partículas de membrana de bicapa lipídica que son liberadas de la mayoría de las células, incluyendo las tumorales, de forma constitutiva o como respuesta al estrés; estas pueden ser aisladas de diversos fluidos corporales como sangre, orina, saliva, leche materna, fluido amniótico, ascitis, semen y líquido cefalorraquídeo (Y. Lee, El Andaloussi, & Wood, 2012).

La liberación de VE fue reportada originalmente en 1946 como partículas procoagulantes derivadas de plaquetas en el plasma normal (Chargaff & West, 1946) y denominadas posteriormente como "polvo de plaquetas" por Wolf en 1967, quien notó material coagulante en forma de partículas pequeñas, sedimentables por centrifugación a alta velocidad y que rodeaban plaquetas activadas (Wolf, 1967). En 1978, las VE fueron por primera vez documentadas en un paciente con cáncer cuando se identificaron mediante microscopía electrónica en cultivos de nódulos del bazo y nódulos linfáticos de una persona con enfermedad de Hodgkin (Friend et al., 1978).

Las microvesículas (MV) (también referidas como micropartículas o ectosomas) representan un subtipo específico de VE; son partículas de tamaño heterogéneo, que van desde 200 nm hasta más de 1 μ m de diámetro, y que son liberadas al espacio extracelular mediante fisión hacia el exterior de la membrana plasmática (Figura 3) (Cocucci, Racchetti, & Meldolesi, 2009; Muralidharan-Chari et al., 2009). El mecanismo exacto por el cual se generan las MV no ha sido totalmente descrito, pero se sabe que ocurre una

pérdida de asimetría de lípidos de membrana (Zwaal & Schroit, 1997). En el sitio donde se liberan las microvesículas, el aminofosfolípido fosfatidilserina, normalmente encontrado en la cara citoplasmática de la membrana, es relocalizado a la capa externa mientras que la topología de las proteínas de membrana permanece intacta (Lima, Chammas, Monteiro, Moreira, & Barcinski, 2009). Además, se ha encontrado la participación del factor de ribosilación de ADP 6 (ARF6, por sus siglas en inglés), en la regulación del mecanismo de abscisión de la membrana basado en actomiosina (Muralidharan-Chari et al., 2009).

Proteínas de membrana, como receptores de factores de crecimiento, receptores de integrinas, moléculas del MHC de clase I, y proteínas solubles como proteasas y citocinas, así como ácidos nucleicos han sido encontrados en microvesículas, además de estar enriquecidas en algunos lípidos como colesterol y esfingomieline, además de la fosfatidilserina (Figura 3) (Muralidharan-Chari, Clancy, Sedgwick, & D'Souza-Schorey, 2010).

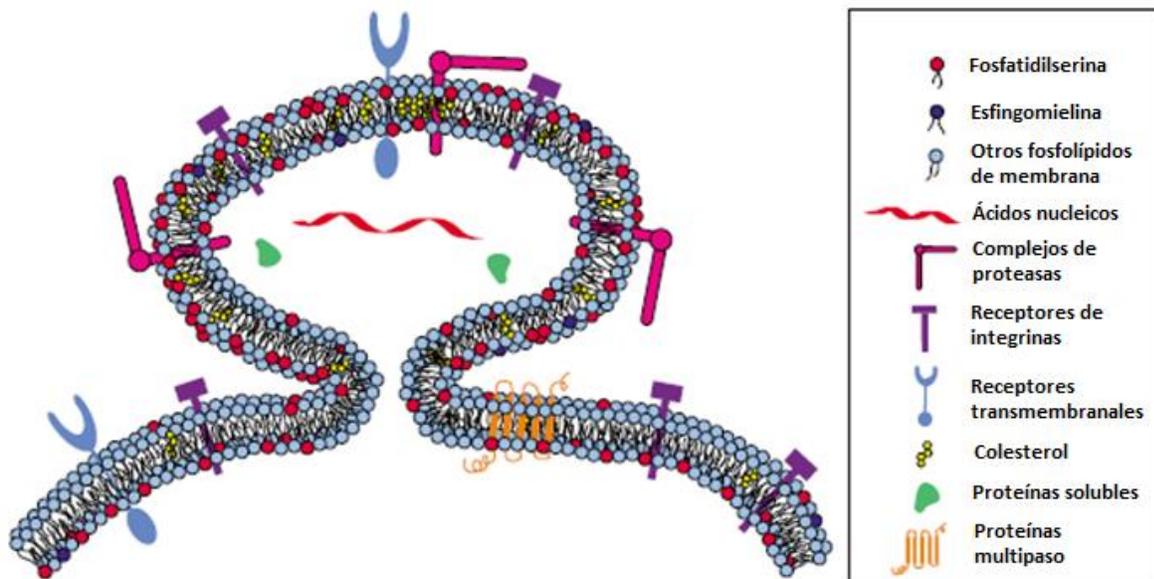


Figura 3. Composición de las microvesículas. Traducida de Muralidharan-Chari, 2010.

La importancia de las MV reside en su capacidad para transferir su contenido a otras células de forma local o sistémica. Una vez producidas por la célula donadora, las MV pueden: 1) unirse vía receptores a la superficie de una célula blanco; 2) fusionarse con

la membrana de la célula blanco y descargar su contenido en el citosol; o 3) ser tomadas por la célula mediante endocitosis. Luego de ser endocitadas pueden permanecer aisladas dentro de los endosomas y en última instancia, fusionarse con los lisosomas. Alternativamente, pueden fusionar su membrana con la del endosoma y subsecuentemente descargar su contenido al citosol (transferencia horizontal) o ser expulsadas intactas al exterior (transcitosis) (Cocucci et al., 2009).

La composición de las MV, depende ampliamente del tipo de célula de la cual se originaron; aunque la composición de la membrana de las MV es distinta de la célula parental, con una remodelación significativa (Muralidharan-Chari et al., 2009). Las moléculas presentes en las MV derivadas de células cancerosas contienen una plétora de moléculas bioactivas que incluye antígenos involucrados en inmunomodulación, receptores y ligandos transmembranales, oncoproteínas y proteínas supresoras de tumor, lípidos, mRNA, microRNA y DNA genómico y mitocondrial (T. H. Lee et al., 2011). Estas MV derivadas de células tumorales pueden fusionarse e interactuar con múltiples tipos celulares, pudiendo modificar y establecer nichos premetastásicos, promover la invasión celular y la angiogénesis, así como modular la respuesta inmune (Arscott et al., 2013; Ratajczak et al., 2006).

4. Objetivo general

Evaluar si la vacunación con microvesículas derivadas de células de glioma C6 irradiadas induce una respuesta inmune específica capaz de disminuir el crecimiento tumoral en un modelo de glioblastoma subcutáneo

4.1 Objetivos particulares

- Aislar y caracterizar microvesículas provenientes del cultivo de células C6 y de células C6 irradiadas.
- Determinar la cinética de crecimiento tumoral en ratas tratadas con microvesículas de células C6 y de células C6 irradiadas en un modelo subcutáneo de glioblastoma.
- Evaluar la apoptosis y necrosis de células tumorales en ratas tratadas con microvesículas de células C6 y de células C6 irradiadas.
- Evaluar los porcentajes en sangre, bazo y tumor, de linfocitos T cooperadores, T citotóxicos y T reguladores, macrófagos y células asesinas naturales en ratas tratadas con microvesículas de células C6 y de células C6 irradiadas en un modelo subcutáneo de glioblastoma.

5. Hipótesis

La vacunación con microvesículas derivadas de células irradiadas inducirá una respuesta inmune antitumoral que disminuirá el volumen tumoral en un modelo de glioblastoma subcutáneo.

6. Antecedentes

Durante las últimas décadas, la investigación de vesículas extracelulares (VE) se ha incrementado de manera importante y se ha considerado su aplicación en la vacunación antitumoral (Vader, Breakefield, & Wood, 2014). Se han llevado a cabo estudios clínicos en pacientes con cáncer donde se han empleado VE derivadas de células neoplásicas. En un estudio fase I, realizado en 15 pacientes con melanoma metastásico etapa III/IV, se demostró la viabilidad de la producción de VE a partir de células dendríticas autólogas derivadas de monocitos cargadas con el péptido MAGE3, así como la seguridad de su administración subcutánea; sin que se observara toxicidad importante (>grado II) (Escudier et al., 2005). En otro estudio Fase I, se emplearon VE de células dendríticas derivadas de monocitos cargadas con péptidos que se administraron de manera subcutánea e intradérmica en 13 pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado; la terapia fue bien tolerada (toxicidad grado I-II) y algunos pacientes experimentaron estabilidad de la enfermedad a largo plazo y activación de efectores inmunes (Morse et al., 2005). Dai y colaboradores realizaron un estudio clínico Fase I con 40 pacientes con cáncer de colón etapa III y IV; se administraron VE autólogas derivadas de líquido de ascitis vía subcutánea solas o acompañadas de factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF, por sus siglas en inglés) donde se demostró su seguridad e inducción de respuestas específicas de células T citotóxicas contra el tumor (Dai et al., 2008). Sin embargo, se encontró que las VE fueron poco inmunogénicas. En un estudio más reciente Fase II en pacientes con cáncer de pulmón, con la finalidad de incrementar la inmunogenicidad de las VE, se empleó IFN- γ para madurar a las células dendríticas de la cual se obtuvieron tales VE. Se observó como resultado 32% pacientes con estabilización de la enfermedad por 4 meses (Besse et al., 2016) (Tabla 3).

Por otra parte, Graner y colaboradores demostraron en un modelo de glioblastoma murino que la vacunación profiláctica con VE inducía la activación del sistema inmune estimulando la inmunidad humoral y celular por células T, evitando así la implantación del tumor y favoreciendo una respuesta de memoria de largo plazo; sin embargo, al usar

estas VE en vacunación terapéutica no fueron capaces de modificar la supervivencia de los ratones implantados de manera intracerebral, a pesar de inducir una respuesta inmune celular y humoral (Graner et al., 2009).

Tabla 3

Estudios clínicos con VE como tratamiento para el cáncer.

Tipo de cáncer	Fase del estudio	Vía de administración	Fuente de VE	Resultado	Referencia
Melanoma	I	Subcutánea	DC pulsadas con péptidos antigénicos de tumor	Viabilidad y seguridad; toxicidad < Grado II Poco inmunogénico	Escudier et al., 2005
Colon	I	Subcutánea	DC pulsadas con péptidos antigénicos de tumor	Viable y seguro; toxicidad Grado I-II	Dai et al., 2008
Pulmón	I	Subcutánea e intradérmica	Ascitis autóloga	Viable y seguro; toxicidad < Grado I-II	Morse et al., 2005
Pulmón	II	Intradérmica	DC maduras con IFN- γ y pulsadas con péptidos antigénicos de tumor	32% de los participantes experimentaron estabilización por más de 4 meses; Inmunidad antitumoral.	Besse et al., 2016

7. Metodología

7.1 Cultivos celulares

Las células de glioma C6 de rata fueron obtenidas de la Colección Americana de Cultivos y Tejidos (Rockville, MD, USA). Las células se cultivaron en esterilidad a 37 °C en una atmósfera húmeda controlada con CO₂ al 5% en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (GIBCO BRL) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (GIBCO, BRL.), 4 mM de glutamina, 100 unidades/ml de penicilina, y 100 mg/ml de estreptomina. Antes de ser usado, el medio suplementado fue filtrado con una membrana GSWP de 0.22 µm (Millipore) para eliminar posibles MV contaminantes.

7.2 Implante intraperitoneal de C6

Una vez que los cultivos de células C6 llegaron a confluencia, fueron lavados con solución salina, se colectaron las células mediante tratamiento con tripsina al 0.25% (Sigma Aldrich) y se suspendieron en medio de cultivo DMEM. Se realizó el conteo de células viables mediante la exclusión del colorante azul tripano y posteriormente se inocularon 1 x 10⁶ células C6 viables en 500 µL de medio DMEM vía intraperitoneal en ratas Wistar con la finalidad de obtener una cantidad abundante de células C6 para realizar el implante subcutáneo (Guevara & Sotelo, 1999). Después de tres semanas, las ratas fueron sacrificadas, se diseccionó el tumor y se disgregó mecánicamente a 4 °C en esterilidad. Las células fueron suspendidas en solución salina y conservadas a 4°C hasta su empleo.

