



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EL PAPEL DE LOS METABOLITOS DEL TRIPTÓFANO EN LA MODULACIÓN DEL  
MICROAMBIENTE DE TUMORES ASTROCÍTICOS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. EN C. VÁZQUEZ CERVANTES GUSTAVO IGNACIO**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DOCTORA VERÓNICA PÉREZ DE LA CRUZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DOCTORA LETICIA MORENO FIERROS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DOCTOR BENJAMÍN PINEDA OLVERA**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. , FEBRERO, 2022**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EL PAPEL DE LOS METABOLITOS DEL TRIPTÓFANO EN LA MODULACIÓN DEL  
MICROAMBIENTE DE TUMORES ASTROCÍTICOS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. EN C. VÁZQUEZ CERVANTES GUSTAVO IGNACIO**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DOCTORA VERÓNICA PÉREZ DE LA CRUZ**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DOCTORA LETICIA MORENO FIERROS**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DOCTOR BENJAMÍN PINEDA OLVERA**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2022**

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/045/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Me permito informar a usted qué en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **08 de noviembre de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **VÁZQUEZ CERVANTES GUSTAVO IGNACIO** con número de cuenta **104003965** con la tesis titulada **“EL PAPEL DE LOS METABOLITOS DEL TRIPTÓFANO EN LA MODULACIÓN DEL MICROAMBIENTE DE TUMORES ASTROCÍTICOS”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. VERÓNICA PÉREZ DE LA CRUZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI  
Vocal: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN  
Vocal: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE  
Vocal: DR. SAÚL GÓMEZ MANZO  
Secretario: DRA. LETICIA MORENO FIERROS

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

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 14 de enero de 2022

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## Agradecimientos institucionales.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por permitirme permanecer en su programa de estudios y contribuir con mi formación académica.

Al Programa de Becas Nacionales, CONACYT, CVU: 589440, trataré de que su inversión sea provechosa.

A la doctora Verónica Pérez de la Cruz, una gran guía y amiga, gracias por la confianza, la amistad y los aprendizajes. Muchas gracias por formarme. Espero que podamos seguir colaborando fructíferamente.

A la doctora Leticia Moreno Fierros, muchas gracias por todas las observaciones y su guía, muchas gracias por los viajes a Iztacala.

Al doctor Benjamín Pineda Olvera, muchas gracias por tu ayuda, tu colaboración y tus insistentes correcciones. Si puedo decir que soy un buen investigador, mucho es debido a ti.

## Agradecimientos personales.

A Beatriz Cervantes García, gracias por la vida y por las enseñanzas. Gracias por estar y aguantarme. Te quiero mucho.

A Gustavo David Vázquez Domínguez, a ti también te debo la vida y gracias por las lecciones de vida. Espero que estés feliz en donde te encuentres.

A Jesús Alejandro Vázquez Cervantes, muchas gracias Chuchín, a ver si ya te titulas pronto :)

Al equipo del Laboratorio de Neurobioquímica y Conducta. Dani, Tona, Pau, doctora Dinora, gracias por aguantar mi constante tendencia a la entropía en su mundo, pero las risas no faltaron.

Al equipo del Laboratorio de Neuroinmunología. Ale, Víctor, Rubén, muchas gracias por las risas y las inmunocosas.

A Eu, muchas gracias por estar y caminar juntos. Gracias por las aventuras. Muchas gracias.

A generaciones y generaciones de lanzadores del equipo representativo de la UNAM y a su entrenadora Claudia Becerril Rivera. Compartir tanto tiempo con ustedes ha sido maravilloso.

Tonantzi, la distancia será mucha, pero la amistad muy cercana. ¡¡Muchas gracias!!

A todas las personas, cosas y hechos, una combinación quizá azarosa que me ha hecho lo que soy hoy en día.

## Dedicatoria.

Esta va para mi abue María Cristina García Martínez, un poco de eternidad en este escrito, para siempre en mi memoria.



## Índice.

<b>Índice</b>	
<b>Índice de tablas</b>	
<b>Índice de figuras</b>	
<b>Abreviaturas</b>	
<b>Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>3</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>5</b>
Gliomas y astrocitomas.....	5
El glioblastoma multiforme.....	6
Características del glioblastoma multiforme.....	8
La vía de las kinureninas.....	14
La vía de las kinureninas en glioblastoma.....	18
<b>Justificación.....</b>	<b>20</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>21</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>21</b>
Objetivo general.....	21
Objetivos particulares.....	21
<b>Metodología.....</b>	<b>24</b>
Modelo <i>in vitro</i> .....	24
Líneas celulares.....	24
Cultivo primario de astrocitos.....	24
Cultivo de células mononucleares.....	25
Consumo y producción de metabolitos de la vía de las kinureninas.....	27
Consumo de l-kyn.....	27
Cuantificación de l-kyn.....	27
Cuantificación de KYNA.....	28
Cuantificación de 3-HK.....	28
Actividad de KAT.....	28
Actividad de KMO.....	29
Expresión de ARNm de KMO.....	29
Expresión de proteína de KMO.....	31

Efecto de los metabolitos de la VK en linfocitos activados.....	33
Proliferación de linfocitos. ....	33
Ciclo celular. ....	34
Muerte celular.....	35
Modelo <i>in vivo</i> .....	36
Desarrollo de tumores intracraneales.....	36
Evaluación de la VK en tumores.....	37
Determinación de poblaciones del sistema inmune.....	37
Estudio en muestras derivadas de pacientes.....	39
Análisis bioinformático.....	39
Muestras de pacientes. ....	39
Análisis estadístico. ....	40
<b>Resultados</b> .....	<b>41</b>
Consumo de l-kyn en líneas celulares de glioma murino y líneas celulares humanas de GBM....	41
Evaluación de KMO en el desarrollo de tumores <i>in vivo</i> e influencia en el infiltrado celular. ....	43
Impacto de los catabolitos del triptófano en linfocitos T activados. ....	45
Expresión y actividad de KMO en líneas celulares humanas de GBM. ....	51
Expresión de las enzimas de la VK en pacientes con astrocitomas. ....	54
<b>Discusión</b> .....	<b>60</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>68</b>
<b>Perspectivas</b> .....	<b>69</b>
<b>Referencias Bibliográficas</b> .....	<b>70</b>
<b>Anexo (artículo requisito para la obtención de grado)</b> .....	<b>82</b>

## Índice de tablas.

- **Tabla 1. Principales características genéticas de las líneas celulares utilizadas. .... 26**
- **Tabla 2. Secuencias delantera y reversa de los cebadores de KMO y GAPDH utilizados para la RT-qPCR. .... 31**
- **Tabla 3. Características clínicas y demográficas de los pacientes cuyas muestras fueron analizadas en este estudio. .... 56**

## Índice de figuras.

- **Figura 1. El catabolismo del triptófano a través de la vía de las kinureninas. .... 16**
- **Figura 2. Diseño experimental.....23**
- **Figura 3. Catabolismo de l-kinurenina (l-kyn) en líneas celulares de glioma murino y líneas humanas de glioblastoma (GBM). .... 42**
- **Figura 4. La vía de las kinureninas durante el desarrollo tumoral. .... 44**
- **Figura 5. Poblaciones del sistema inmune infiltradas en tumores intracraneales. .... 45**
- **Figura 6. Efecto de los catabolitos del triptófano en la proliferación de linfocitos T activados. .... 46**
- **Figura 7. Ciclo celular de linfocitos activados, incubados con los catabolitos del triptófano. .... 48**
- **Figura 8. Muerte celular en linfocitos activados incubados con los catabolitos del triptófano. .... 50**
- **Figura 9. Expresión de kinurenina monooxigenasa (KMO) en líneas celulares humanas de GBM. .... 52**
- **Figura 10. Localización de kinurenina monooxigenasa (KMO) en líneas humanas de GBM. .... 53**
- **Figura 11. Análisis bioinformático de la expresión de las enzimas de la vía de las kinureninas (VK) en astrocitomas. .... 55**
- **Figura 12. Expresión de kinurenina monooxigenasa (KMO) en gliomas.. 57**
- **Figura 13. Localización de kinurenina monooxigenasa (KMO) en tejido tumoral. .... 60**
- **Figura 14. Catabolismo del triptófano en astrocitos comparado con astrocitos transformados..... 68**

## Abreviaturas.

3HAADO	3-HANA dioxigenasa	EDTA	Ácido etilen- diaminotetraacético
3-HANA	Ácido 3-hidroxiantranílico	EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
3-HK	3-hidroxikinurenina	EROs	Especies reactivas de oxígeno
ABG	Astrocitomas de bajo grado	FasL	Ligando de Fas
ABS	Albúmina sérica bovina	FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Acms	2-amino-3-carboximuconato semialdehído	GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa humana
ADN	Ácido desoxirribonucleico	GBM	Glioblastoma multiforme
ADNasa	Ácido desoxirribo- nucleotidasa	GFAP	Proteína glial ácida fibrilar
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario	GPR35	Receptor acoplado a proteína G 35
AHR	Receptor de arilos hidrocarbonados	GTEX	Genotype-Tissue Expression
ANA	Ácido antranílico	Gy	Gray
ARNasa	Ácido ribonucleotidasa	HIF-1 $\alpha$	Factor inducible por hipoxia
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	HLA	Antígeno leucocitario humano
ATP	Adenosina trifostato	HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
CCL2	Ligando de quimiocina 2	IDH	Isocitrato deshidrogenasa
CCL5	Ligando de quimiocina 5	IDH <sup>m</sup>	Isocitrato deshidrogenasa mutante
CD	Grupo de diferenciación	IDH <sup>wt</sup>	Isocitrato deshidrogenasa silvestre
CFSE	Carboxifluoresceína succinimidil ester		
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono		
COX-2	Ciclooxigenasa-2		
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol		
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium		