7.3 Modelo subcutáneo de glioma

Para el implante de células de glioma C6, se emplearon ratas Wistar macho de 180-200 g que fueron alimentadas *ad libitum*. Se inocularon 1x10⁶ células viables suspendidas en 500 µl de solución salina en el flanco derecho de las ratas de manera subcutánea. Se

permitió el desarrollo del tumor durante tres semanas y se seleccionaron las ratas cuyo tumor alcanzara un diámetro no menor de 2 cm para su posterior tratamiento.

7.4 Aislamiento de microvesículas

Las microvesículas se obtuvieron de cultivos de células C6 y de células C6 irradiadas con una dosis de 50 Grays (Gy) empleando un acelerador lineal Novalis (Varian y Brainlab) que genera un haz de rayos X de 6 mega voltios. Después de 72 h de la radiación, el medio de cultivo fue colectado y centrifugado dos veces a una velocidad de 500 x g por 10 minutos a 4°C para eliminar las células viables y restos celulares. El sobrenadante se centrifugó a 14,000 x g por 20 minutos a 4°C para sedimentar las microvesículas, que inmediatamente fueron lavadas y resuspendidas en PBS (Diagrama 1).

7.5 Cuantificación de microvesículas

Para su cuantificación, las microvesículas se tiñeron con Anexina V-FITC (Annexin-V-FLUOS Staining Kit, Roche) que presenta gran afinidad por la fosfatidilserina, y se analizaron por citometría de flujo (FACSCalibur, BD Bioscience). Para el análisis de datos se emplearon los programas Cell QuestPro (BD Bioscience) y Flow Jo versión 10.

7.6 Microscopía electrónica de transmisión

Una vez colectadas, las microvesículas fueron teñidas con el conjugado Anexina V-oro (15 nm, Biorbyt) durante 30 minutos, se centrifugaron a 14,000 x g durante 20 minutos a 4°C y el pellet se resuspendió en PBS. Posteriormente, se colocaron 10 µl de la suspensión en rejillas de níquel revestidas de carbón y formvar por 20 minutos. La rejilla se secó con papel filtro se tiñó con acetato de uranilo al 2% durante 5 minutos. Se retiró la rejilla del acetato de uranilo y se lavó con agua destilada por un minuto. Las microvesículas se observaron con un microscopio de transmisión JEOL 1010.

7.6 Análisis de rastreo de nanopartículas

El tamaño de las microvesículas se examinó mediante un análisis de rastreo de nanopartículas con un NanoSight (NanoSight Ltd Amesbury, UK) equipado con un láser azul (488 nm) y una cámara sCMOS. Las preparaciones fueron medidas por triplicado (temperatura 22.0°C; viscosidad 0.95 cP) durante 10 s. El software usado para la captura y análisis de datos fue el NTA 3.2 Dev Build 3.2.16.

7.7 Electroforesis de proteínas

Se realizó la extracción de proteínas a partir de células C6, microvesículas de C6 y microvesículas de C6 irradiadas empleando el ProteoJET™ Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction Kit (Fermentas), y posteriormente fueron cuantificadas mediante el método de Lowry. Se realizó la electroforesis de las proteínas (30 mg) en condiciones desnaturizantes en un gel de poliacrilamida al 15 %. Se empleó Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad) como marcador de peso molecular. Una vez terminada la electroforesis, el gel fue teñido con azul de Coomassie.

7.8 Diseño experimental

Treinta ratas, a las que se les inocularon células C6 y cuyo tumor tuviera un diámetro no menor de 2 cm, fueron separadas en tres grupos (n=10): el primero fue administrado con PBS (grupo control), el segundo grupo fue tratado con microvesículas de células C6 y el tercer grupo con microvesículas de células C6 irradiadas (1×10^7 microvesículas). Los tratamientos y el PBS fueron emulsionados con adyuvante completo de Freund a una proporción de 1:1 y se administraron de manera subcutánea en el muslo contralateral al tumor en las ratas. Se realizó una segunda administración (refuerzo) 7 días posteriores a la primera. Se registró el volumen tumoral inicial y se evaluó a los 7, 14, 18 y 21 días midiendo los tres diámetros del tumor con un vernier calibrado. Los animales fueron sacrificados 21 días posteriores al tratamiento por exanguinación (previa anestesia con Ketamina/Xilacina) y se colectó el tumor, la sangre y el bazo para su análisis.

7. 9 Determinación del volumen tumoral

El volumen tumoral (cm³) se calculó para cada rata y tiempo mediante la siguiente fórmula (Tomayko & Reynolds, 1989):

$$\frac{\pi}{6} \times \text{largo} \times \text{ancho} \times \text{altura}$$

7. 10 Evaluación de las poblaciones de macrófagos, células NK y linfocitos T

Se determinaron los porcentajes de linfocitos T cooperadores (CD4+), T citotóxicos (CD8+) y T reguladores (CD4+/CD25+/FoxP3+), así como de células asesinas naturales (NKR-P1+) y macrófagos (CD68+) en muestras de sangre, bazo y tumor mediante citometría de flujo empleando los anticuerpos monoclonales anti-CD4-PE de rata, anti-CD8-PE de rata, anti-NKR-P1-FITC de rata, anti-CD25-FITC de rata, anti-Foxp3-APC de rata y anti-CD68 de rata, este último junto con un anticuerpo secundario acoplado a APC. Brevemente, se incubaron 30 µL de sangre o de homogenado de bazo o tumor con 5 µL del anticuerpo monoclonal correspondiente (dilución 1:100) durante 30 minutos. Posteriormente, se añadieron 200 µL de solución de lisis de glóbulos rojos (BD Bioscience), se incubaron las muestras durante 10 minutos y fueron lavadas con PBS. Para los linfocitos T reguladores, además se adicionaron 200 µL de solución de permeabilización (BD Bioscience), se incubaron durante 10 minutos, se lavaron e incubaron con anti-FoxP3-APC durante 30 min. Todas las células, después de ser lavadas con PBS, fueron fijadas con paraformaldehído al 1% en PBS. Las células fueron analizadas con un equipo FACSCalibur (BD Biosciences) usando los programas CellQuest Pro (BD Bioscience) y Flow Jo versión 10.

7. 11 Determinación de apoptosis y necrosis

Una parte del homogenado de tumor fue tomado para evaluar apoptosis y necrosis. Las células se lavaron con PBS y se tiñeron con Anexina V y yoduro de propidio (Annexin-V-FLUOS Staining Kit, Roche) en 100 µL de buffer de unión durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 200 µL más de buffer

de unión y se analizaron por citometría de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences) con Cell QuestPro (BD Biosciences) y Flow Jo versión 10.

7. 12 Análisis estadístico

Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk a los datos. Posteriormente se comparó cada tratamiento con el control mediante t-student o U-Mann, según el caso. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado como significativo. Para este análisis se empleó el programa SPSS Statistic 23.0 (IBM SPSS Statistics para Windows, Versión 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

8. Resultados

8.1 Aislamiento y caracterización de las microvesículas

Aislamos MV de glioma a partir de cultivos de la línea celular C6. Un grupo de células en cultivo fue mantenido en condiciones control, mientras que otro se sometió a radiación con una dosis de 50 Gy. Se observaron los cultivos mediante microscopia de campo claro, donde las células irradiadas mostraron morfología diferente a las células control, además de la formación de vesículas como se muestra en la Figura 5A. El medio de cultivo de las células fue colectado y centrifugado a baja velocidad para descartar células intactas y detritos celulares; el sobrenadante obtenido fue ultracentrifugado para así obtener el pellet correspondiente a las MV (Diagrama 1).

Para determinar el tamaño de las MV se realizó un análisis de rastreo de nanopartículas; en la Figura 4A y 4C se muestran imágenes representativas del análisis y los diagramas de distribución de los tamaños de las MV se muestra en los diagramas de la Figura 4B y 4D. El tamaño promedio de las MV obtenidas de las células C6 fue de 395.0 ± 202.6 nm y en el caso de las células C6 irradiadas fue de 339.9 ± 139.0 nm (Tabla 4). Las MV aisladas fueron además estudiadas mediante microscopia electrónica de transmisión; para ambas condiciones de cultivo (irradiados o no), se observaron partículas de forma esférica con un aproximado de 200 nm (Figura 5B).

Como primera aproximación para determinar la diferencia entre las MV sometidas o no a radiación, se realizó la extracción de las proteínas de células C6 y de las MV que a continuación se corrieron en un gel de electroforesis en condiciones desnaturizantes. Se logró observar (Figura 6) una mayor cantidad de proteínas en el lisado completo de las células C6 en comparación con las MV, además de un diferente patrón de bandeo.

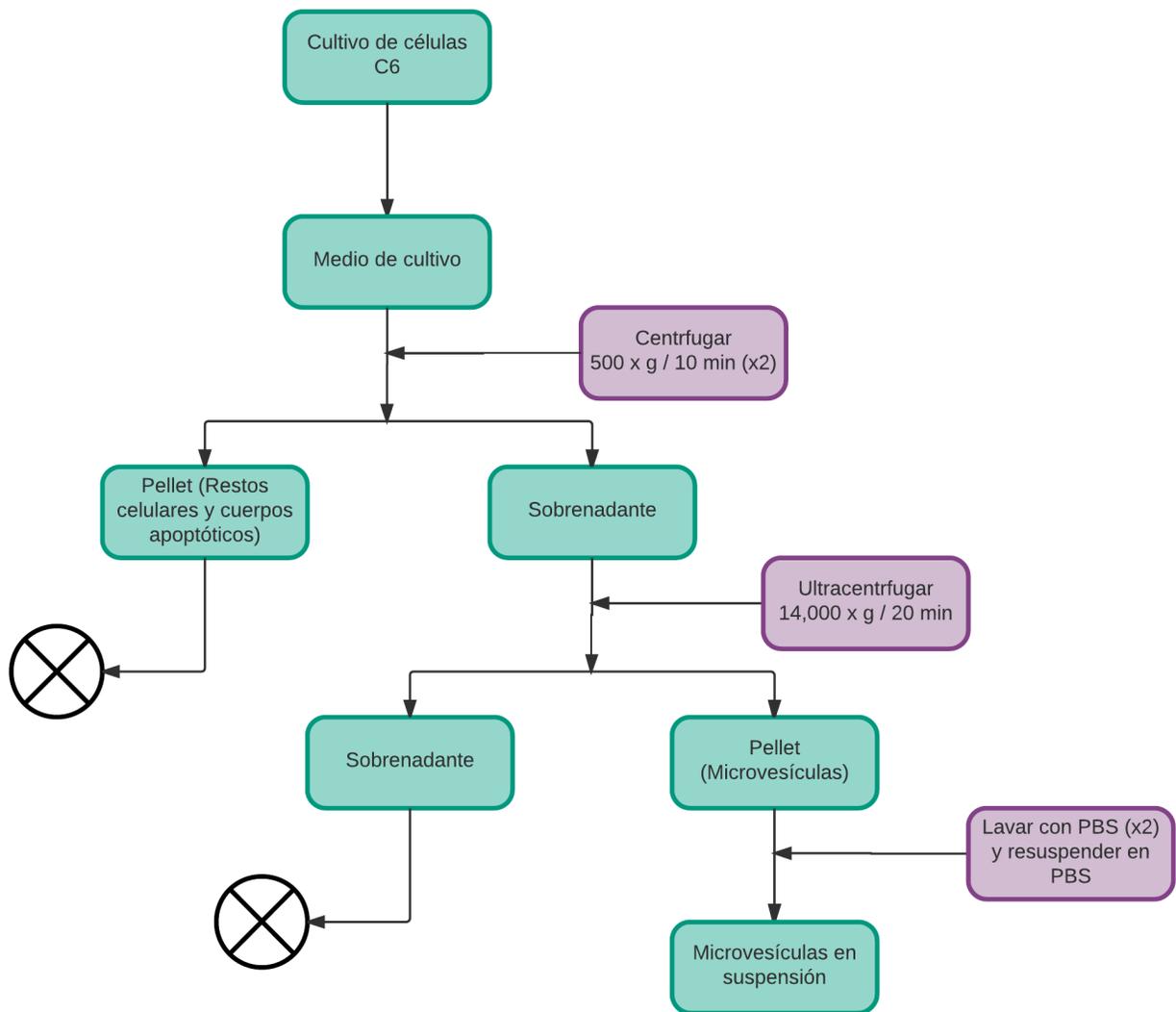


Diagrama 1. Procedimiento para el aislamiento microvesículas a partir de cultivo de células C6 de glioma de rata.

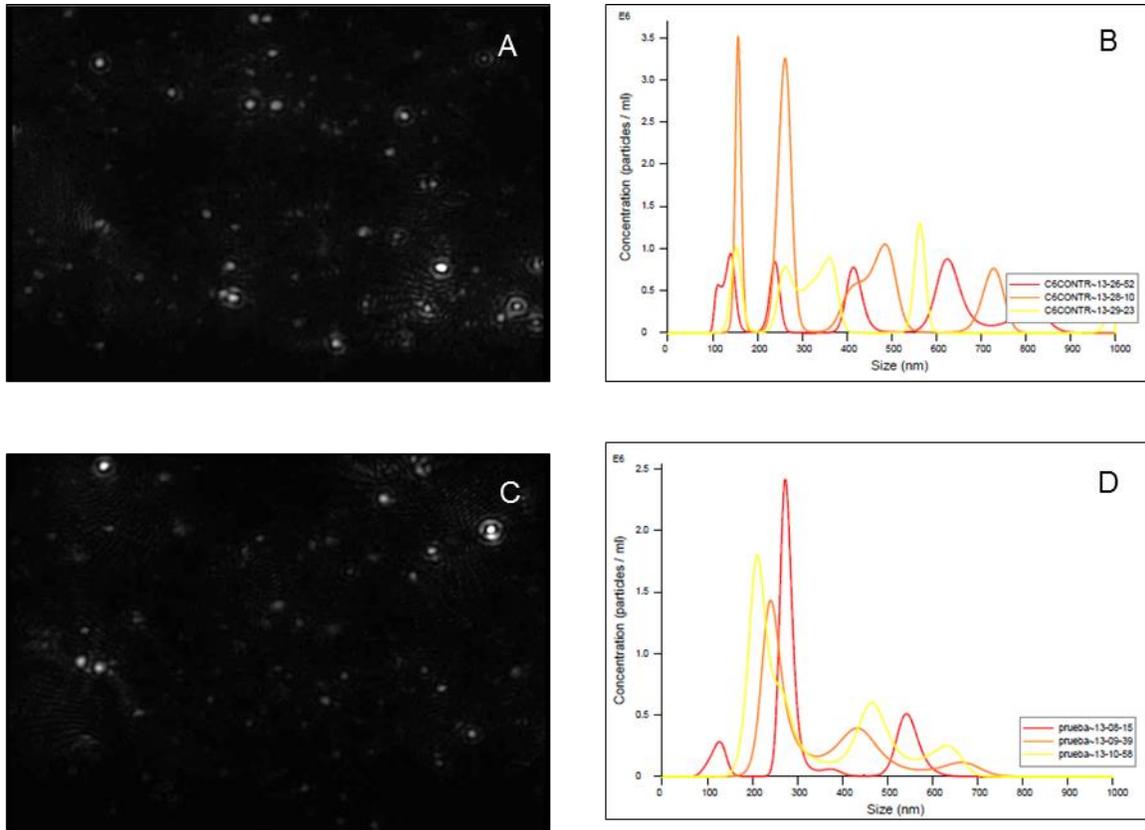


Figura 4. Determinación del tamaño de las microvesículas. Imágenes representativas de la distribución del tamaño de las microvesículas de C6 (A) y de C6 irradiadas (C), obtenidas a partir de videos del análisis de rastreo de nanopartículas de NANO SIGHT (panel izquierdo), y análisis de la distribución del tamaño de las microvesículas de C6 (B) y de C6 irradiadas (D) (por triplicado) mediante el software NTA 3.2 Dev Build 3.2.16 de NANO SIGHT (panel derecho)

Tabla 4. Tamaño promedio de las microvesículas determinado mediante NANO SIGHT

Fuente de MV	Tamaño promedio (nm) \pm SD
C6	395.0 \pm 202.6
C6 irradiadas	339.9 \pm 139.0

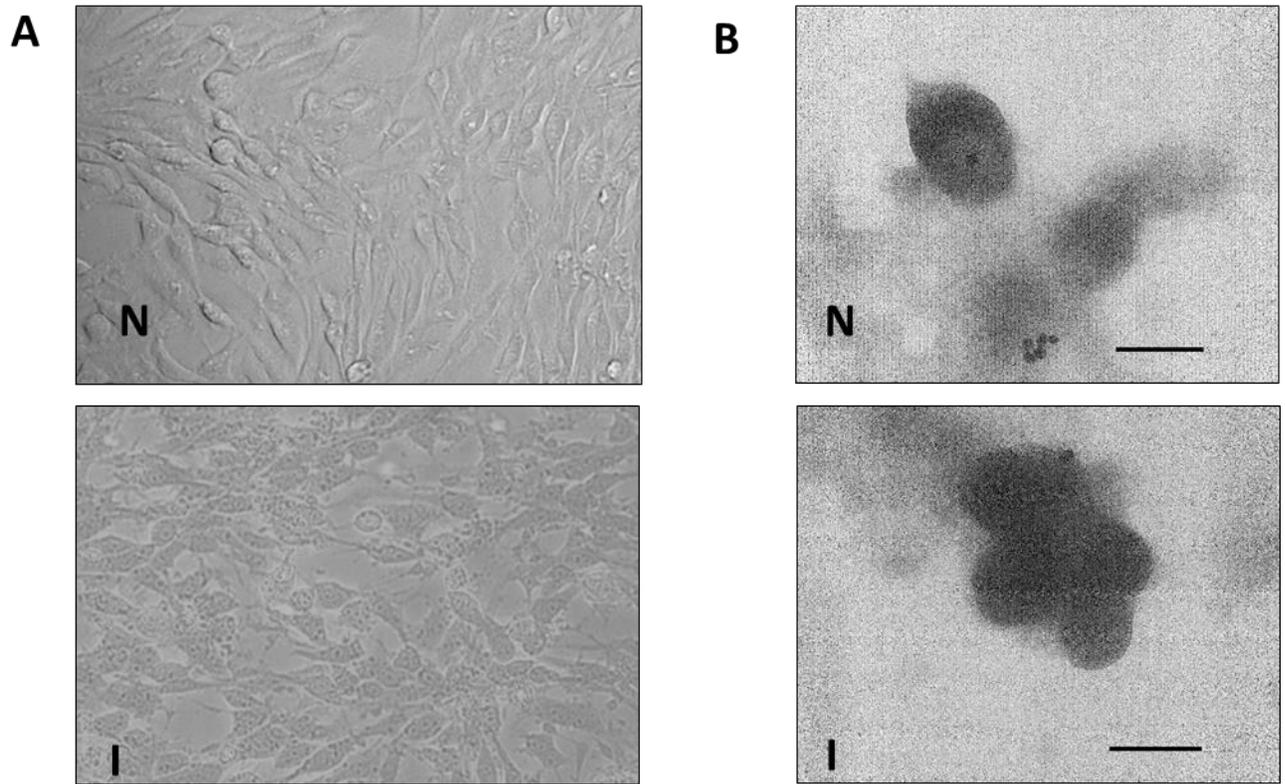


Figura 5. Microscopia de células C6 y de microvesículas. A) Imágenes de microscopia de campo claro de células de glioma C6 (N) y de células de glioma C6 irradiadas (I) con dosis de radiación de 50Gy (20X). B) Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de microvesículas de células C6 (N) y de células C6 irradiadas (I) marcadas con anexina V-oro. La barra representa 200 nm.

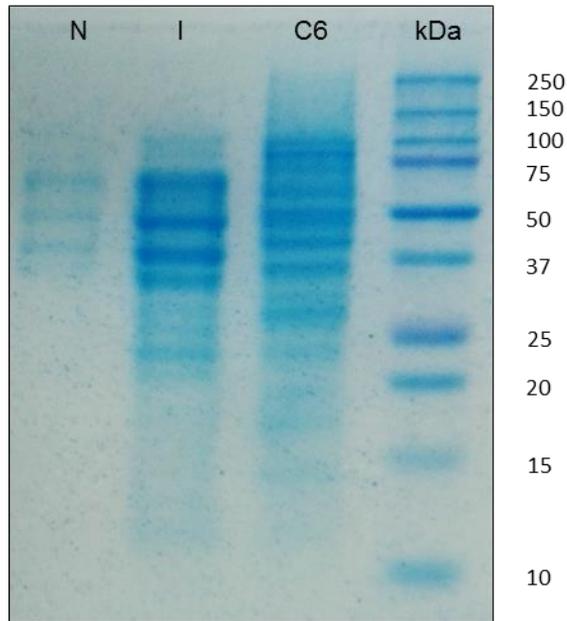


Figura 6. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida al 15 % de proteínas obtenidas células C6 (C6), microvesículas de células C6 (N) y microvesículas de células C6 irradiadas (I).

8.2 Vacunación con microvesículas en un modelo de glioblastoma subcutáneo

Se realizó la vacunación terapéutica con MV de células C6 en ratas con tumores subcutáneos. La administración de MV de células C6 no mostró un efecto en el crecimiento tumoral ($36.871 \pm 6.945 \text{ cm}^3$) cuando se comparó con el control. Por otro lado, con la administración de MV de células C6 irradiadas el volumen tumoral se redujo significativamente ($12.127 \pm 5.918 \text{ cm}^3$) en más del 60% al día del sacrificio en comparación con el control ($32.551 \pm 8.706 \text{ cm}^3$) ($p=0.031$) como se muestra en la Figura 7.