IDO	Indolamina 2,3-dioxigenasa	PD-L1	Ligando de la proteína Muerte celular programada
IFN- $\gamma$	Interferón gamma	PE	Ficoeritrina
IL-10	Interleucina-10	PGE-2	Prostaglandina E2
INNN-MVS	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez"	PHA	Fitohematoglutinina
		PI3K/AKT	Cinasa de fosfatidilinositol
KAT	Kinurenina aminotransferasa	PKM2	Piruvato cinasa M2
KMO	Kinurenina monooxigenasa	QPRT	Quinolinato fosforribosil transferasa
KYNA	Ácido kinurénico	Quin	Ácido quinolínico
KYNU	Kinureninasa	rpm	Revoluciones por minuto
I-kyn	I-kinurenina	RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
MDSCs	Células supresoras de origen mieloide	SFB	Suero fetal bovino
MFI	Intensidad media de fluorescencia	SNC	Sistema Nervioso Central
MGMT	8-metilguanosina metiltransferasa	T CD4+	Linfocitos T cooperadores
		T CD8+	Linfocitos T citotóxicos
mTOR	Blanco de rapamicina de mamíferos	TAMs	Macrófagos asociados a tumor
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamina-adenina-dinucleótido	TCGA	The Cancer Genome Atlas
NK	Células asesinas naturales	TDO	Triptófano 2,3-dioxigenasa
NKT	Linfocitos asesinos naturales con receptor T	TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante
NMDA	N-metil-D-aspartato	TMZ	Temozolamida
OMS	Organización Mundial de la Salud	TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
P5P	Piridoxal-5-fosfato	Tregs	Linfocitos T reguladores
PBS	Amortiguador de fosfatos		

VEFG

Factor de crecimiento  
vascular endotelial

VK

Vía de las kinureninas

## Resumen.

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor maligno primario del sistema nervioso central (SNC) más frecuente y dañino que existe, con una mediana de supervivencia de 14.6 meses y un porcentaje de supervivencia a los cinco años de 7.2%. El GBM es un tumor altamente heterogéneo que presenta poblaciones del sistema inmune infiltrantes del tumor, las cuales no eliminan al tumor debido a los mecanismos de inmunoeedición que se desarrollan en las células tumorales. Uno de estos mecanismos de inmunoeedición es la degradación del triptófano a través de la vía de las kinureninas (VK). La sobreexpresión de la indoleamina dioxigenasa (IDO) se ha asociado con la baja supervivencia de los pacientes con GBM. Sin embargo, el papel que juegan el resto de los componentes de la VK en la patogénesis del GBM se encuentra poco estudiado, a pesar de que muchos metabolitos de esta vía son considerados inmunomoduladores. El objetivo de este estudio es determinar si la expresión de la enzima de la VK, kinurenina monooxigenasa (KMO), está involucrada con la inmunomodulación en GBM.

Se caracterizó el catabolismo de la l-kinurenina (l-kyn), la producción de metabolitos de la VK, ácido kinurénico (KYNA) y 3-hidroxicinurenina (3-HK), la actividad enzimática de la kinurenina aminotransferasa (KAT) y KMO, así como, la expresión de KMO en líneas celulares de glioma murino (C6 y Rg2) y líneas celulares humanas de GBM (A172, LN18, U87 y U373). Se determinó el efecto de los metabolitos de la VK en linfocitos T activados. Adicionalmente, se analizó la actividad de KAT y KMO, y la variación en las poblaciones infiltrantes del tumor en tumores intracraneales murinos a 10 y 20 días post-implante. Finalmente se evaluó

la expresión de enzimas de la VK en bases de datos de pacientes de GBM y se evaluó la actividad y expresión de KMO en muestras de pacientes con astrocitomas.

Las líneas celulares de glioma murino y de GBM consumieron I-kyn y produjeron KYNA, como es de esperar de acuerdo con su linaje astrocítico. Sin embargo, se encontró que las líneas de glioma murino y GBM expresaron y presentaron actividad de KMO, lo que representa una característica novedosa y que no había sido descrita en el contexto del GBM. También se encontró que la actividad de KAT y de KMO, junto con la proporción de linfocitos totales, linfocitos cooperadores, células asesinas naturales (NK) y monocitos, varió con respecto al tiempo post-implante. Por otra parte, los metabolitos de la VK inhibieron la proliferación celular, induciendo el arresto del ciclo celular y promovieron la apoptosis en linfocitos *in vitro*. Finalmente, se demostró que las enzimas de la VK se encuentran sobreexpresadas en astrocitomas de bajo grado y GBM con respecto a corteza cerebral, y que KMO se expresa y es activa en células malignas de linaje astrocítico presentes GBM; además se encontró que la expresión de KMO tiene un impacto negativo en la sobrevida de pacientes con GBM.

Este trabajo muestra la dinámica de la vía de las kinureninas en el desarrollo tumoral del GBM, mostrando por primera vez la expresión y actividad de KMO en GBM, una característica novedosa debido al origen astrocítico de estos tumores, lo cual abre las puertas a un nuevo campo de investigación, ya que puede representar un nuevo marcador pronóstico para pacientes con GBM y un posible blanco terapéutico.



## Abstract.

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most frequent and lethal of the primary brain tumors with median survival of 14.6 months and a 5 year-survival of 7.2%. GBM are highly heterogeneous and immunosuppressive tumors, due to the immunoediting mechanisms elicited by the malignant cells to suppress the anti-tumor immune response. One of such mechanisms is the tryptophan catabolism through the kynurenine pathway (KP). On this way, the expression of the enzyme indoleamine dioxygenase (IDO) has been associated with poor patient prognosis and low survival. However, the role of the KP enzymes and metabolites downstream IDO on GBM pathogenesis remains poorly understood, even when some of the KP metabolites are considered as immunosuppressants. The aim of this work was to determine the role of the KP enzyme kynurenine monooxygenase (KMO) on GBM.

We evaluated the catabolism of l-kynurenine (l-kyn), as well as the production of kynurenic acid (KYNA) and 3-hydroxykynurenine (3-HK), the activity of the enzymes kynurenine aminotransferase (KAT) and KMO and the expression of KMO in glioma murine cell cultures C6 and Rg2, GBM cell cultures (A172, LN18, U87, U373). We also determined the effect of the KP metabolites on activated T-lymphocytes. Additionally, we analyzed the activity of KAT and KMO, and the variation on tumor infiltrated populations, on 10 and 20 days after implant intracranial tumors. Finally, we evaluated the expression of the KP enzymes in on-line GBM patient databases and the expression and activity of KMO was evaluated in patient samples.

The malignant cells consumed l-kyn and produced KYNA as expected for astrocyte-derived cells, However, glioma and GBM cells presented expression and activity of KMO, representing a novel characteristic on GBM. We also found time-dependent variations on KAT and KMO activity, as well as in the percentages of infiltrated populations in our *in vivo* model. Furthermore, we found that KP metabolites inhibited T-cell proliferation by inducing cell-cycle arrest and increased apoptosis *in vitro*. Finally, we found that KP enzymes are overexpressed in low grade astrocytomas and GBM compared to brain cortex and the KMO is expressed and is active in malignant cells on GBM tissue. Furthermore, we found that KMO expression impacts negatively on patient survival.

This work demonstrates the dynamic of the KP on GBM development, showing for the first time the expression and activity of KMO on GBM, a novel character due to the astrocytic origin of GBM, which represents a novel field for the understanding tumor cell biology using KMO as a prognostic marker and a possible therapeutic target.

## Introducción.

### Gliomas y astrocitomas.

Los gliomas son tumores malignos más frecuentes de las neoplasias primarias del SNC, y son derivados del tejido glial, astrocitos, oligodendrocitos y células ependimales (Ostrom *et al.*, 2020). En conjunto, los gliomas representan el 24.3% de todos los tumores del SNC y el 81.8% de los tumores malignos originados en el SNC (Ostrom *et al.*, 2020). De entre estos tumores, aquellos que se originaron de los astrocitos, los cuales son células gliales encargadas de mantener la homeostasis del SNC regulando los niveles de nutrientes, iones y neurotransmisores en el tejido nervioso (Sofroniew y Vinters, 2010), son denominados astrocitomas (Dictionary of cancer terms. National Cancer Institute. Consultado el 25/06/21).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha propuesto un sistema de clasificación de tumores, dependiendo de su grado de malignidad, dentro de los que se ha organizado a los astrocitomas (Louis *et al.*, 2007). El grado I, corresponde al grado más bajo, son tumores de lenta proliferación con probabilidades de curación tras la práctica de una cirugía extractiva, los astrocitomas de células gigantes subependimales y los astrocitomas pilocíticos pertenecen a este grupo (Louis *et al.*, 2007; Louis *et al.*, 2016). Los astrocitomas de grado II, aunque aún presentan una tasa baja de proliferación, empiezan a infiltrarse en tejido sano, pueden progresar hacia la formación de tumores de mayor malignidad y pueden presentar recurrencias posteriores a una tumorectomía; los astrocitomas difusos, los oligodendrogliomas y los xantoastrocitomas pleomórficos son considerados dentro del grado II (Louis *et al.*, 2007; Louis *et al.*, 2016). Los tumores de grado III,

presentan un alto grado de proliferación y así como atipias nucleares, hipercromía o núcleos gigantes; los astrocitomas anaplásicos, los oligodendrogliomas anaplásicos y los xantoastrocitomas pleomórficos anaplásicos son clasificados como astrocitomas de grado III (Louis *et al.*, 2007; Louis *et al.*, 2016). Finalmente, las neoplasias de grado IV son las de mayor grado de malignidad, estos tumores presentan una alta actividad mitótica, centros necróticos, la recurrencia post-cirugía es frecuente y una alta mortalidad; el GBM es el astrocitoma de grado IV (Louis *et al.*, 2007; Louis *et al.*, 2016).

La quinta edición de la “Clasificación de Tumores del SNC” de la OMS introdujo cambios en la clasificación de los astrocitomas tomando en cuenta las recomendaciones del “Consortio para Informar Avances Moleculares y Prácticos en la Taxonomía de Tumores del SNC” (Louis *et al.*, 2021). Estos cambios agrupan ahora a los astrocitomas descritos anteriormente en dos grandes grupos, los astrocitomas que presentan mutaciones en la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH<sup>m</sup>) e incluye a los astrocitomas de grado II a IV, llamándose ahora Astrocitomas IDH<sup>m</sup> SNC OMS grado 2 a 4; y GBM que presenta isocitrato deshidrogenasa silvestre (IDH<sup>wt</sup>, Louis *et al.*, 2021).

#### [El glioblastoma multiforme.](#)

El GBM es el más frecuente y dañino de los tumores malignos primarios del SNC, representando el 48.6% de todos los tumores malignos originados en el SNC, el GBM tiene una incidencia de 3.23 casos por cada 100,000 habitantes que se presenta en 1.59 hombres por cada mujer (Ostrom *et al.*, 2020). De manera clásica, el GBM se reconoce como primario, cuando una neoplasia forma *de novo* este tipo

de tumor, lo que ocurre aproximadamente en el 90% de los casos (Ohgaki y Kleihues, 2013); o secundario, el cual proviene de astrocitomas de bajo grado de malignidad que fueron progresando hasta convertirse en GBM (Ohgaki y Kleihues, 2013). La edad media de diagnóstico de GBM primarios es de 62 años, mientras que para GBM secundarios es de 45 años (Ohgaki y Kleihues, 2013).