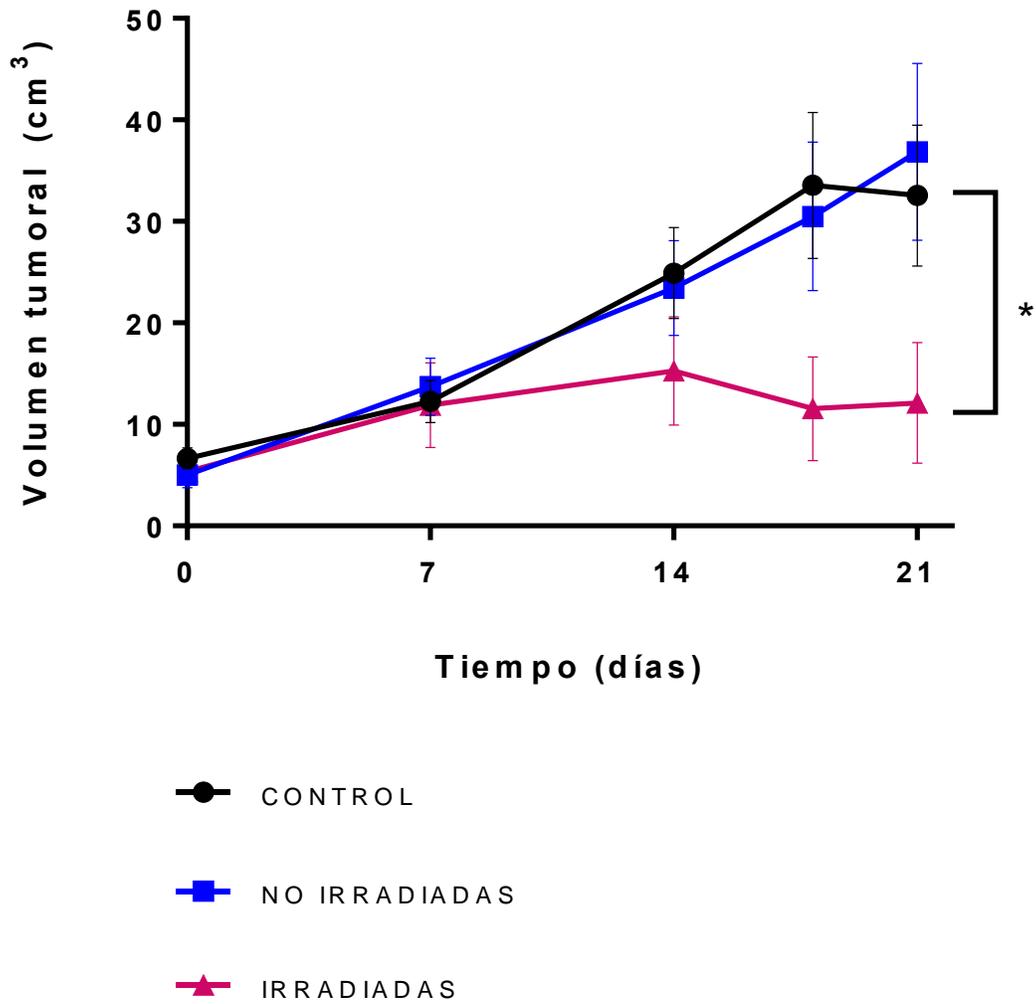


Figura 7. Cinética de crecimiento tumoral. Un millón de células C6 viables fueron implantadas de manera subcutánea en ratas Wistar. Una vez desarrollados los tumores (≥ 2 cm de diámetro), las ratas fueron administradas por vía subcutánea con MV de C6, MV de C6 irradiadas (50 Gy) o PBS los días 0 y 7. Se determinó el volumen tumoral los días 0, 7, 14, 18 y 21. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. * $p=0.031$ irradiadas vs control.

8.3 Evaluación de la apoptosis y necrosis en tumor

Con el objetivo de conocer el mecanismo por el cual el sistema inmune disminuye el volumen tumoral, determinamos los porcentajes de células en y necrosis de las ratas de los tres grupos. Encontramos un incremento significativo, de más de tres veces en células en apoptosis temprana (Figura 8B) en el grupo administrado con MV de C6 irradiadas (7.013 ± 2.818) en comparación con el grupo control (1.830 ± 0.434) ($p=0.0027$). Así también, se observó un mayor número de células en apoptosis tardía (Figura 8C) en el mismo grupo (5.605 ± 1.028) comparándolo con el control (2.464 ± 0.548) ($p= 0.022$). En cuanto a la apoptosis total, en el grupo tratado con MV de C6 irradiadas obtuvimos un número de células en apoptosis de casi el triple (12.62 ± 3.429) en comparación con el grupo control (4.294 ± 0.865) ($p=0.038$). El grupo tratado con MV de C6 no irradiadas no mostró diferencias significativas con el control. Igualmente, no se encontraron diferencias en los porcentajes de células necróticas en el tumor (Figura 8E).

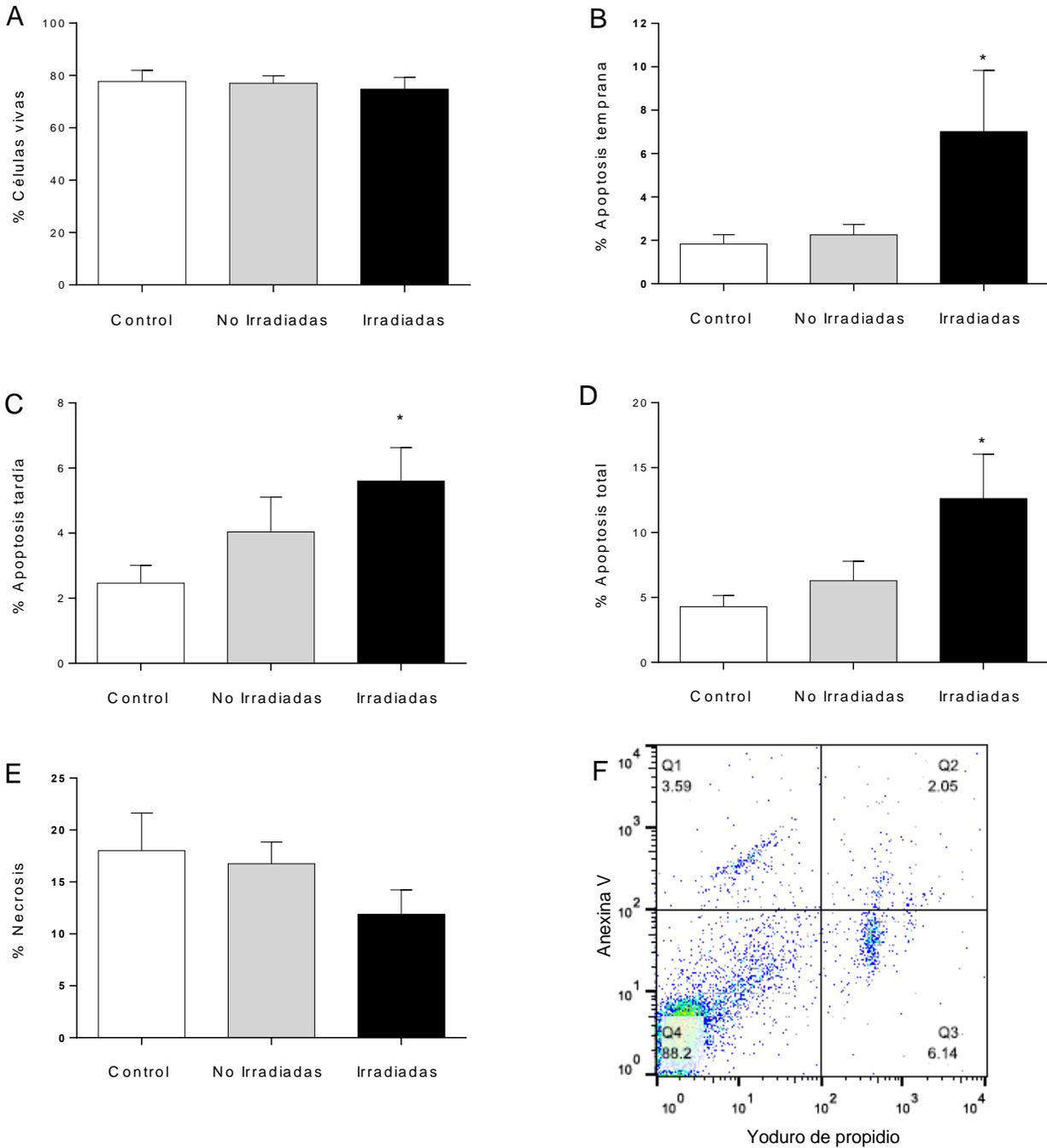


Figura 8. Evaluación de apoptosis y necrosis en tumor. Se evaluaron mediante citometría de flujo: (A) células vivas (negativas para anexina V y negativas para yoduro de propidio), (B) células en apoptosis temprana (positivas solo para anexina V), (C) apoptosis tardía (positivas para anexina V y yoduro de propidio), (D) el total de células en apoptosis y (E) necrosis (positivas para yoduro de propidio), en tumores de ratas con glioblastoma subcutáneo, 21 después del tratamiento con MV de C6 no irradiadas, MV de C6 irradiadas (50 Gy) o PBS (grupo control). Se presenta un gráfico de puntos representativo de las poblaciones (F). Los resultados se expresan como la media \pm SEM, apoptosis temprana $*p=0.027$, apoptosis tardía $*p=0.022$, apoptosis total $*p=0.038$, para irradiadas vs control.

8.4 Efecto de la vacunación con MV en el porcentaje de linfocitos T cooperadores, T citotóxicos y T reguladores, macrófagos y células natural killer

Dado que la inducción de respuestas inmunes antitumorales específicas, generalmente se encuentran acompañadas de modificaciones en los porcentajes de linfocitos T, determinamos los porcentajes de linfocitos en sangre, bazo e infiltrantes del tumor, mediante citometría de flujo.

Observamos un incremento significativo del 300% en el porcentaje de linfocitos T CD4+ infiltrantes del tumor en las ratas vacunadas con MV provenientes de células irradiadas (15.68 ± 4.291) con respecto al grupo control (5.048 ± 1.957) ($p=0.036$). No se observaron diferencias en las ratas vacunadas con MV provenientes de células no irradiadas. Tampoco se observaron modificaciones en los porcentajes de linfocitos CD4+ en bazo o sangre con respecto al grupo control en ninguno de los grupos vacunados (Figura 10).

Por otro lado, se observó un incremento de poco más del 200% en el porcentaje de los linfocitos T CD8+ infiltrantes del tumor en el grupo de ratas vacunadas con MV provenientes de células irradiadas (9.315 ± 2.639) con respecto al grupo control (3.743 ± 1.488) ($p=0.036$), no así en el grupo de ratas vacunadas con MV de células no irradiadas. No se observaron cambios significativos en los porcentajes de linfocitos CD8+ en sangre y bazo de ambos grupos vacunados con respecto al grupo control (Figura 11).

Respecto a las células T reguladoras (CD4+/CD25+/FoxP3+), se observó un incremento significativo en el porcentaje de estas células infiltrantes del tumor (2.040 ± 0.694) con respecto al grupo control, ($p=0.037$) en el grupo de ratas vacunadas con MV de células irradiadas con respecto al grupo control (0.4163 ± 0.1474). No se observaron diferencias en el grupo vacunado con MV de células no irradiadas ni en los porcentajes de estas células en sangre (Figura 12).

De igual manera se buscaron modificaciones en los porcentajes de células naturales killer NK (NKR-P1+) y macrófagos (CD68+) en sangre, bazo e infiltrantes del tumor sin que se

observaran diferencias significativas entre los grupos vacunados y el grupo control en ninguno de los tejidos explorados. (Figuras 13 y 14, respectivamente).

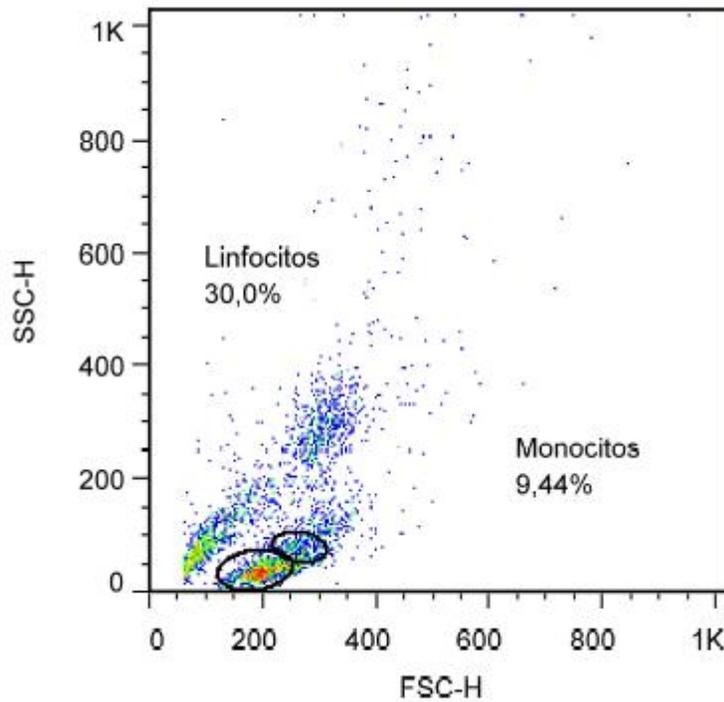


Figura 9. Se seleccionó la población correspondiente a linfocitos de acuerdo con su tamaño (FSC) y granularidad (SSC), para determinar las subpoblaciones de linfocitos T cooperadores, T citotóxicos, T reguladores y NK. Para la determinación de macrófagos se seleccionó la población correspondiente a monocitos. Se muestra un gráfico de puntos representativo de células en sangre.

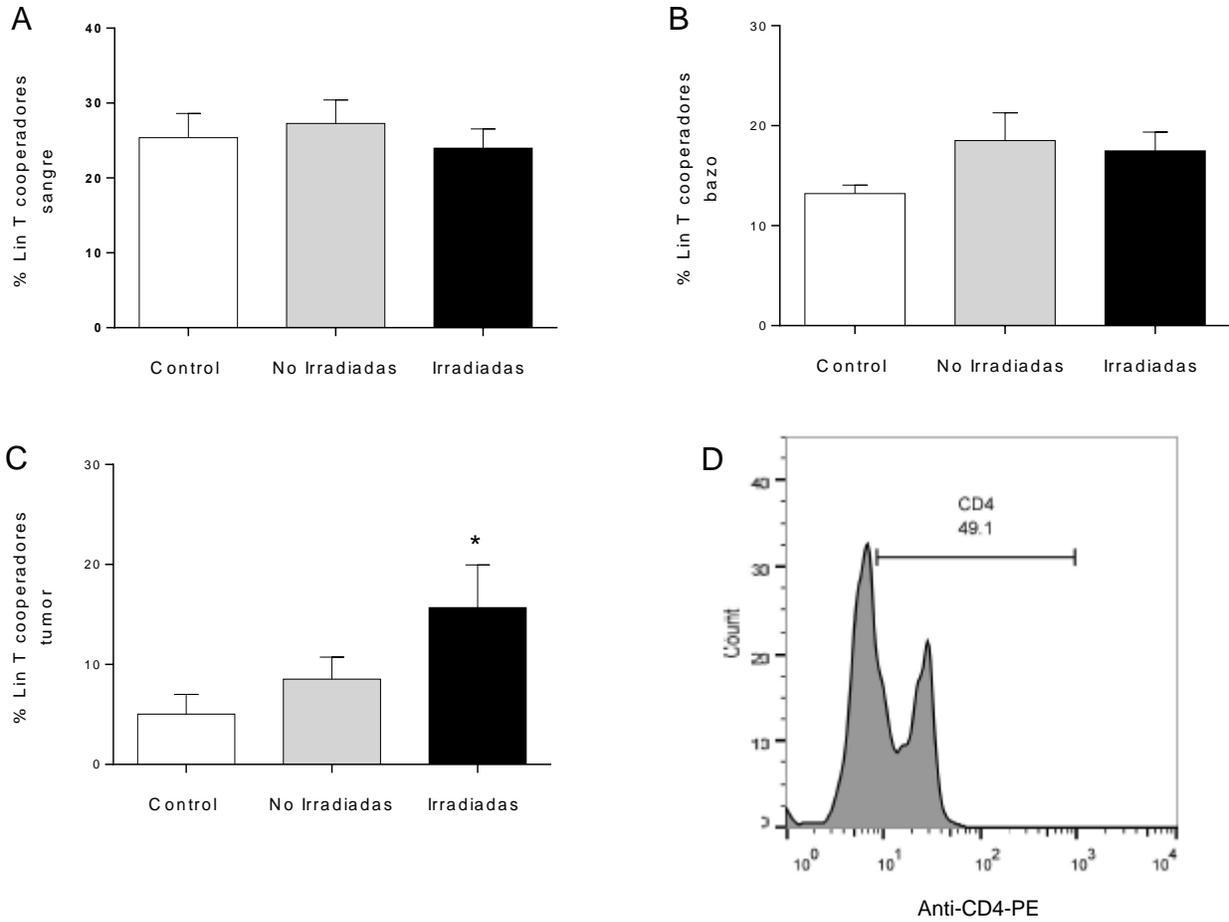


Figura 10. Estudio comparativo de los linfocitos T cooperadores. Se realizó el análisis por citometría de flujo de células CD4+ en (A) sangre, (B) bazo y (C) tumor de ratas con glioblastoma subcutáneo, 21 después del tratamiento con MV de C6 no irradiadas, MV de C6 irradiadas (50 Gy) o PBS (grupo control). Se presenta un histograma representativo de linfocitos T CD4+ en sangre (D). Los resultados se expresan como la media \pm SEM. * $p= 0.036$ irradiadas vs control.

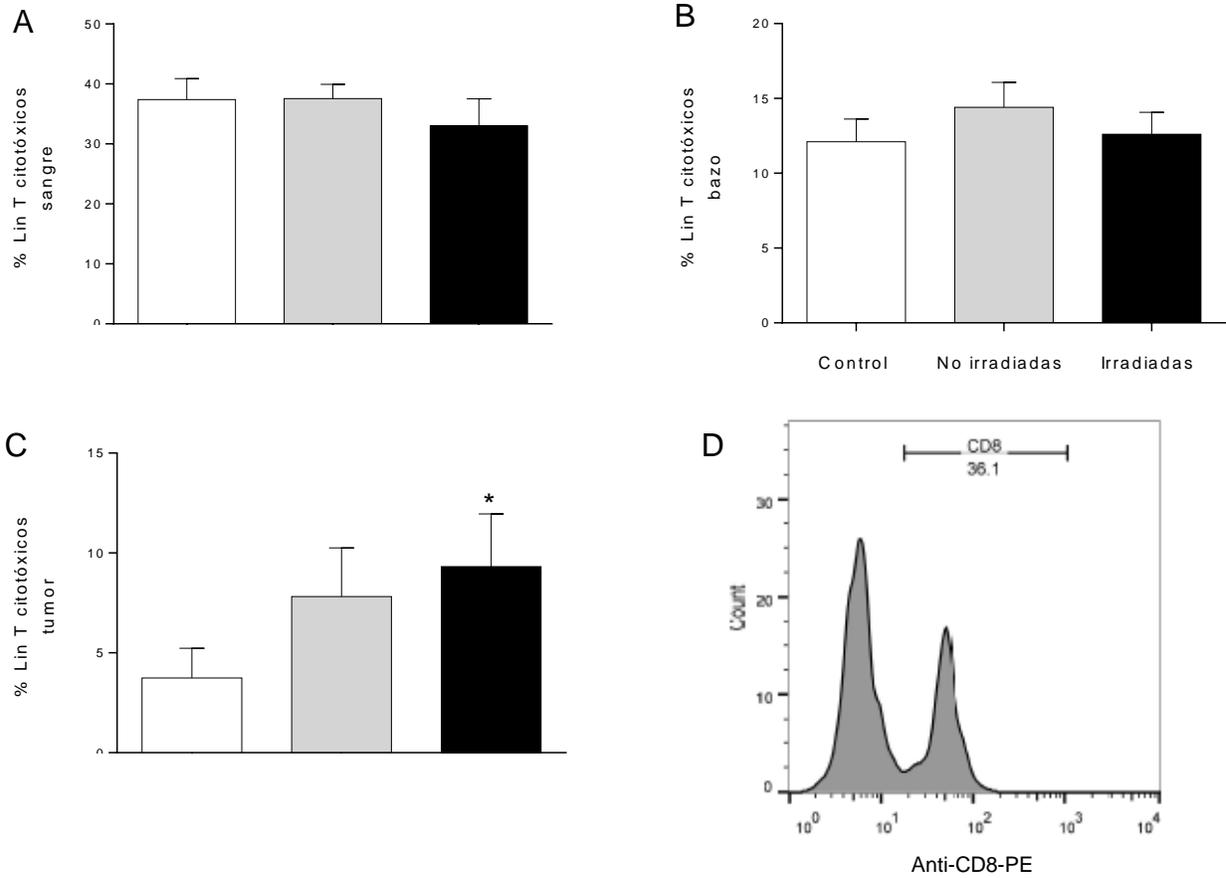


Figura 11. Estudio comparativo de los linfocitos T citotóxicos. Se realizó el análisis por citometría de flujo de células CD8+ en (A) sangre, (B) bazo y (C) tumor de ratas con glioblastoma subcutáneo, 21 después del tratamiento con MV de C6 no irradiadas, MV de C6 irradiadas (50 Gy) o PBS (grupo control). Se presenta un histograma representativo de linfocitos T CD8+ en sangre (D). Los resultados se expresan como la media \pm SEM. * $p=0.04$ irradiadas vs control.

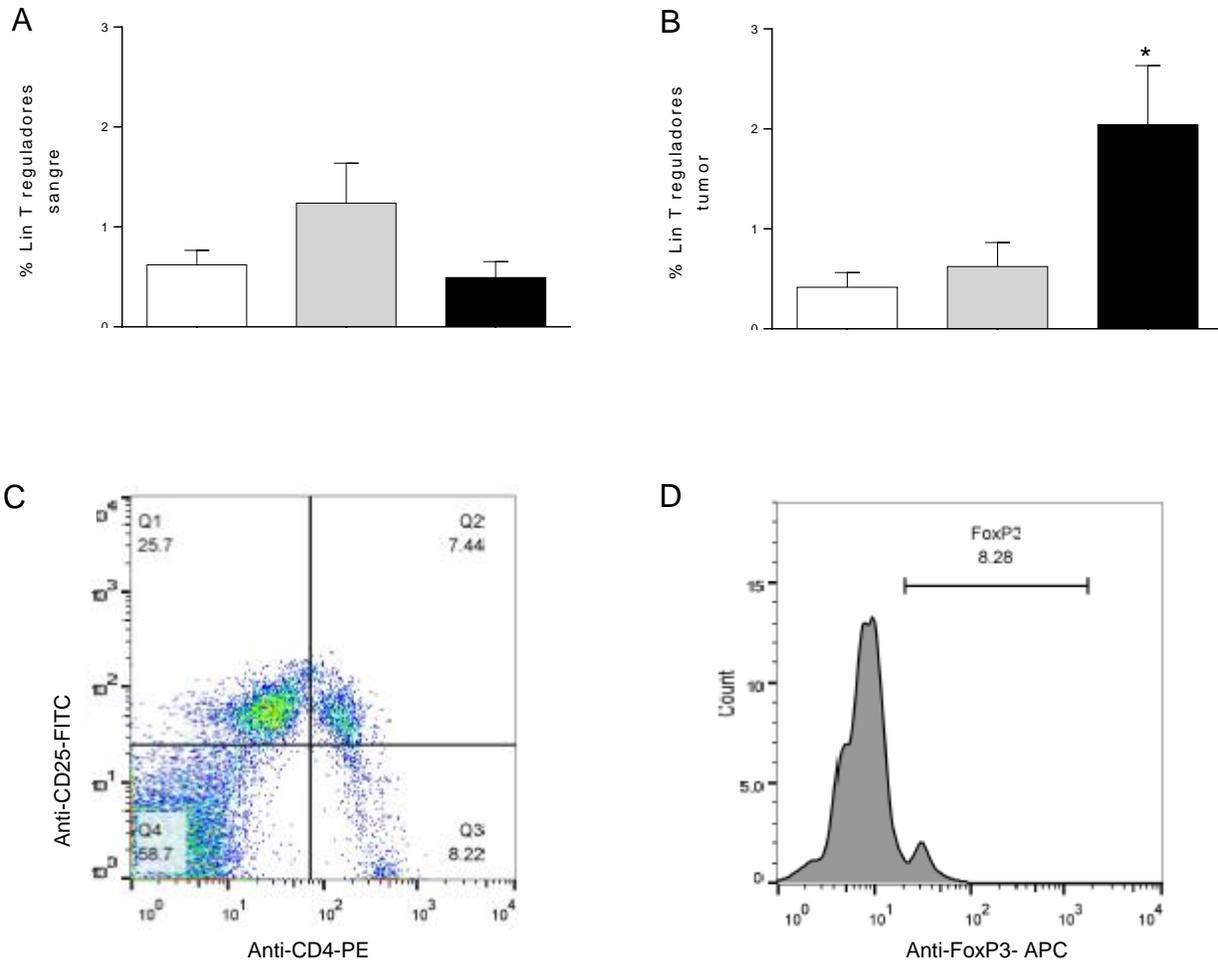


Figura 12. Estudio comparativo de los linfocitos T reguladores. Se realizó el análisis por citometría de flujo de células CD4+/ CD25+/ FoxP3+ en (A) sangre y (B) tumor de ratas con glioblastoma subcutáneo, 21 después del tratamiento con MV de C6 no irradiadas, MV de C6 irradiadas (50 Gy) o PBS (grupo control). Se presenta un gráfico de puntos representativo para la selección de la población de linfocitos CD4+/CD25+ en sangre (D), a partir de la cual se determinó la cantidad de linfocitos T reguladores (FoxP3+) (E). Los resultados se expresan como la media \pm SEM. * $p=0.037$ irradiadas vs control.