Actualmente, el tratamiento establecido para el GBM consiste en la resección quirúrgica, en el caso que sea posible, eliminando cerca del 90% de la masa tumoral, seguido de la combinación de radioterapia y quimioterapia (Stupp *et al.*, 2005; Stupp *et al.*, 2014). La radioterapia consiste en la aplicación de 60 Grays (Gy), unidad de radiación del Sistema Internacional de Unidades equivalente a la absorción de 1 Joule por kilogramo de masa, administrados en 30 o 33 fracciones; este protocolo prolonga la mediana de supervivencia de 8 meses a 12.1 meses (Stupp *et al.*, 2014). Mientras la quimioterapia consiste en la administración de temozolamida (TMZ), un agente alquilante, diariamente durante siete días de manera paralela a la radioterapia seguida de seis ciclos de una toma diaria durante cinco días cada cuatro semanas (Stupp *et al.*, 2014). El protocolo completo prolonga la mediana de supervivencia a 14.6 meses, sin embargo, solamente el 7.2% de los pacientes diagnosticados con GBM sobreviven más de cinco años haciendo del GBM una enfermedad incurable (Stupp *et al.*, 2005; Ostrom *et al.*, 2020). El bajo impacto del tratamiento contra el GBM se puede atribuir a la alta tasa de recurrencia y al desarrollo de resistencia a fármacos por parte de las células tumorales, así como a la alta complejidad morfológica de estos tumores (Buglione *et al.*, 2016; Campos *et al.*, 2016).

Morfológicamente, los GBM presentan una alta heterogeneidad de tipos celulares, lo que le ganó la denominación de “multiforme” (Jellinger, 1978). En el tejido de un GBM se aprecian células con pleomorfismos nucleares y núcleos hipercromáticos, formas mitóticas, células con alto contenido de lípidos, presencia de vasos sanguíneos, zonas necróticas que pueden estar rodeadas por células en pseudoempalizada y poblaciones del sistema inmune infiltrantes del tumor (Jellinger, 1978; Abdelzaher, consultado el 29 de junio de 2021).

Finalmente, tanto la heterogeneidad morfológica como la patofisiología del GBM son el reflejo de características intrínsecas que desarrollan las células tumorales y que permiten a estos astrocitos transformados establecer tumores de rápido crecimiento (Hanahan y Weinberg, 2011; Qazi *et al.*, 2017).

#### Características del glioblastoma multiforme.

En los últimos 20 años la comprensión de la biología del cáncer se ha basado en el estudio de un conjunto de características adquiridas que permiten a una célula transformada establecerse en un nicho y formar un tumor (Hanahan y Weinberg, 2011). Tales características pueden ser de carácter “intrínseco” a la célula tumoral como la inestabilidad genómica, la evasión de la muerte celular programada, la alteración del ciclo celular o la reprogramación metabólica; mientras que otras características incluyen mecanismos que involucran a poblaciones celulares no tumorales tales como procesos de angiogénesis y la modulación de la respuesta inmune. Estas características adquiridas pueden estar interconectadas dando lugar al modelaje de un ambiente altamente heterogéneo como ocurre en el GBM (Hanahan y Weinberg, 2011; Fouad y Aanei, 2017).

De entre estas características destaca la inestabilidad genómica, un conjunto de aberraciones que le permiten a las células malignas mutar con facilidad (Hanahan y Weinberg, 2011). Si bien la prevalencia de mutaciones por megabase en el genoma del GBM no es tan alta comparada con otros tumores como el melanoma o cáncer de pulmón (Schumacher y Schreiber, 2015), se han caracterizado una serie de alteraciones genéticas comunes al GBM (Verhaak *et al.*, 2010; Soomro *et al.*, 2017). Las alteraciones más frecuentes en GBM son la pérdida de heterocigosidad del cromosoma 10q, la metilación del promotor del gen que codifica para la 8-metilguanosina metiltransferasa (*MGMT*), la amplificación del gen del receptor del factor de crecimiento epidermal (*EGFR*), mutaciones del gen *P53* e *IDH<sup>m</sup>* (Soomro *et al.*, 2017). La frecuencia de estas alteraciones genéticas varía de acuerdo con el tipo de GBM, primario o secundario, y se ha propuesto una clasificación molecular del GBM en cuatro subtipos dependiendo de sus características genotípicas (Ohgaki y Kleihues, 2013; Verhaak *et al.*, 2010). La inestabilidad genómica produce la diversidad de mutaciones en el genoma de las células tumorales que actúan como una presión de selección y les permiten evadir la muerte celular programada, alterar el ciclo celular, la proliferación descontrolada y la reprogramación metabólica (Negrini *et al.*, 2010; Hanahan y Weinberg, 2011).

La reprogramación metabólica se refiere a las modificaciones que ocurren en el metabolismo de las células tumorales que les permiten cubrir la demanda bioenergética que implican las altas tasas de proliferación (Hanahan y Weimberg, 2011). Una de las alteraciones metabólicas más aceptadas que ocurren en el GBM es el “efecto Warburg” o “glucólisis anaerobia” (Wolf *et al.*, 2010; Agnihotri y Zadeh,

2016). En este proceso, las células tumorales presentan una alta tasa de consumo de glucosa la cual es convertida a lactato aún en condiciones de normoxia y la ganancia energética de dos moléculas de adenosina trifostato (ATP) por cada molécula de glucosa (Liberti y Locasale, 2016). En GBM, el cambio hacia el “efecto Warburg” se ha asociado a las mutaciones de IDH, dado que el producto de la IDH mutante, 2-hydroxyglutarato, promueve la activación del factor inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ), induciendo la producción de lactato (Zhao *et al.*, 2009; Agnihotri y Zadeh, 2016). Por otra parte, alteraciones en vías de señalización como la de la cinasa de fosfatidil-inositol (PI3K)/AKT/ y el blanco de rapamicina de mamíferos (mTOR), y la activación de la piruvato cinasa M2 (PKM2) también favorecen el cambio del metabolismo hacia la producción de lactato en GBM (Yang *et al.*, 2012; Masui *et al.*, 2013). Recientemente se han descrito poblaciones de células tumorales troncales de GBM capaces de sintetizar ATP por medio de la fosforilación oxidativa. Además, se describió en estas poblaciones celulares la capacidad de cambiar su metabolismo hacia la producción de lactato y de presentar mayor resistencia a fármacos (Vlashi *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2013; Saga *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015; Shibao *et al.*, 2018). Por otra parte, se ha demostrado que las células de GBM también pueden sintetizar y metabolizar ácidos grasos para la obtención de energía, contribuyendo a la heterogeneidad fenotípica del GBM (Tao *et al.*, 2013; Mashimo *et al.*, 2014; Strickland y Stoll, 2017).

Como se mencionó anteriormente, la modulación de la respuesta inmune anti-tumoral es una característica que permite el desarrollo de los tumores (Jellinger, 1978; Abdelzaher, consultado el 29 de junio de 2021). Las células transformadas



emplean estrategias para modular su microambiente que les permiten regular la respuesta inmune, estos mecanismos se desarrollan durante el establecimiento y desarrollo tumorales bajo la presión de selección que representan los procesos de reconocimiento y citotoxicidad de las diferentes poblaciones que constituyen al sistema inmune del organismo (Rabinovich *et al.*, 2007; Waziri, 2010). Así, las células tumorales que son capaces de sobrevivir, evadir y modular la respuesta inmune son aquellas que proliferan para dar forma al tumor (Rabinovich *et al.*, 2007). Debido a esto, parte de la diversidad celular del GBM está conformada por poblaciones del sistema inmune asociadas al tumor. En GBM, los macrófagos asociados al tumor (TAMs) y las células supresoras de origen mieloide (MDSCs) constituyen entre  $1.8 \times 10^7$  y  $3.7 \times 10^7$  células por gramo de tejido tumoral (Giering *et al.*, 2017). Estas células se infiltran en el tumor por acción de factores quimiotácticos, los ligandos de quimiocinas 2 y 5 (CCL2, CCL5) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) secretados por las células malignas, y contribuyen al crecimiento tumoral mediante la expresión de factores de crecimiento y metaloproteinasas que favorecen la invasividad del tumor (Giering *et al.*, 2017; Broekman *et al.*, 2018). Además, TAMs y MDSCs contribuyen a la supresión de la respuesta inmune con la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y de citocinas supresoras de linfocitos T, induciendo un estado anérgico en estas poblaciones, así como la formación de fenotipos reguladores de los mismos (Perng y Lim, 2015). En muestras de pacientes de GBM se ha determinado que entre el 20 y el 30% de los leucocitos infiltrados en el tejido tumoral está conformado por linfocitos, de los cuales los linfocitos T cooperadores, caracterizados por la expresión del grupo de diferenciación (CD) 4, (CD4+) son más abundantes que los

linfocitos T citotóxicos (CD8+) (Gieryng *et al.*, 2017). La abundancia de linfocitos T cooperadores se ha asociado con la malignidad de los astrocitomas, variando entre 39% para astrocitomas IDH<sup>m</sup> SNC OMS grado 2, hasta 98% en GBM (Gieryng *et al.*, 2017). Por el contrario, la abundancia de linfocitos T citotóxicos se asocia con mayor supervivencia de los pacientes (Han *et al.*, 2014). Cabe mencionar que otra población con funciones citotóxicas descrita en los glioblastomas son las células NK, aunque no se presentan con tanta abundancia como los linfocitos T (Gieryng *et al.*, 2017). Debido al conjunto de citocinas secretadas por las células malignas, MDSCs y células reguladoras, las poblaciones de linfocitos efectores, CD8+ y NKs, infiltradas en los glioblastomas permanecen anérgicas (Perng y Lim, 2015; Broekman *et al.*, 2018), por lo que no llevan a cabo respuestas antitumorales.

De la población perteneciente a los linfocitos T cooperadores, entre el 10 y el 15% son linfocitos T reguladores (Tregs). Los linfocitos Tregs, CD4+/CD25+/FoxP3+, tienen como función secretar citocinas que evitan la activación de las células citotóxicas (El Andaloussi *et al.*, 2006; El Andaloussi *et al.*, 2007) y su abundancia en tejido tumoral también se considera como marcador de mal pronóstico en los pacientes de GBM (Wainwright *et al.*, 2014); por otro lado, también se ha descrito la presencia de linfocitos asesinos naturales con receptor T (NKT) reguladores, las cuales promueven la activación de MDSCs mediada por la producción de interleucina-13 (Brettschneider *et al.*, 2021).