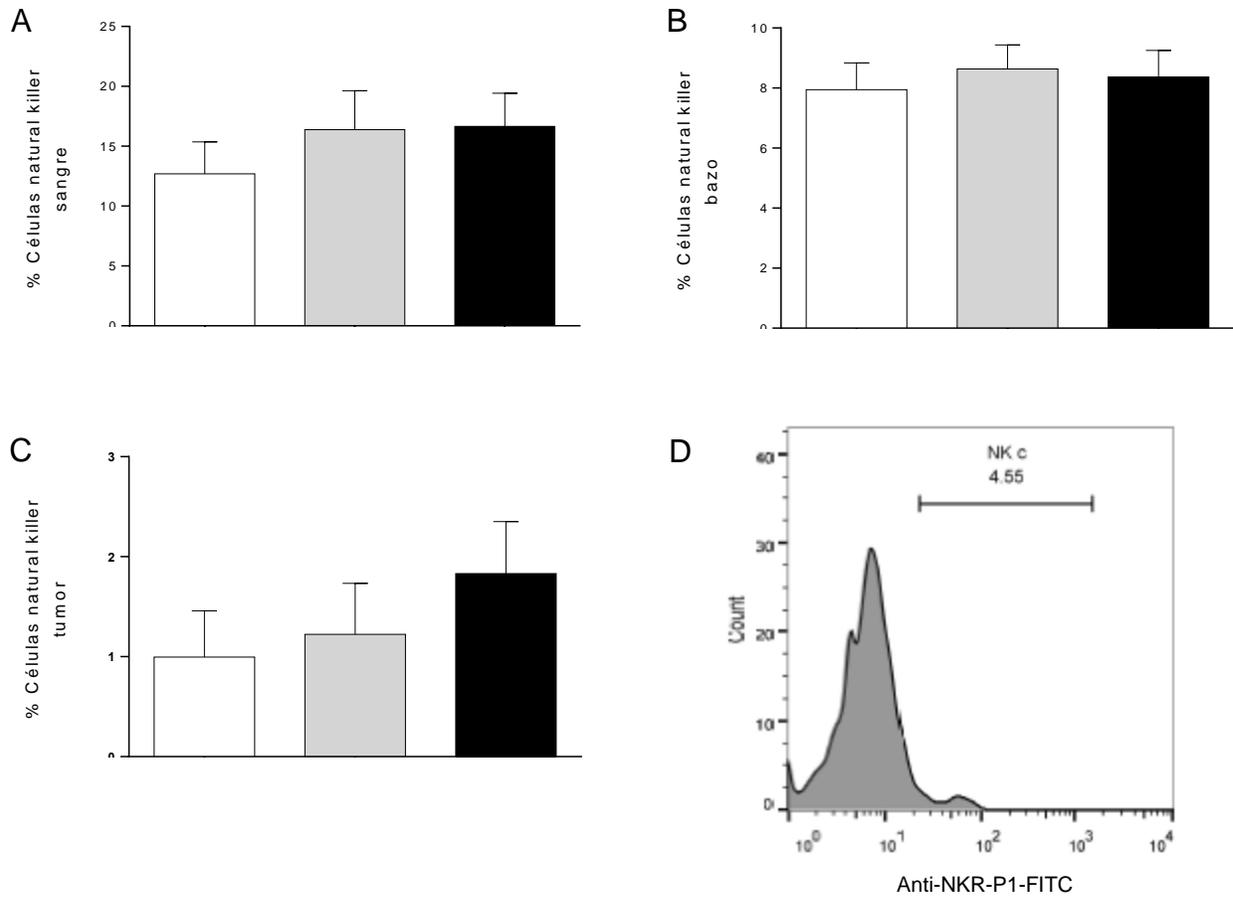


Figura 13. Estudio comparativo de las células asesinas naturales (NK). Se realizó el análisis por citometría de flujo de células NKR-P1+ en (A) sangre, (B) bazo y (C) tumor de ratas con glioblastoma subcutáneo, 21 después del tratamiento con MV de C6 no irradiadas, MV de C6 irradiadas (50 Gy) o PBS (grupo control). Se presenta un histograma representativo de células NK en sangre (D). Los resultados se expresan como la media \pm SEM, no se observaron diferencias significativas.

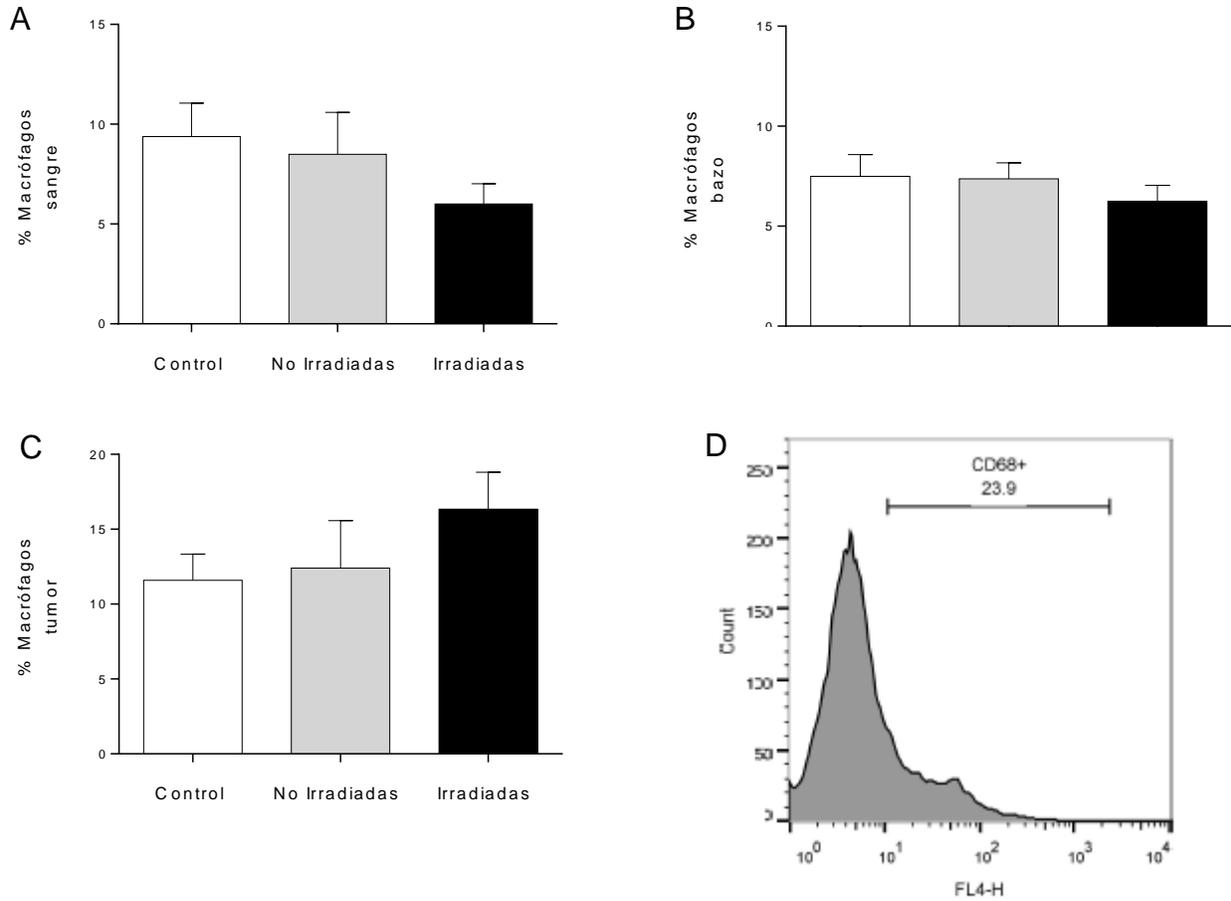


Figura 14. Estudio comparativo de los macrófagos. Se realizó el análisis por citometría de flujo de células CD68+ en (A) sangre, (B) bazo y (C) tumor de ratas con glioblastoma subcutáneo, 21 después del tratamiento con MV de C6 no irradiadas, MV de C6 irradiadas (50 Gy) o PBS (grupo control). Los resultados se expresan como la media \pm SEM, no se observaron diferencias significativas.

9. Discusión

A pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento multimodal del glioblastoma, este continúa siendo refractario a la terapéutica actual, sin que se hayan logrado avances significativos en el aumento de sobrevida y calidad de vida de estos pacientes en las últimas dos décadas (Bernard-Arnoux et al., 2016).

La inmunoterapia es una opción novedosa para el tratamiento del cáncer y particularmente la vacunación antitumoral con vesículas extracelulares, es un medio prometedor para inducir inmunidad sistémica contra células malignas. En este trabajo aislamos MV a partir del sobrenadante de cultivos de células C6 y de células C6 irradiadas con el fin de investigar su potencial inmunogénico y determinar si la vacunación terapéutica con tales MV en ratas con tumor C6 subcutáneo, era suficiente para estimular al sistema inmune y reducir el crecimiento de tumores.

Para llevar a cabo este proyecto empleamos un modelo de glioblastoma subcutáneo con células C6 en ratas Wistar. La inyección intracraneal o subcutánea de células tumorales se ha usado ampliamente en para el desarrollo de terapias para seres humanos, ya sea por xenoinjertos de líneas tumorales humanas en ratas inmunodeficientes o aloinjertos de líneas tumorales de rata. Estos modelos han permitido una mejor aproximación de las condiciones fisiológicas que los cultivos *in vitro*, debido a la presencia de vasculatura e interacciones con la matriz extracelular. Además, permiten la localización reproducible y definida de tumores, tasas de crecimiento tumoral predecibles y puntos finales bien definidos (Gürsel & Reilly, 2005). La línea celular que empleamos (C6) comparte diversos marcadores histopatológicos y tumorales con el glioblastoma (Stylli, Luwor, Ware, Tan, & Kaye, 2015) y su implantación de manera subcutánea representa una opción factible y que facilita la medición del volumen tumoral sin la necesidad de sacrificar al animal de estudio, contrario al modelo intracraneal. Al mismo tiempo, no se aprecian diferencias considerables entre tumores intracraneales y subcutáneos de glioma C6 en términos de estructura, incluyendo celularidad y formación de pseudoempalizada (Watanabe et al., 2002).

Con la finalidad de obtener MV autólogas para utilizarlas como vacunación, empleamos también cultivos de células C6. El aislamiento de las MV se llevó a cabo mediante ultracentrifugación (Diagrama 1), que es el método más usado para la obtención de vesículas extracelulares actualmente (Gardiner et al., 2016). El aislamiento de las MV fue posteriormente confirmado mediante microscopía electrónica de transmisión como se observa en la Figura 5B. A continuación, las MV se sometieron a un análisis de rastreo de nanopartículas (NTA, por sus siglas en inglés) (Figura 4). Esta técnica, combina las propiedades de la microscopía de dispersión de luz láser y el movimiento de Browniano para obtener la distribución del tamaño de partículas en suspensión. El tamaño de las MV de los cultivos de C6 y de C6 irradiadas que aislamos fue similar (Tabla 1). Sin embargo, las MV de los cultivos irradiados presentaron un tamaño más uniforme, lo que nos hace sugerir que el tratamiento con radiación indujo a la liberación de MV de un tipo particular.

Es conocido que las proteínas contenidas en las MV varían dependiendo de las células de las cuales se liberan y de las condiciones a las cuales son sometidas (T. H. Lee et al., 2011). Es por ello que realizamos la extracción de proteínas de las MV de C6 y de C6 irradiadas, además de células C6 completas. Mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida de las proteínas logramos observar que las MV (irradiadas o no) contienen una menor cantidad de proteínas y un patrón de proteínas diferente en comparación con el lisado de células completas (Figura 6). En un estudio realizado con lisados de células U87MG de glioblastoma humano, sometidas a 0 Gy o 4 Gy, y las vesículas extracelulares aisladas a partir de estas, se mostró que las vesículas contenían un grupo selecto de proteínas, diferente en comparación con las células de las cuales se derivaron (Arscott et al., 2013). No encontramos diferencia el patrón de bandeo entre ambos tipos de MV, sin embargo, es necesario analizar proteínas particulares, como los DAMPs, para evaluar el efecto de la irradiación en la expresión de estas proteínas en la línea celular de glioma C6.

Una vez establecidos los tumores subcutáneos, se llevó a cabo la vacunación con las MV y se realizó el seguimiento del tamaño tumoral. Observamos una reducción mayor al 60% del volumen tumoral en las ratas vacunadas con MV proveniente de células C6 irradiadas

en comparación con el control, sin que observáramos disminución en el grupo de ratas vacunadas con MV de células C6 sin radiación (Figura 7). La inmunogenicidad de las vacunas puede ser mejorada controlando la naturaleza de la expresión de antígenos. Se ha mostrado que el patrón de expresión de antígenos sobre las MV cambia cuando las células tumorales son expuestas a radiación (Baulch et al., 2016). En un estudio con células de mieloma múltiple, la radiación (100,150 y 180 Gy) incrementó la expresión de todos los antígenos de superficie presentes en las células antes de la radiación, esta sobreexpresión fue dosis dependiente y aumentó con el tiempo, incrementando la inmunogenicidad de las células tumorales (Baulch et al., 2016; Chiriva-Internati et al., 2006).

Adicional a este incremento en la expresión de antígenos, es necesaria la presencia de señales inmunoestimuladoras, que cuando están ausentes conducen a la tolerancia. En el contexto de las infecciones, estas señales son proporcionadas por estructuras microbianas altamente conservadas llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) y en el caso de la terapia del cáncer una función similar es proporcionada por los DAMPs (Galluzzi, Zitvogel, & Kroemer, 2016). Existe evidencia que indica que las MV que contienen DAMPs (incluyendo HMGB1, proteínas S100, ATP, y HSP) liberadas de tejidos estresados o lesionados desempeñan un papel importante en la modulación de la respuesta inmune (Buzas, Gyorgy, Nagy, Falus, & Gay, 2014). Es por ello que podemos apuntar que la irradiación produjo MV con mayor potencial inmunogénico que las MV de células sin radiación debido a un patrón específico de antígenos y la presencia de DAMPs, lo cual se reflejó en tumores de menor tamaño. Cabe señalar que dicha disminución en el crecimiento tumoral se puede deber principalmente a la inducción de la apoptosis mediada por las células del sistema inmune, pues el grupo de ratas tratadas con MV de células C6 irradiadas mostró un incremento del 300% en el porcentaje de células en apoptosis en tumor como se observa en la Figura 8.

Para corroborar si la vacunación con MV modificaba las poblaciones de células efectoras inmunes, determinamos los porcentajes de linfocitos T cooperadores, linfocitos T

citotóxicos, linfocitos T reguladores, células NK y macrófagos, en sangre, bazo y tumor. Nuestros resultados mostraron que al vacunar ratas portadoras de tumores subcutáneos con MV de C6 irradiadas, las poblaciones de NK (Figura 13) y macrófagos (Figura 14) no presentan cambios significativos en comparación con el control. Sin embargo, se produce un incremento significativo en las poblaciones de linfocitos T cooperadores (Figura 10C) y linfocitos T citotóxicos (Figura 11C) en el tumor. Diversos trabajos han mostrado que un incremento de las poblaciones inmunes efectoras infiltrantes del tumor correlaciona con un mejor pronóstico (Gajewski et al., 2013; Galon, Angell, Bedognetti, & Marincola, 2013). Lin y colaboradores emplearon un agente inductor de ICD, y por consiguiente de DAMPs, con la finalidad de incrementar la inmunogenicidad de vacunas basadas en lisados tumorales cargados en DC, encontrando un incremento en la proliferación de linfocitos T CD4+ y T CD8+ *in vitro*, además de disminución de metástasis y aumento de supervivencia en un modelo *in vivo* de cáncer de mama (Lin et al., 2015). Otro grupo de estudio empleó el sobrenadante de células de cáncer colorrectal estresadas químicamente para pulsar DC donde observó la inducción de una respuesta Th1 *in vitro*, además una respuesta inmune antitumoral *in vivo* en un modelo murino de cáncer colorrectal (Fang et al., 2014).

Por otro lado, observamos también un incremento en linfocitos T reguladores en tumor (Figura 12B) en el grupo tratado con MV de C6 irradiadas. Se ha demostrado que fragmentos de proteínas de estrés presentados en moléculas del MHC, como HSP70 y HSP60, tienen la capacidad de inducir una respuesta por células T reguladoras (Keijzer, van der Zee, van Eden, & Broere, 2013). Los linfocitos T reguladores tienen un papel crucial en el control homeostático sobre la inflamación, siendo los principales actores en la prevención del daño excesivo propio mediante la liberación de citocinas (Schaue, Xie, Ratikan, & McBride, 2012). En nuestro trabajo, a pesar del aumento estas células, la respuesta mediada por células CD4+ y CD8+ fue capaz de inclinar la balanza hacia una respuesta efectora más que inmunosupresora. No obstante, es posible que la disminución de la subpoblación de linfocitos T reguladores mejore el efecto observado en nuestra estrategia inmunoterapéutica.

11. Conclusión

Dados los resultados obtenidos en este trabajo, podemos sugerir que la vacunación con MV de células irradiadas promueven una respuesta inmune adaptativa efectiva mediada por linfocitos T cooperadores y T citotóxicos, que conduce a un incremento de la muerte celular por apoptosis de las células tumorales y finalmente, la reducción de los tumores en el modelo subcutáneo de glioblastoma.

El pronóstico de los pacientes con glioblastoma es desalentador a pesar del tratamiento multimodal. Es posible que la vacunación con MV de células irradiadas pueda ser una terapia adyuvante efectiva para estos pacientes.

12. Literatura citada

- Adam, J. K., Odhav, B., & Bhoola, K. D. (2003). Immune responses in cancer. *Pharmacol Ther*, *99*(1), 113-132.
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, *124*(4), 783-801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015
- Alatrash, G., Jakher, H., Stafford, P. D., & Mittendorf, E. A. (2013). Cancer immunotherapies, their safety and toxicity. *Expert Opin Drug Saf*, *12*(5), 631-645. doi:10.1517/14740338.2013.795944
- Arcsott, W. T., Tandle, A. T., Zhao, S., Shabason, J. E., Gordon, I. K., Schlaff, C. D., . . . Camphausen, K. A. (2013). Ionizing radiation and glioblastoma exosomes: implications in tumor biology and cell migration. *Transl Oncol*, *6*(6), 638-648.
- Baulch, J. E., Geidzinski, E., Tran, K. K., Yu, L., Zhou, Y. H., & Limoli, C. L. (2016). Irradiation of primary human gliomas triggers dynamic and aggressive survival responses involving microvesicle signaling. *Environ Mol Mutagen*, *57*(5), 405-415. doi:10.1002/em.21988
- Bernard-Arnoux, F., Lamure, M., Ducray, F., Aulagner, G., Honnorat, J., & Armoiry, X. (2016). The cost-effectiveness of tumor-treating fields therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Neuro Oncol*, *18*(8), 1129-1136. doi:10.1093/neuonc/nov102
- Besse, B., Charrier, M., Lapierre, V., Dansin, E., Lantz, O., Planchard, D., . . . Chaput, N. (2016). Dendritic cell-derived exosomes as maintenance immunotherapy after first line chemotherapy in NSCLC. *Oncoimmunology*, *5*(4), e1071008. doi:10.1080/2162402X.2015.1071008
- Bhowmik, A., Khan, R., & Ghosh, M. K. (2015). Blood brain barrier: a challenge for effectual therapy of brain tumors. *Biomed Res Int*, *2015*, 320941. doi:10.1155/2015/320941
- Buzas, E. I., Gyorgy, B., Nagy, G., Falus, A., & Gay, S. (2014). Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol*, *10*(6), 356-364. doi:10.1038/nrrheum.2014.19
- Chargaff, E., & West, R. (1946). The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem*, *166*(1), 189-197.
- Chiriva-Internati, M., Grizzi, F., Pinkston, J., Morrow, K. J., D'Cunha, N., Frezza, E. E., . . . Cobos, E. (2006). Gamma-radiation upregulates MHC class I/II and ICAM-I molecules in multiple myeloma cell lines and primary tumors. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, *42*(3-4), 89-95. doi:10.1290/0508054.1
- Cocucci, E., Racchetti, G., & Meldolesi, J. (2009). Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*, *19*(2), 43-51. doi:10.1016/j.tcb.2008.11.003
- Dai, S., Wei, D., Wu, Z., Zhou, X., Wei, X., Huang, H., & Li, G. (2008). Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. *Mol Ther*, *16*(4), 782-790. doi:10.1038/mt.2008.1
- Dey, M., Chang, A. L., Miska, J., Wainwright, D. A., Ahmed, A. U., Balyasnikova, I. V., . . . Lesniak, M. S. (2015). Dendritic Cell-Based Vaccines that Utilize Myeloid Rather than Plasmacytoid Cells Offer a Superior Survival Advantage in Malignant Glioma. *J Immunol*, *195*(1), 367-376. doi:10.4049/jimmunol.1401607

- Dhermain, F. G., Hau, P., Lanfermann, H., Jacobs, A. H., & van den Bent, M. J. (2010). Advanced MRI and PET imaging for assessment of treatment response in patients with gliomas. *Lancet Neurol*, *9*(9), 906-920. doi:10.1016/S1474-4422(10)70181-2
- Dimberg, A. (2014). The glioblastoma vasculature as a target for cancer therapy. *Biochem Soc Trans*, *42*(6), 1647-1652. doi:10.1042/BST20140278
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, *3*(11), 991-998. doi:10.1038/ni1102-991
- Escudier, B., Dorval, T., Chaput, N., André, F., Caby, M. P., Novault, S., . . . Zitvogel, L. (2005). Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J Transl Med*, *3*(1), 10. doi:10.1186/1479-5876-3-10
- Fang, H., Ang, B., Xu, X., Huang, X., Wu, Y., Sun, Y., . . . Wan, T. (2014). TLR4 is essential for dendritic cell activation and anti-tumor T-cell response enhancement by DAMPs released from chemically stressed cancer cells. *Cellular and Molecular Immunology*, *11*(2), 150-159. doi:10.1038/cmi.2013.59
- Forrester, J. V., Xu, H., Lambe, T., & Cornall, R. (2008). Immune privilege or privileged immunity? *Mucosal Immunol*, *1*(5), 372-381. doi:10.1038/mi.2008.27
- Friend, C., Marovitz, W., Henie, G., Henie, W., Tsuei, D., Hirschhorn, K., . . . Cuttner, J. (1978). Observations on cell lines derived from a patient with Hodgkin's disease. *Cancer Res*, *38*(8), 2581-2591.
- Gajewski, T. F., Woo, S. R., Zha, Y., Spaapen, R., Zheng, Y., Corrales, L., & Spranger, S. (2013). Cancer immunotherapy strategies based on overcoming barriers within the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol*, *25*(2), 268-276. doi:10.1016/j.coi.2013.02.009
- Galluzzi, L., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2016). Immunological Mechanisms Underneath the Efficacy of Cancer Therapy. *Cancer Immunol Res*, *4*(11), 895-902. doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0197
- Galon, J., Angell, H. K., Bedognetti, D., & Marincola, F. M. (2013). The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity*, *39*(1), 11-26. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.008
- Gardiner, C., Vizio, D. D., Sahoo, S., Théry, C., Witwer, K. W., Wauben, M., & Hill, A. F. (2016). Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *Journal of Extracellular Vesicles*, *5*, 10.3402/jev.v3405.32945. doi:10.3402/jev.v5.32945
- Gardner, A., & Ruffell, B. (2016). Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends Immunol*, *37*(12), 855-865. doi:10.1016/j.it.2016.09.006
- Graner, M. W., Alzate, O., Dechkovskaia, A. M., Keene, J. D., Sampson, J. H., Mitchell, D. A., & Bigner, D. D. (2009). Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes. *FASEB J*, *23*(5), 1541-1557. doi:10.1096/fj.08-122184
- Guevara, P., & Sotelo, J. (1999). C6 rat glioma grown into the peritoneal cavity, a large source of tumoral cells for subcutaneous transplant of glioma. *J Neurooncol*, *44*(1), 91-92.
- Haabeth, O. A., Tveita, A. A., Fauskanger, M., Schjesvold, F., Lorvik, K. B., Hofgaard, P. O., . . . Bogen, B. (2014). How Do CD4(+) T Cells Detect and Eliminate Tumor Cells That Either Lack