Por otra parte, las células de GBM son capaces de expresar moléculas de superficie que regulan de manera negativa a la actividad de los linfocitos T. Una de estas moléculas es el ligando de muerte celular programada (PD-L1), esta proteína

evita la co-estimulación y completa activación de linfocitos T CD4+ y CD8+, inhibiendo su actividad antitumoral (Buchbinder *et al.*, 2016; Boussiotis, 2016). Las células de GBM también expresan en su superficie moléculas no clásicas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I, estas moléculas como los antígenos leucocitarios humanos (HLA)-E y HLA-G son ligandos de receptores inhibidores de las células NK, por lo que la unión de estas moléculas expresadas en la membrana de las células tumorales evita que sean destruidas por estas células citotóxicas (Waziri, 2010). Otra molécula sobre expresada en glioblastoma es el ligando de Fas (FasL), FasL se une a su receptor en los linfocitos T y células NK, estimulando la activación de caspasas y la apoptosis en estas células, a esta estrategia se le ha denominado “contraataque de las células tumorales” (Strege *et al.*, 2004). Las células tumorales, además de estar sobreexpresadas en la membrana celular, son capaces de secretar formas solubles de estas proteínas y así llevar a cabo sus efectos aún sin el contacto célula-célula (Waziri, 2010). Por otra parte, las células tumorales secretan factores de crecimiento y otras moléculas solubles que contribuyen a la supresión de la actividad citotóxica de las poblaciones del sistema inmune (Rabinovich *et al.*, 2007; Waziri, 2010). Se ha reportado altos niveles del factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) en muestras de GBM, esta citocina atenúa la activación de linfocitos y monocitos. Así mismo, las células tumorales secretan prostaglandina E2 (PGE-2), esto debido a la alta producción de su precursor, el ácido araquidónico, y a la sobreexpresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Lauro *et al.*, 1986; Nathoo *et al.*, 2004). Los altos niveles de expresión de COX-2 en GBM se han asociado con la malignidad del tumor y la baja supervivencia de los pacientes (Wang *et al.*, 2015b). La presencia de TGF- $\beta$ , de interleucina-10 (IL-

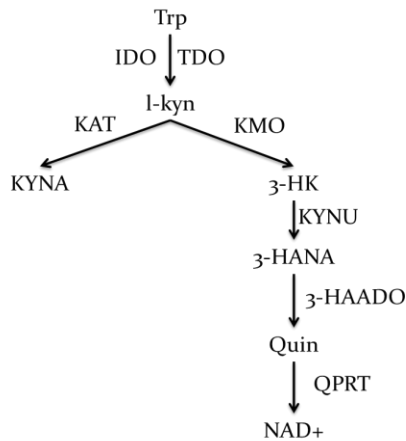
10) y la sobreexpresión de COX-2 en el microambiente tumoral son condiciones que favorecen el desarrollo de linfocitos Tregs dentro GBM (Akasaki *et al.*, 2004); aunque se han reportado altos niveles de IL-10 en las muestras de GBM, su producción se debe a la presencia de TAMs (Broekman *et al.*, 2018).

Además de los mecanismos citados, rutas metabólicas presentes en las células tumorales han sido consideradas como mecanismos de inmunosupresión. Una de estas rutas metabólicas que ha sido de amplio interés como mecanismo inmunosupresor en diferentes tipos de cáncer es el catabolismo del triptófano a través de la VK.

#### La vía de las kinureninas.

El triptófano es un aminoácido esencial, es decir, no puede ser sintetizado de novo por células de mamíferos (Bender, 1982). Del total del triptófano consumido, menos del 1% es destinado para su uso en la síntesis de proteínas, el resto es metabolizado por diferentes enzimas que dirigen a este aminoácido para la síntesis de serotonina, melatonina y principalmente para la formación de nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) (Green *et al.*, 1980; Bender, 1982; Huether *et al.*, 1992). Este último se produce *de novo* a partir del catabolismo triptófano mediante la VK en la mayoría de los taxones del dominio Eukarya (Gossmann *et al.*, 2012). La vía de las kinureninas consume entre el 95% y el 99% del triptófano ingerido en mamíferos, y se inicia con la apertura del anillo pirrólico del triptófano y la formación de N-formilkinurenina catalizadas por la triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO; expresada principalmente en hígado), y por la IDO (expresada en tejidos extrahepáticos como en cerebro, pulmón, riñón y monocitos), y su isoenzima la IDO-2 (Bender, 1982;

Chen y Guillemin, 2009). La actividad de la TDO se encuentra restringida hacia el L-triptófano, mientras que IDO e IDO2 son capaces de usar los isómeros D y L-triptófano, así como otros compuestos derivados del triptófano (Hayaishi, 1976). La N-formilkinurenina es transformada en l-kyn por acción de la arilformamidasa. La l-kyn puede ser utilizada por la KAT, la kinureninasa (KYNU), o la KMO para la síntesis del KYNA, el ácido antranílico (ANA) y 3-HK, respectivamente (Phillips, 2014; Majewski *et al.*, 2016; Nematollahi *et al.*, 2016). De estas, la KMO presenta una mayor afinidad hacia su substrato, indicando que la L-kyn es principalmente catalizada por la KMO (Wang *et al.*, 2015a). El 3-HK es substrato de las KAT's para la síntesis de ácido xanturénico, o de la KYNU para la formación del ácido 3-hidroxi-antranílico (3-HANA) (Han *et al.*, 2001; Phillips, 2014). La 3-HANA dioxigenasa (3HAADO) produce 2-amino-3-carboximuconato semialdehído (Acms), el cual se deshidrata de manera espontánea formando ácido quinolínico (Quin) o es transformado en ácido picolínico por la descarboxilasa de Acms. Finalmente, el Quin es transformado en mononucleótido de ácido nicotínico, precursor de NAD<sup>+</sup>, por la fosforribosil transferasa de Quin (Stavrum *et al.*, 2013; Badawy *et al.*, 2017) (Figura 1).



**Figura 1.** El catabolismo del triptófano a través de la vía de las kinureninas.

La VK ha resultado ser de relevancia en la homeostasis del sistema nervioso central, el ambiente redox y la regulación de la respuesta inmune. En este contexto, KYNA es el único antagonista endógeno de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) conocido hasta el momento, e inhibe a los receptores  $\alpha$ -7-nicotínicos, por estas propiedades se ha considerado como una molécula neuromoduladora (Foster *et al.*, 1984). Además, KYNA ha demostrado ser un atrapador de EROs como anión superóxido, peroxinitrito y radical hidroxilo, y de proteger contra el daño ejercido por diferentes agentes pro-oxidantes, considerando a KYNA como un antioxidante endógeno (Lugo-Huitrón *et al.*, 2011). También se ha descrito el efecto de KYNA como un activador del receptor acoplado a proteína G 35 (GPR35) y del receptor de arilos hidrocarbonados (AHR), mediando respuestas antinociceptivas, regulando respuestas inmunes pro-inflamatorias e induciendo la generación de Tregs (Wang

*et al.*, 2006; Mezrich *et al.*, 2010; Cosi *et al.*, 2011; Moroni *et al.*, 2012; Berlinguer-Palmini *et al.*, 2013).

3-HK Y 3-HANA actúan de manera dual desde una perspectiva redox. Se ha descrito el efecto tóxico de 3-HK en neuronas debido a la inducción de agregados de proteínas y al aumento de EROs (Nakagami *et al.*, 1996; Okuda *et al.*, 1998; Goldstein *et al.*, 2000; Vazquez *et al.*, 2002); 3-HANA es capaz de promover el daño a proteínas por su interacción con iones metálicos y a la formación de radical hidroxilo, además de que se ha descrito su efecto como un desacoplante de la fosforilación oxidativa y en la disminución del consumo de oxígeno (Quagliariello *et al.*, 1964; Goldstein *et al.*, 2000). Por otra parte, existen reportes que demuestran la capacidad antioxidante de ambos compuestos. Tanto 3-HK como 3-HANA son atrapadores de radicales libres como el anión superóxido y ambos se comportan como acarreadores de electrones (Goshima *et al.*, 1986; Leipnitz *et al.*, 2007), restableciendo la cadena transportadora de electrones mitocondrial inhibida (Quagliariello *et al.*, 1966). Se ha demostrado que 3-HK y 3-HANA inhiben la proliferación de linfocitos T, además de inducir muerte celular en estas células (Frumento *et al.*, 2002; Belladonna *et al.*, 2007).

Finalmente, Quin se ha descrito como un compuesto pro-convulsivo debido a su papel como agonista de receptores NMDA, teniendo un efecto excitotóxico en neuronas debido al aumento de calcio intracelular, la liberación de glutamato y la inducción de la apoptosis (Moroni *et al.*, 1984; Bordelon *et al.*, 1997; Tavares *et al.*, 2000). Quin también se comporta como un compuesto pro-oxidante debido a que es capaz de inducir disfunción mitocondrial por la reducción de la actividad de los

complejos respiratorios II y III, así como de aumentar los niveles de EROs y la peroxidación lipídica en presencia de  $Fe^{3+}$  (Goda *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 2006). En cuanto a la regulación de la respuesta inmune, Quin también promueve la muerte celular de linfocitos (Frumento *et al.*, 2002; Belladonna *et al.*, 2007). Debido a la importancia de la VK en la regulación de la respuesta inmune, ésta se ha considerado como un mecanismo de inmuoedición en diferentes tipos de cáncer incluido el GBM.

#### La vía de las kinureninas en glioblastoma.

El catabolismo del triptófano a través de la VK resulta de particular interés en el microambiente tumoral debido a que puede conferir ventajas a las células malignas para establecerse y desarrollar un tumor (Prendergast, 2011). En relación con esto se han propuesto diferentes hipótesis que resaltan la importancia de la VK en cáncer (Prendergast, 2011; Adams *et al.*, 2012): El consumo de triptófano por parte de los tumores disminuye la disponibilidad de este aminoácido para los linfocitos, por lo que los linfocitos son incapaces de proliferar (Frumento *et al.*, 2002; Prendergast, 2011). La producción de metabolitos de la VK con capacidad inmunosupresora inhibe la proliferación e induce la muerte de linfocitos T o promueve la formación de linfocitos Tregs que favorecen la sobrevivencia del tumor (Frumento *et al.*, 2002; Belladonna *et al.*, 2007; Mezrich *et al.*, 2010). Finalmente, la expresión de enzimas de la VK mantiene el reservorio de  $NAD^+$  necesario para cubrir los requerimientos metabólicos de un tumor y favorecer su crecimiento (Adams *et al.*, 2012).



IDO ha sido el componente de la VK más estudiado en GBM. IDO se sobreexpresa en el tejido tumoral de pacientes con GBM (Wainwright *et al.*, 2012). Además, los niveles de expresión de IDO se han asociado con la presencia de altos porcentajes de Tregs en el tejido tumoral, así como con la baja supervivencia de los pacientes (El Andaloussi *et al.*, 2007; Wainwright *et al.*, 2012). Por otra parte, valores del ratio I-kyn/triptófano en suero de pacientes con GBM con respecto a sujetos sanos se han asociado a la actividad enzimática de IDO presente en los tumores (Adams *et al.*, 2014). Otra enzima de la VK descrita en distintos tipos de cáncer, incluido GBM, es la TDO (Kudo *et al.*, 2020). Se ha reportado que la expresión de TDO en GBM ocurre en condiciones de normoxia, inhibiendo la proliferación de linfocitos T; mientras que, en condiciones de hipoxia, la expresión de TDO disminuye, restaurando la proliferación de linfocitos T, indicando un papel inmunomodulador de TDO (Mohapatra *et al.*, 2019).

Debido a esto se ha estudiado el impacto del silenciamiento de la expresión de IDO y la inhibición farmacológica de IDO en la proliferación e invasividad de células tumorales, así como en la formación y crecimiento de tumores en diferentes modelos preclínicos de GBM (Li *et al.*, 2014; Hanihara *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2018; Ahlstedt *et al.*, 2020; Du *et al.*, 2020). Estos resultados han conducido al uso de inhibidores de IDO en pruebas clínicas en pacientes diagnosticados con GBM, sin embargo, hasta el momento no se han reportado mejorías en la supervivencia de los pacientes con cáncer tratados con inhibidores de IDO (clinicaltrials.gov, 10/08/2021). Una de las posibles explicaciones a esta falta de resultados puede ser la disponibilidad de I-Kyn en circulación dado que el 97% del triptófano que se

aprovecha a través de la VK es degradado en el hígado por TDO y sale a circulación en forma de I-Kyn (Hayaishi, 1976; Bender, 1982). A pesar de este hecho, la participación de enzimas posteriores a la formación de I-kyn y la producción de metabolitos de la VK en el ambiente tumoral ha permanecido poco estudiado. Recientemente, han empezado a reportarse las expresiones de otras enzimas de la VK en cáncer de mama, melanomas y astrocitomas, en donde resalta la asociación de KMO con el grado de malignidad y la baja sobrevida de pacientes con diferentes tipos de cáncer (Jin *et al.*, 2015; Chiu *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2020; Lai *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2021a; Liu *et al.*, 2021b); dando pie al estudio más profundo de esta vía metabólica, lo que podría ofrecer nuevos marcadores pronóstico para los pacientes con GBM y blancos terapéuticos a través de la modulación de la VK.

### Justificación.

El GBM es un tumor altamente agresivo y letal, que presenta alteraciones metabólicas e inmunológicas que permiten la heterogeneidad y el desarrollo de resistencia a tratamientos. Entre estos mecanismos, la sobreexpresión de IDO, una enzima limitante de la VK, se ha asociado con la baja sobrevida de los pacientes con GBM. Sin embargo, el uso de inhibidores de IDO no ha reportado resultados en pruebas clínicas y el resto de los componentes de la VK permanece poco explorado en GBM a pesar de conocer que los metabolitos de esta vía tienen propiedades inmunomoduladoras. Debido a esto, la evaluación del consumo de metabolitos de la VK y la expresión de enzimas de la VK como KMO, podría ofrecer mejor información del papel que juega la VK en el GBM.

## Hipótesis.

Si las células malignas de GBM presentan expresión de KMO, entonces se podrán estar produciendo moléculas que impactan en la inmunomodulación en GBM.

## Objetivos.

### Objetivo general.

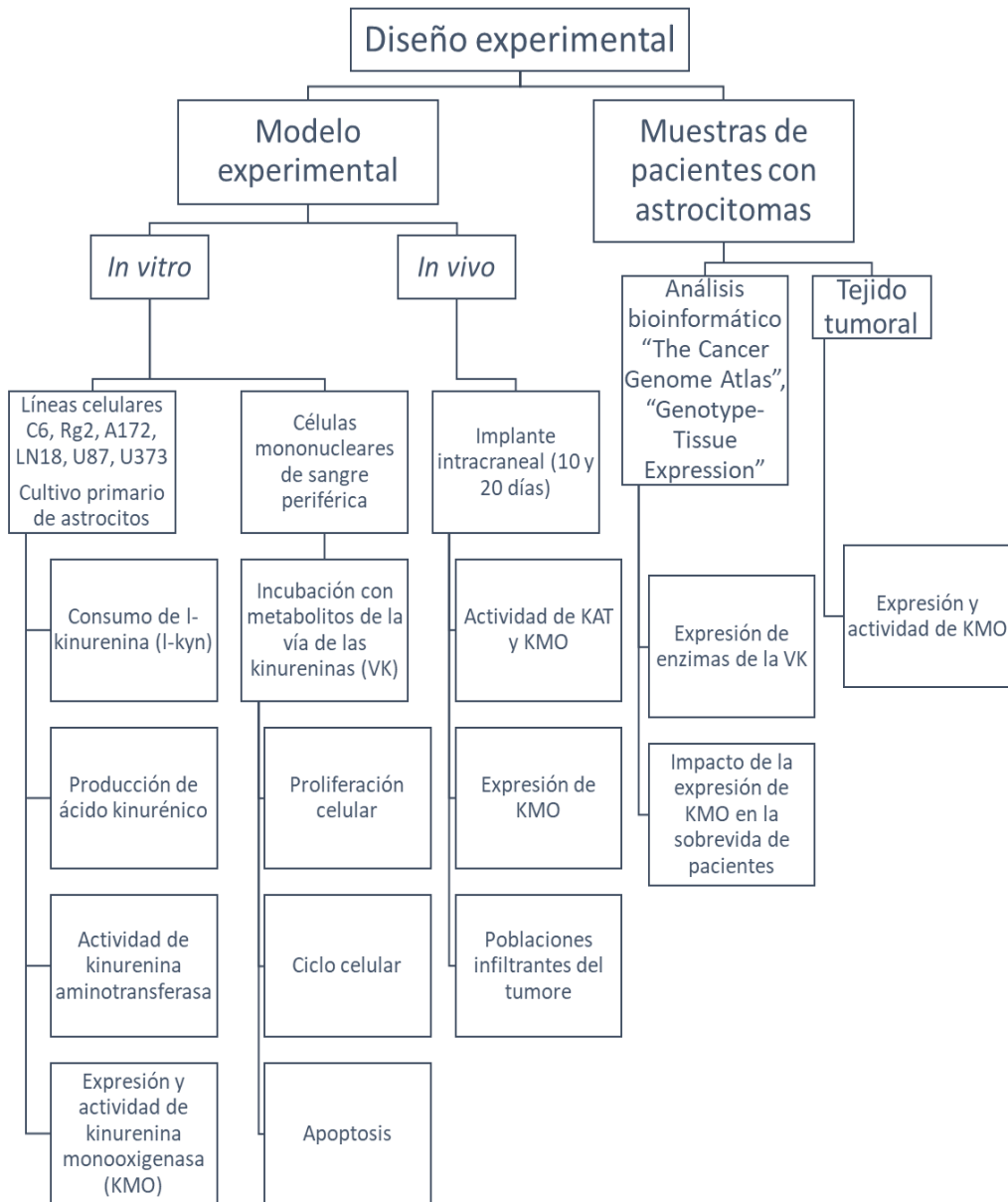
Determinar si la expresión aberrante de KMO está involucrada en la inmunomodulación a través de la generación de metabolitos inmunosupresores en GBM.

### Objetivos particulares.

- Evaluar el consumo de l-kyn *in vitro* en astrocitos, líneas celulares de glioma murino C6 y Rg2, y líneas celulares humanas de GBM A172, LN18, U87 y U373.
- Evaluar la producción de KYNA y 3-HK *in vitro* en astrocitos, líneas celulares de glioma murino C6 y Rg2, y líneas celulares humanas de GBM A172, LN18, U87 y U373.
- Determinar la actividad enzimática de KAT y KMO en astrocitos, líneas celulares de glioma murino C6 y Rg2, y líneas celulares humanas de GBM A172, LN18, U87 y U373.
- Cuantificar la expresión de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y proteína de KMO en, líneas celulares de glioma murino C6 y Rg2, y líneas celulares humanas de GBM A172, LN18, U87 y U373.

- Evaluar los niveles de KYNA y 3-HK, así como la actividad de KAT y KMO en tumores de 10 y 20 días de desarrollo en un modelo *in vivo* de implante intracraneal.
- Cuantificar las poblaciones infiltrantes de tumor, macrófagos, células NK, linfocitos totales, linfocitos T cooperadores, citotóxicos y reguladores, en tumores de 10 y 20 días de desarrollo en un modelo *in vivo* de implante intracraneal.
- Determinar el efecto de los metabolitos de la VK, I-kyn, KYNA, 3-HK, HANA y Quin, en la proliferación, ciclo celular e inducción de apoptosis en linfocitos T activados con fitohematoglutina (PHA).
- Comparar la expresión de las enzimas de la VK,IDO, TDO, KAT, KMO y quinolinato fosforribosiltransferasa (QPRT) en tejido no tumoral, astrocitomas de bajo grado de malignidad y GBM de muestras de pacientes disponibles en bases de datos bioinformáticas de “The Cancer Genome Atlas” (TCGA) y “Genotype-Tissue Expression” (GTEx).
- Cuantificar la expresión de ARNm y actividad de KMO en muestras de pacientes diagnosticados con astrocitomas de diferentes grados de malignidad disponibles en el repositorio de muestras del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNN-MVS).
- Determinar la co-localización de la expresión de KMO en células tumorales de origen astrocítico en muestras de pacientes diagnosticados con astrocitomas de diferentes grados de malignidad disponibles en el repositorio de muestras del INNN-MVS.

El diseño experimental de este proyecto se resume en la figura 2.