- or Express MHC Class II Molecules? *Front Immunol*, 5, 174. doi:10.3389/fimmu.2014.00174
- Han, S. J., Zygourakis, C., Lim, M., & Parsa, A. T. (2012). Immunotherapy for glioma: promises and challenges. *Neurosurg Clin N Am*, 23(3), 357-370. doi:10.1016/j.nec.2012.05.001
- Hernandez, C., Huebener, P., & Schwabe, R. F. (2016). Damage-associated molecular patterns in cancer: A double-edged sword. *Oncogene*, 35(46), 5931-5941. doi:10.1038/onc.2016.104
- Hodges, L. C., Smith, J. L., Garrett, A., & Tate, S. (1992). Prevalence of glioblastoma multiforme in subjects with prior therapeutic radiation. *J Neurosci Nurs*, 24(2), 79-83.
- Keijzer, C., van der Zee, R., van Eden, W., & Broere, F. (2013). Treg Inducing Adjuvants for Therapeutic Vaccination Against Chronic Inflammatory Diseases. *Frontiers in Immunology*, 4, 245. doi:10.3389/fimmu.2013.00245
- Kennedy, B. C., Showers, C. R., Anderson, D. E., Anderson, L., Canoll, P., Bruce, J. N., & Anderson, R. C. E. (2013). Tumor-Associated Macrophages in Glioma: Friend or Foe? *Journal of Oncology*, 2013, 11. doi:10.1155/2013/486912
- Kershaw, M. H., Trapani, J. A., & Smyth, M. J. (1995). Cytotoxic lymphocytes: redirecting the cell-mediated immune response for the therapy of cancer. *Ther Immunol*, 2(3), 173-181.
- Kim, S., Iizuka, K., Aguila, H. L., Weissman, I. L., & Yokoyama, W. M. (2000). In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(6), 2731-2736. doi:10.1073/pnas.050588297
- Kmieciak, J., Zimmer, J., & Chekenya, M. (2014). Natural killer cells in intracranial neoplasms: presence and therapeutic efficacy against brain tumours. *J Neurooncol*, 116(1), 1-9. doi:10.1007/s11060-013-1265-5
- Krysko, O., Love Aaes, T., Bachert, C., Vandenabeele, P., & Krysko, D. V. (2013). Many faces of DAMPs in cancer therapy. *Cell Death Dis*, 4, e631. doi:10.1038/cddis.2013.156
- Land, W. G. (2015). The Role of Damage-Associated Molecular Patterns in Human Diseases: Part I - Promoting inflammation and immunity. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 15(1), e9-e21.
- Lapa, C., Linsenmann, T., Luckerath, K., Samnick, S., Herrmann, K., Stoffer, C., . . . Monoranu, C. M. (2015). Tumor-associated macrophages in glioblastoma multiforme—a suitable target for somatostatin receptor-based imaging and therapy? *PLoS One*, 10(3), e0122269. doi:10.1371/journal.pone.0122269
- Lee, T. H., D'Asti, E., Magnus, N., Al-Nedawi, K., Meehan, B., & Rak, J. (2011). Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer—the emerging science of cellular 'debris'. *Semin Immunopathol*, 33(5), 455-467. doi:10.1007/s00281-011-0250-3
- Lee, Y., El Andaloussi, S., & Wood, M. J. (2012). Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Hum Mol Genet*, 21(R1), R125-134. doi:10.1093/hmg/dds317
- Lener, T., Gimona, M., Aigner, L., Borger, V., Buzas, E., Camussi, G., . . . Giebel, B. (2015). Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles*, 4, 30087. doi:10.3402/jev.v4.30087
- Lima, L. G., Chammas, R., Monteiro, R. Q., Moreira, M. E., & Barcinski, M. A. (2009). Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner. *Cancer Lett*, 283(2), 168-175. doi:10.1016/j.canlet.2009.03.041

- Lin, T.-J., Lin, H.-T., Chang, W.-T., Mitapalli, S. P., Hsiao, P.-W., Yin, S.-Y., & Yang, N.-S. (2015). Shikonin-enhanced cell immunogenicity of tumor vaccine is mediated by the differential effects of DAMP components. *Molecular Cancer*, *14*, 174. doi:10.1186/s12943-015-0435-9
- Lopez-Gonzalez, M. A., & Sotelo, J. (2000). Brain tumors in Mexico: characteristics and prognosis of glioblastoma. *Surg Neurol*, *53*(2), 157-162.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., . . . Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, *114*(2), 97-109. doi:10.1007/s00401-007-0243-4
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., . . . Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*, *131*(6), 803-820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1
- Louveau, A., Harris, T. H., & Kipnis, J. (2015). Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege. *Trends Immunol*, *36*(10), 569-577. doi:10.1016/j.it.2015.08.006
- Lyon, J. G., Mokarram, N., Saxena, T., Carroll, S. L., & Bellamkonda, R. V. (2017). Engineering challenges for brain tumor immunotherapy. *Adv Drug Deliv Rev*, *114*, 19-32. doi:10.1016/j.addr.2017.06.006
- Malmer, B., Iselius, L., Holmberg, E., Collins, A., Henriksson, R., & Grönberg, H. (2001). Genetic epidemiology of glioma. *Br J Cancer*, *84*(3), 429-434. doi:10.1054/bjoc.2000.1612
- Martínez-Lostao, L., Anel, A., & Pardo, J. (2015). How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clin Cancer Res*, *21*(22), 5047-5056. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0685
- Mathews, J. D., Forsythe, A. V., Brady, Z., Butler, M. W., Goergen, S. K., Byrnes, G. B., . . . Darby, S. C. (2013). Cancer risk in 680,000 people exposed to computed tomography scans in childhood or adolescence: data linkage study of 11 million Australians. *BMJ*, *346*, f2360.
- Mitchell, D. A., Fecci, P. E., & Sampson, J. H. (2008). Immunotherapy of malignant brain tumors. *Immunol Rev*, *222*, 70-100. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00603.x
- Morse, M. A., Garst, J., Osada, T., Khan, S., Hobeika, A., Clay, T. M., . . . Lyerly, H. K. (2005). A phase I study of dextran immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Transl Med*, *3*(1), 9. doi:10.1186/1479-5876-3-9
- Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavrier, P., Raposo, G., & D'Souza-Schorey, C. (2009). ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol*, *19*(22), 1875-1885. doi:10.1016/j.cub.2009.09.059
- Muralidharan-Chari, V., Clancy, J. W., Sedgwick, A., & D'Souza-Schorey, C. (2010). Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci*, *123*(Pt 10), 1603-1611. doi:10.1242/jcs.064386
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*, *170*(5), 1445-1453. doi:10.2353/ajpath.2007.070011
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2013). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*, *19*(4), 764-772. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3002
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Xu, J., Kromer, C., Wolinsky, Y., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2016). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009-2013. *Neuro Oncol*, *18*(suppl_5), v1-v75. doi:10.1093/neuonc/now207

- Parker, B. S., Rautela, J., & Hertzog, P. J. (2016). Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, *16*(3), 131-144. doi:10.1038/nrc.2016.14
- Poli, A., Kmiecik, J., Domingues, O., Hentges, F., Bléry, M., Chekenya, M., . . . Zimmer, J. (2013). NK cells in central nervous system disorders. *J Immunol*, *190*(11), 5355-5362. doi:10.4049/jimmunol.1203401
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O., . . . editors. (2001). *Neuroscience*. In. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10869/>
- Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P., & Ratajczak, M. Z. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, *20*(5), 847-856. doi:10.1038/sj.leu.2404132
- Sayegh, E. T., Oh, T., Fakurnejad, S., Bloch, O., & Parsa, A. T. (2014). Vaccine therapies for patients with glioblastoma. *J Neurooncol*, *119*(3), 531-546. doi:10.1007/s11060-014-1502-6
- Schaefer, L. (2014). Complexity of Danger: The Diverse Nature of Damage-associated Molecular Patterns. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(51), 35237-35245. doi:10.1074/jbc.R114.619304
- Schaeue, D., Xie, M. W., Ratikan, J., & McBride, W. (2012). Regulatory T Cells in Radiotherapeutic Responses. *Frontiers in Oncology*, *2*(90). doi:10.3389/fonc.2012.00090
- Sologuren, I., Rodríguez-Gallego, C., & Lara, P. C. (2014). Immune effects of high dose radiation treatment: implications of ionizing radiation on the development of bystander and abscopal effects. *Translational Cancer Research*, *3*(1), 18-31.
- Srinivasan, V. M., Ferguson, S. D., Lee, S., Weathers, S. P., Kerrigan, B. C. P., & Heimberger, A. B. (2017). Tumor Vaccines for Malignant Gliomas. *Neurotherapeutics*, *14*(2), 345-357. doi:10.1007/s13311-017-0522-2
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., . . . Group, N. C. I. o. C. C. T. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, *352*(10), 987-996. doi:10.1056/NEJMoa043330
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., . . . Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, *352*(10), 987-996. doi:doi:10.1056/NEJMoa043330
- Stupp, R., Tonn, J. C., Brada, M., & Pentheroudakis, G. (2010). High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, *21*(suppl_5), v190-v193. doi:10.1093/annonc/mdq187
- Tomayko, M. M., & Reynolds, C. P. (1989). Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol*, *24*(3), 148-154.
- Vader, P., Breakefield, X. O., & Wood, M. J. (2014). Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. *Trends Mol Med*, *20*(7), 385-393. doi:10.1016/j.molmed.2014.03.002
- van Tellingen, O., Yetkin-Arik, B., de Gooijer, M. C., Wesseling, P., Wurdinger, T., & de Vries, H. E. (2015). Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. *Drug Resist Updat*, *19*, 1-12. doi:10.1016/j.drup.2015.02.002

- Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*, 29, 235-271. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101324
- Watts, C., & Sanai, N. (2016). Surgical approaches for the gliomas. *Handbook of Clinical Neurology*, 134, 51-69. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802997-8.00004-9>
- Weller, M., Wick, W., Aldape, K., Brada, M., Berger, M., Pfister, S. M., . . . Reifenberger, G. (2015). Glioma. 1, 15017. doi:10.1038/nrdp.2015.17
- Wolf, P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*, 13(3), 269-288.
- Wrensch, M., Lee, M., Miike, R., Newman, B., Barger, G., Davis, R., . . . Neuhaus, J. (1997). Familial and personal medical history of cancer and nervous system conditions among adults with glioma and controls. *Am J Epidemiol*, 145(7), 581-593.
- Wrensch, M., Minn, Y., Chew, T., Bondy, M., & Berger, M. S. (2002). Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol*, 4(4), 278-299.
- Yang, L. J., Zhou, C. F., & Lin, Z. X. (2014). Temozolomide and radiotherapy for newly diagnosed glioblastoma multiforme: a systematic review. *Cancer Invest*, 32(2), 31-36. doi:10.3109/07357907.2013.861474
- Zwaal, R. F., & Schroit, A. J. (1997). Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*, 89(4), 1121-1132.