**Figura 2.** Diseño experimental.

## Metodología.

### Modelo *in vitro*.

#### Líneas celulares.

Se utilizaron las líneas celulares de glioma murino C6 (ATCC CCL-107) y Rg2 (ATCC CRL-2433), las líneas celulares humanas de GBM A172 (ATCC CRL-1620), LN18 (ATCC CRL-2610), U87 (ATCC HTB-14) y U373 (ATCC HTB-17), todas las líneas celulares fueron adquiridas de la compañía ATCC (Manassas, VA, EUA). Las células se cultivaron con medio “Dulbecco’s Modified Eagle Medium” (DMEM, ThermoFisher, Waltham, MA, EUA) suplementado con suero fetal bovino (SFB, ThermoFisher) al 10% y estreptomycin/ampicilina (ThermoFisher) al 1% en botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>, y se mantuvieron en una incubadora a 37 °C y una atmósfera con 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Las principales características de las líneas celulares se resumen en la tabla 1.

Cuando las células alcanzaron entre el 80% y el 90% de confluencia en la superficie de la botella de cultivo se retiró el medio de cultivo y se enjuagaron las células con amortiguador de fosfatos (PBS) 1x y se adicionó solución de tripsina/ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0.5% para despegar las células. Una vez resuspendidas las células, se sembraron en botellas de cultivo nuevas con medio de cultivo fresco o se prepararon para los ensayos de consumo de l-kyn.

#### Cultivo primario de astrocitos.

Para el cultivo de astrocitos se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar neonatas de 1 a 3 días post-nacimiento. En condiciones de esterilidad, las crías se sacrificaron por decapitación y se extrajo el cerebro. El cerebro se enjuagó con PBS 1x y se maceró con el émbolo de una jeringa de 10 mL. Posteriormente,

se adicionó medio de cultivo DMEM suplementado con SFB al 10% y estreptomicina/ampicilina al 1%. El homogenizado cerebral resuspendido en medio de cultivo se depositó en botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> y se permitió la adherencia de células en una incubadora a 37 °C con una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> durante una semana. Luego de una semana, se retiró el medio de cultivo con las células en suspensión, se enjuagó con PBS 1x y se adicionó medio de cultivo fresco. Las células adheridas después de la primera semana son astrocitos.

Cuando los astrocitos alcanzaron entre el 80% y el 90% de confluencia en la superficie de la botella de cultivo se retiró el medio de cultivo y se enjuagaron las células con PBS 1x y se adicionó solución de tripsina/EDTA al 0.5% para despegar las células. Una vez resuspendidas las células, se sembraron en botellas de cultivo nuevas con medio de cultivo fresco o se prepararon para los ensayos de consumo de I-kyn.

#### Cultivo de células mononucleares.

Las células mononucleares se obtuvieron del bazo de ratas de cepa Wistar adultas con un peso de 250 g. Los animales se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico. En condiciones de esterilidad, se extrajo el bazo y se enjuagó con PBS 1x. Se maceró el bazo con el émbolo de una jeringa de 10 mL y se adicionaron 5 mL de PBS 1x.

La suspensión de esplenocitos se adicionó suavemente a tubos de centrifuga previamente adicionados con 5 mL de Ficoll-Histopaque (ThermoFisher). De este modo se obtuvo una mezcla con dos fases de diferente densidad, la fase inferior de Ficoll-Histopaque y la fase superior con la suspensión de esplenocitos. Los tubos

se centrifugaron a 2,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 25 minutos. Posteriormente, se colectaron las células mononucleares localizadas en una fase intermedia formada tras la centrifugación. Las células mononucleares se enjuagaron con PBS 1x y se centrifugaron a 2,500 rpm durante cinco minutos. Se ajustó el número de esplenocitos a  $1 \times 10^6$  células/100  $\mu$ L. Se sembraron  $1 \times 10^5$  células mononucleares por pozo en placas de cultivo de 24 pozos con medio de cultivo DMEM suplementado con SFB al 10% y estreptomycin/ampicilina al 1%. Las células se mantuvieron a 37 °C y una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

**Tabla 1.** Principales características genéticas de las líneas celulares utilizadas.

Línea celular	Alteraciones genéticas (Schlegel et al., 1999; Patil et al., 2015; ATCC)
<b>C6</b>	<i>P53</i> silvestre Locus <i>P16/CDKN2A/INK4A</i> mutado Amplificación de retinoblastoma ( <i>RB</i> ) Amplificación del receptor del factor de crecimiento epidermal ( <i>EGFR</i> ) Isocitrato deshidrogenasa silvestre ( <i>IDH<sup>wt</sup></i> )
<b>Rg2</b>	Amplificación de <i>RAS</i> Amplificación de <i>ERBB3/HER3</i>
<b>A172</b>	<i>P53</i> mutado Deleción de fosfatidil inositol-3, 4, 5-trifosfato 3-fosfatasa ( <i>PTEN</i> ) <i>IDH</i> mutado ( <i>IDH<sup>m</sup></i> , no reportado)
<b>LN18</b>	<i>P53</i> mutado <i>PTEN</i> mutado Deleción del cromosoma p16 <i>IDH<sup>wt</sup></i>
<b>U87</b>	Neurofibromatosis-1 ( <i>NF1</i> ) mutado <i>IDH<sup>wt</sup></i>
<b>U373</b>	<i>P53</i> mutado <i>PTEN</i> mutado <i>NF1</i> mutado Amplificación de <i>EGFR</i> <i>IDH<sup>wt</sup></i>
<b>Astroцитos</b>	<i>P53</i> silvestre <i>PTEN</i> silvestre <i>NF1</i> silvestre <i>IDH<sup>wt</sup></i> Expresión de kinurenina aminotransferasa (KAT)



## Consumo y producción de metabolitos de la vía de las kinureninas.

### Consumo de I-kyn.

El consumo de I-kyn y la producción de metabolitos de la VK se realizó en las líneas celulares de glioma murino, las líneas celulares humanas de GBM y los astrocitos derivados del cultivo primario. Brevemente,  $1 \times 10^5$  células se suspendieron en PBS 1x y se adicionó I-kyn a una concentración final de 100  $\mu$ M. Las células se incubaron durante dos horas a 37 °C. Posteriormente, las células se lisaron en un ultrasonicador durante 10 segundos, se adicionaron 40  $\mu$ L de ácido perclórico al 6% y se centrifugaron las muestras a 13,500 rpm durante 20 minutos. Se colectó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C para la cuantificación de metabolitos de la VK.

### Cuantificación de I-kyn.

La determinación de los metabolitos de la VK, I-kyn, KYNA y 3-HK, se realizó por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa. Para la cuantificación de I-kyn, se inyectaron 50  $\mu$ L de muestra a un flujo constante de 1 mL/min en fase móvil (acetato de zinc 250 mM y acetato de sodio 50 mM con pH 6.2) a través de una columna de fase reversa "Eclipse XDB 18C (4.6 mm  $\times$  250 mm (5  $\mu$ m); Agilent, Santa Clara, CA, EUA)", I-kyn se detectó por fluorescencia a 368 nm de excitación/480 nm de emisión con un tiempo de retención de 10 minutos. La cantidad de I-kyn detectada se normalizó con la concentración de proteína, determinada por el método de cuantificación de proteína de Lowry. Los datos se expresaron como porcentaje de I-kyn restante en cada línea celular.

#### Cuantificación de KYNA.

Para la determinación de los niveles de KYNA, se inyectaron 50  $\mu$ L de muestra a un flujo constante de 1 mL/min en fase móvil (acetato de zinc 250 mM y acetato de sodio 50 mM con pH 6.2) a través de una columna de fase reversa “Eclipse XDB 18C”, KYNA se detectó por fluorescencia a 344 nm de excitación/398 nm de emisión con un tiempo de retención de 7.2 min. La cantidad de KYNA detectado se normalizó con la concentración de proteína. Los datos se expresaron como fmoles de KYNA por miligramo de proteína.

#### Cuantificación de 3-HK.

Para la determinación de 3-HK, 100  $\mu$ L de muestra se inyectaron a un flujo constante de 0.5 mL/min en fase móvil (ácido fosfórico 0.59%, acetonitrilo 1.5%, trietilamina 0.9%, EDTA 0.27 mM y ácido heptanosulfónico 8.9 mM) a través de una columna de fase reversa “Adsorbosphere Catecholamine C18 (4.6 mm  $\times$  100 mm (3 $\mu$ m); Thermo Fisher Scientific, Hampton, NH, EUA)”. 3-HK se detectó con un voltaje de oxidación de 0.5 V, un rango de 1 nA y un filtro de 0.1 Hz. La cantidad de 3-HK detectada se normalizó con la concentración de proteína. Los datos se expresaron como nmoles de 3-HK por miligramo de proteína.

#### Actividad de KAT.

Las células se suspendieron en amortiguador de lisis (Amortiguador Tris-base 0.5 M, pH 8, piridoxal-5-fosfato (P5P) 50  $\mu$ M, 2-mercaptoetanol 10 mM) y se lisaron en un ultrasonicador durante 10 segundos. Las muestras se incubaron con la mezcla de reacción (l-kyn 100  $\mu$ M, P5P 80  $\mu$ M, piruvato de sodio 1 mM, amortiguador Tris-base 150 mM, pH 7.4) durante dos horas a 37 °C. Posteriormente, se adicionaron 20  $\mu$ L de ácido perclórico al 50% y 1 mL de HCl 0.1 N para detener

la reacción. Se centrifugaron las muestras a 13,500 rpm durante 20 minutos y se colectó el sobrenadante para la cuantificación de KYNA. Se determinaron los niveles de KYNA por HPLC con el método descrito anteriormente y se normalizaron con la concentración de proteína. Los resultados se expresaron como fmoles de KYNA por miligramo de proteína por hora.

#### Actividad de KMO.

Las células de las diferentes líneas celulares se lisaron en un ultrasonicador durante 10 segundos. Posteriormente, se incubó con el amortiguador de reacción (NADPH 1 mM, G6P 3 mM, G6PDH 1 U/mL y l-kyn 100  $\mu$ M), durante dos horas a 37 °C. Posteriormente, se adicionó ácido perclórico al 6% para precipitar las proteínas y se centrifugaron las muestras a 13,500 rpm durante 20 min. Los sobrenadantes se colectaron para la cuantificación de 3-HK por HPLC con el método descrito anteriormente. Los niveles de 3-HK detectados se normalizaron con la concentración de proteína de cada muestra. Los resultados se expresaron como nmoles de 3-HK por miligramo de proteína por hora.

#### Expresión de ARNm de KMO.

La cuantificación de la expresión de ARNm de KMO en las líneas celulares de glioma murino, líneas celulares humanas de GBM y astrocitos primarios, se realizó por la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).

Para aislar el ARNm, se colectaron  $2 \times 10^6$  células en 400  $\mu$ L de TRIzol (Thermo Fisher Scientific) y se incubaron a 4 °C durante 30 minutos. Posteriormente se adicionaron 250  $\mu$ L de cloroformo al 100%, se agitó la mezcla en un vórtex durante 10 segundos y se incubó en hielo durante 5 minutos. Las muestras se

centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, después, se recuperó la fase acuosa formada por la centrifugación en tubos de centrifuga nuevos y se adicionaron 250 µL de isopropanol al 100% frío y se mezcló por inversión para precipitar los ácidos nucleicos. Se incubaron las muestras en hielo durante 5 minutos. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Se adicionaron 500 µL de etanol al 80%, se centrifugaron las muestras a 10,000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante; este paso se realizó dos veces. Finalmente, se secó el botón con ARNm a temperatura ambiente y se disolvió en 35 µL de agua estéril, libre de ácido desoxirribonucleotidasa (ADNasa) y ácido ribonucleotidasa (ARNasa).

Para la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) complementario (ADNc), se utilizó el kit "First Strand cDNA synthesis kit" (OriGene, NP100042, Rockville, MD, EUA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, el ADNc se almacenó a -20 °C hasta su uso en la RT-qPCR. Se utilizó el kit "SensiFAST SYBR Master Mix - Lo-ROX" (OriGene, QP100016S) para la determinación de la expresión de *KMO* por RT-qPCR de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El par de cebadores para qPCR de *KMO* humana (OriGene, HP207154), mientras que el par de cebadores para qPCR de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa humana (*GAPDH*) (OriGene, HP205798) se utilizó como gen de control de carga. Se utilizó ADN extraído de células mononucleares de sangre periférica como estándar para la cuantificación del número de copias de ARNm de *KMO*. Las secuencias pares de cebadores utilizados se encuentran en la tabla 2. Los resultados se expresaron como número de copias de ARNm de *KMO*.

**Tabla 2.** Secuencias delantera y reversa de los cebadores de kinurenila monooxigenasa (KMO) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) utilizados para la RT-qPCR.

Par de cebadores	Secuencia
<i>KMO</i> Humano	Delantera: CGGATGCCATCCCTCTAATTGG Reversa: TGCATCTCCCAGCAGTACACAG
<i>GAPDH</i> Humano	Delantera: GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG Reversa: ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

Expresión de proteína de KMO.

La determinación de la expresión de proteína de KMO en las líneas celulares de glioma murino C6 y Rg2, líneas celulares humanas de GBM A172, LN18, U87 y U373, y en astrocitos se realizó mediante citometría de flujo y por inmunofluorescencia.

Para la determinación por citometría de flujo,  $1 \times 10^5$  células suspendidas en PBS 1x se centrifugaron a 2,000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se adicionaron 200  $\mu$ L de amortiguador de permeabilización 1x (ThermoFisher) y se incubaron las muestras durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron con PBS 1x y se centrifugaron a 2,000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Las muestras se incubaron con 10  $\mu$ L de anticuerpo de conejo anti-KMO 1:100 (Avivas, OAAB05255; San Diego, CA, EUA) durante 30 minutos en hielo, posteriormente se lavaron las muestras con PBS y se centrifugaron a 2,000 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante. Después, las muestras se incubaron durante 30 minutos con 10  $\mu$ L de anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con el fluoróforo Alexa 488 1:200 (Invitrogen, A11008; Waltham, MA, EUA). Finalizada la incubación, se lavaron las muestras con

PBS 1x y se centrifugaron a 2,000 rpm durante 5 minutos. Las muestras se suspendieron en 400  $\mu$ L de PBS 1x y se determinó la intensidad media de fluorescencia (MFI) por célula en un citómetro de flujo FACSCalibur (Beckton Dickinson and Company, San José, CA, EUA) en el canal FL1, se adquirieron 10,000 eventos totales. Los niveles de expresión de proteína de KMO se representaron como unidades arbitrarias de MFI.

Para la inmunofluorescencia, las líneas celulares se sembraron en portaobjetos de vidrio divididos en ocho pozos para cultivo celular ( $3 \times 10^4$  células/pozo), cuando las células alcanzaron el 90% de confluencia se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS 1x. Las células se fijaron y permeabilizaron al incubarlas con metanol al 100% frío durante 5 minutos. Posteriormente, se retiró el metanol y se adicionaron 200  $\mu$ L de albúmina sérica bovina (ABS) al 1% y se incubó durante 30 minutos. Después, se incubaron las células con 20  $\mu$ L del anticuerpo primario de conejo anti-KMO 1:200 y con el anticuerpo primario de ratón anti-proteína glial ácida fibrilar (GFAP) conjugado con ficoeritrina (PE) 1:200 (SantaCruz, SC-33673 PE; Santa Cruz, CA, EUA), durante 30 minutos; se lavaron las células con ABS al 1% durante cinco minutos, tres veces. Posteriormente, se incubaron las células con anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa 488 1:200. Se lavaron las células con ABS al 1% durante cinco minutos, tres veces. Se adicionaron 2  $\mu$ L de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Vector, H-1500; Burlingame, CA, EUA) y se selló el portaobjetos con un cubreobjetos. Se adquirieron fotografías de las células, con filtros rojo, verde y azul para fluorescencia, en un microscopio Olympus 1x81 con un aumento de 40x. Las

imágenes obtenidas con los tres filtros de fluorescencia de un mismo campo se sobrepusieron con el programa Image J.

#### Efecto de los metabolitos de la VK en linfocitos activados.

##### Proliferación de linfocitos.

Para la determinación de linfocitos, se utilizó el método de carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE; ThermoFisher). Este marcador fluorescente, se une a la membrana celular, la intensidad de fluorescencia de CFSE por cada célula disminuye de manera proporcional al número de divisiones mitóticas que ocurren.

Los esplenocitos obtenidos por centrifugación diferencial se incubaron con CFSE 10  $\mu\text{M}$  durante 30 minutos. Posteriormente se lavaron las células con PBS 1x y se centrifugó a 2,000 rpm durante 5 minutos. Se ajustó el número de esplenocitos a  $1 \times 10^5$  células en 200  $\mu\text{L}$  de medio DMEM y se sembraron en placas de 24 pozos. Se adicionó PHA (ThermoFisher) a una concentración final de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para inducir la proliferación de linfocitos T. Posteriormente, se adicionaron por separado los metabolitos de la VK I-kyn, KYNA, 3-HK, 3-HANA y Quin en concentraciones desde 0.2  $\mu\text{M}$  hasta 1,000  $\mu\text{M}$ . Los linfocitos activados en presencia de los metabolitos de la VK se incubaron, en obscuridad, durante siete días a 37 °C en una atmósfera con 5% de  $\text{CO}_2$ .

Posterior a la incubación, se determinó la MFI de las células marcadas con CFSE en un citómetro de flujo FACSCalibur en el canal FL1, se adquirieron 10,000 eventos. Los resultados se expresaron como porcentaje de proliferación con respecto al control de linfocitos activados en ausencia de los metabolitos de la VK.

Ciclo celular.

La determinación de ciclo celular se realizó por el método de tinción con yoduro de propidio. Este marcador fluorescente se une a las moléculas de ácidos nucleicos (ADN y ARN). La intensidad de fluorescencia de yoduro de propidio por célula es directamente proporcional a la cantidad de ADN que cada célula contiene, siendo un indicador de la fase del ciclo celular en la que se encuentra.

Los esplenocitos obtenidos por centrifugación diferencial se ajustaron a  $1 \times 10^5$  células en 200  $\mu$ L de medio DMEM y se sembraron en placas de 24 pozos. Se adicionó PHA a una concentración final de 5  $\mu$ g/mL. Posteriormente, se adicionaron por separado los metabolitos de la VK I-kyn, KYNA, 3-HK, 3-HANA y Quin en concentraciones desde 0.2  $\mu$ M hasta 1,000  $\mu$ M. Los linfocitos activados en presencia de los metabolitos de la VK se incubaron, durante siete días a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

Posterior a la incubación, los esplenocitos se colectaron en tubos de centrífuga y se centrifugaron a 2,000 rpm durante 5 minutos. Las células se permeabilizaron con amortiguador de citratos (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 M, ácido cítrico 0.1 M, pH 7.8) durante 5 minutos. Se volvieron a centrifugar las muestras a 2,000 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el botón celular se suspendió en 500  $\mu$ L de PBS 1x. Se adicionó yoduro de propidio (ThermoFisher) a una concentración final de 20  $\mu$ g/mL y 5 UK/mL de ARNasa, las muestras se incubaron durante 30 minutos en oscuridad. La MFI del yoduro de propidio en las células se determinó en un citómetro de flujo FACSCalibur en el canal FL3, se adquirieron 10,000 eventos. Se analizaron los histogramas de fluorescencia para determinar las



poblaciones en fase S, G1, G2 y sub-G0. Los resultados se expresaron como porcentaje de células en fase S, G1, G2 y sub-G0, respectivamente.

#### Muerte celular.

La determinación de la muerte celular se realizó por el método de tinción con anexina-V y yoduro de propidio. La anexina-V se une a los residuos de fosfatidilserina que se encuentran en la superficie externa de la membrana celular de células que se encuentran en proceso de apoptosis, mientras que el yoduro de propidio, se une a ácidos nucleicos de células cuya membrana celular y envoltura nuclear se encuentra altamente permeabilizada. La combinación de ambos marcadores permite diferenciar células viables (sin marca), células en apoptosis temprana (marca positiva para anexina-V), células en apoptosis tardía (marca positiva para anexina-V y yoduro de propidio) y células necróticas (marca positiva para yoduro de propidio).

Los esplenocitos obtenidos por centrifugación diferencial se ajustaron a  $1 \times 10^5$  células en 200  $\mu$ L de medio DMEM y se sembraron en placas de 24 pozos. Se adicionó PHA a una concentración final de 5  $\mu$ g/mL. Posteriormente, se adicionaron por separado los metabolitos de la VK I-kyn, KYNA, 3-HK, 3-HANA y Quin en concentraciones desde 0.2  $\mu$ M hasta 1,000  $\mu$ M. Los linfocitos activados en presencia de los metabolitos de la VK se incubaron, durante siete días a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

Finalizado el tiempo de incubación, los esplenocitos se colectaron en tubos de centrifuga y se centrifugaron a 2,000 rpm durante 5 minutos. Las células se suspendieron en 200  $\mu$ L de PBS 1x y se adicionó anexina-V acoplada a

isotiocianato de fluoresceína (FITC; ThermoFisher) y yoduro de propidio (ThermoFisher), ambos a una concentración final de 5 µg/mL. Se incubaron las células durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, en un citómetro de flujo FACSCalibur se cuantificó la MFI de FITC en el canal FL1 y la MFI de yoduro de propidio en el canal FL3, se adquirieron 10,000 eventos. Se clasificaron las poblaciones celulares en “células viables”, “apoptosis temprana”, “apoptosis tardía” y “necrosis”. Los resultados se expresaron como porcentaje de células en cada una de las poblaciones determinadas.

#### Modelo *in vivo*.

Desarrollo de tumores intracraneales.

Para el modelo *in vivo* de desarrollo de tumores se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar con un peso de entre 200 g y 250 g. Para el implante, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico 30 mg/kg y se colocaron en un soporte estereotáxico; se realizó una incisión sobre la piel para descubrir la superficie del cráneo y se ubicó la unión de las suturas craneales “Bregma”. Se realizó un trépano a una distancia de 3 mm de distancia en el eje anterior y 3 mm de distancia del eje lateral derecho con respecto a “Bregma”. Se implantaron  $1 \times 10^5$  células de la línea C6 suspendidas en 2 µL de medio de cultivo a una profundidad de 3 mm con respecto a la superficie craneal. El trépano se selló con cera para hueso, se desinfectó el área con solución de yodo-lugol y se suturó la incisión cutánea.

Los animales implantados se separaron en dos grupos, 10 y 20 días, de acuerdo con el tiempo post-cirugía durante el que se permitió el desarrollo tumoral.

Posterior al periodo de tiempo designado, los animales se sacrificaron por decapitación, se colectaron muestras de sangre, bazo y tumor.

Las muestras de tumores se cortaron en piezas pequeñas con una navaja de bisturí y se incubaron con colagenasa durante 5 minutos, posteriormente, las muestras se filtraron a través de un filtro de 0.75  $\mu\text{m}$  y se llevaron a un volumen final de 5 mL con PBS 1x; 1 mL de las muestras de tumores se colectaron y almacenaron para la determinación de metabolitos de la VK. El bazo se enjuagó con PBS 1x, se maceró con el émbolo de una jeringa, se adicionaron 5 mL de PBS 1x. La suspensión de células tumorales y de bazo, y la sangre se añadieron a tubos de centrifuga previamente llenados con Ficoll-Histopaque. Las muestras se centrifugaron a 2,000 rpm durante 25 minutos, se colectó la fase intermedia rica en leucocitos formada por la diferencia de densidades; las muestras de leucocitos se utilizaron para la determinación de poblaciones del sistema inmune y, en el caso de los leucocitos derivados del tumor, para la determinación de los metabolitos de la VK.

#### Evaluación de la VK en tumores.

Las muestras de tumores y de leucocitos derivados de tumores se utilizaron para la cuantificación de I-kyn, KYNA y 3-HK, así como para la determinación de la actividad de KAT y KMO de acuerdo con los métodos previamente descritos.

#### Determinación de poblaciones del sistema inmune.

Se determinaron las poblaciones de leucocitos totales, linfocitos T cooperadores, linfocitos T citotóxicos, macrófagos, células NK y Tregs en las muestras de sangre, bazo y tumor.

Las fracciones de leucocitos de sangre, bazo y tumor, obtenidas tras la centrifugación con Ficoll-Histopaque se llevaron a un volumen final de 200  $\mu$ L con PBS 1x. Las muestras se separaron en seis partes de 30  $\mu$ L en tubos de citómetro, se adicionaron 10  $\mu$ L de anticuerpo primario 1:100: anti-CD45 conjugado con PE (Biolegend, 202207; San Diego, CA, EUA) para leucocitos totales, anti-CD3 conjugado con PE (BD Pharmingen, 557030; EUA) y anti-CD4 conjugado con FITC (BD Pharmingen, 554838) para linfocitos T cooperadores, anti-CD3 conjugado con PE y anti-CD8 conjugado con FITC (BD Pharmingen, 554857) para linfocitos T citotóxicos, anti-NKR conjugado con FITC (BD Pharmingen, 226444D) para células NK y anti-CD11b/c conjugado con PE (Biolegend, 201812) para macrófagos. Para la determinación de Tregs, las células se incubaron con amortiguador de permeabilización 1x durante 30 minutos; posteriormente, las células se lavaron con PBS 1x, se centrifugaron a 2,000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 10  $\mu$ L de PBS 1x, se adicionaron los anticuerpos primarios 1:100: anti-CD4 conjugado con FITC (Santa Cruz, sc-70664; Santa Cruz, CA, EUA), anti-CD25 conjugado con PE (BD Pharmingen, 554866) y anti-FOXP3 conjugado con APC (eBioscience, 557030; EUA).

Las muestras se incubaron con los anticuerpos respectivos durante 30 minutos en hielo y oscuridad. Posteriormente, se lavaron las células con PBS 1x, se centrifugaron a 2,000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Las células se suspendieron en 400  $\mu$ L de PBS 1x y se adquirieron 10,000 eventos en un citómetro de flujo FACSCalibur. Se analizó el marcaje positivo para cada combinación de anticuerpos tomando como referencia muestras de leucocitos que

no se incubaron con anticuerpos. Los resultados se expresaron como porcentaje de leucocitos, linfocitos T cooperadores, linfocitos T citotóxicos, células NK, macrófagos y Tregs.

#### Estudio en muestras derivadas de pacientes.

##### Análisis bioinformático.

Se analizó la expresión de ARNm de las enzimas de la VK: IDO, TDO, KAT, KMO y QPRT utilizando una cohorte combinada de las bases de datos disponibles de CTGA y GTEx disponibles en la plataforma Xena, utilizando el programa GEPIA2. Se incluyeron 207 datos de corteza cerebral, 523 de gliomas de bajo grado de malignidad y 171 de GBM. Los resultados se expresaron como transcritos por millón de ARNm en cada grupo analizado.

Además, en el grupo de GBM se analizó el posible impacto de los niveles de expresión de KMO en la sobrevida de los pacientes. Los datos de los pacientes de GBM se separaron en “KMO baja expresión” y “KMO alta expresión” de acuerdo con el nivel de expresión de ARNm de KMO con respecto a la media poblacional de GBM. Se comparó la sobrevida de los pacientes separados en estos grupos en una curva de Kaplan-Meier. Los resultados se expresaron como la probabilidad de sobrevivencia con respecto a los días de seguimiento.

##### Muestras de pacientes.

Se utilizaron muestras obtenidas del repositorio del INNN-MVS de pacientes diagnosticados con astrocitomas de diferentes grados de malignidad entre los años 2013 y 2014, como criterios de inclusión se consideró que las muestras fueran de la primera cirugía extractiva del paciente y que los pacientes no hubieran recibido

tratamiento previo. El tejido se obtiene a partir de biopsias o cirugías extensivas de pacientes atendidos en el INNN-MVS y forman parte del repositorio de muestras del INNN-MVS. Se tomaron en cuenta muestras de pacientes almacenadas a -70 °C disponibles para la extracción de mRNA y actividad enzimática y que, además, contaran con una muestra de el mismo paciente en el departamento de Neuropatología para realizar cortes histológicos. En las muestras conservadas a -70 °C se extrajo mRNA para la cuantificación de la expresión de KMO por RT-qPCR y, por otra parte, se evaluó la actividad de KMO por HPLC de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. Los resultados se expresaron como expresión de ARNm de KMO y pmoles de 3-HK por mg de proteína por hora, en muestras control y glioma.

En los cortes histológicos se realizaron inmunotinciones para el marcaje de KMO en células tumorales de linaje astrocítico, con marca positiva para GFAP, los núcleos celulares se contratiñeron con DAPI, mediante los métodos descritos anteriormente. Finalmente, se obtuvieron microfotografías de estas tinciones con un microscopio OLYMPUS 1x81.

#### Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar de las muestras, se compararon los grupos de astrocitomas y líneas celulares con los grupos control usando el software GraphPad Prism. Se realizaron pruebas de T de Student para comparar las medias entre dos grupos; ANOVA de una vía para comparar las medias de tres o más grupos, seguida de prueba de Bonferroni para comparar las diferencias con respecto al grupo control; para muestras no

paramétricas se utilizó la prueba de Mann-Whitney para comparar dos grupos y la prueba de Kruskal-Wallis seguida de prueba de Dunn para la comparación de tres o más grupos. Los datos con un valor de  $p < 0.05$  se consideraron significativamente diferentes.

## Resultados.

### Consumo de I-kyn en líneas celulares de glioma murino y líneas celulares humanas de GBM.

Dado que no se ha estudiado por completo la vía de las kinureninas en células de glioma y debido a que I-kyn es el metabolito de la VK que cruza barrera hematoencefálica en mayor porcentaje, se decidió empezar evaluando su catabolismo en las diversas líneas de celulares de GBM. Se analizó el consumo de I-kyn en las líneas celulares de glioma murino C6 y Rg2, las líneas celulares humanas de GBM A172, LN18, U87 y U373, y se comparó con astrocitos derivados de cultivo primario. Las células fueron incubadas con I-kyn durante dos horas y posteriormente se cuantificó el porcentaje restante de I-kyn. Todas las líneas celulares tumorales consumieron más I-kyn que los astrocitos no malignos de manera significativamente diferente ( $p < 0.01$ ), aunque los niveles restantes de I-kyn entre las líneas de células tumorales variaron entre sí sugiriendo un metabolismo diferencial entre ellas (Figura 3A). De manera simultánea se midieron los niveles de KYNA producidos en estos ensayos debido a que se ha reportado que en astrocitos se encuentra expresada y activa la enzima KAT, la cual produce KYNA. Debido a que se observó que los niveles de I-kyn disminuyeron y este es substrato de KAT, lo que esperábamos es que incrementaran de manera considerable los niveles de KYNA; sin embargo, en todas las líneas celulares de glioma se observó una

disminución en los niveles de KYNA producidos comparados con el cultivo primario de astrocitos considerado como control (Figura 3B), a pesar de que el consumo de l-kyn fue mayor en células tumorales. Al evaluar la actividad de KAT en estas mismas líneas celulares se encontró que la actividad de esta enzima fue mayor en las células tumorales C6, LN18 y U373 con respecto a los astrocitos. El resto de las líneas celulares no mostró cambios en la actividad con respecto a los astrocitos (Figura 3C). De esta forma, se demostró que las células tumorales de GBM consumen l-kyn, sin embargo, no producen KYNA en la misma magnitud en que lo hace un astrocito no maligno, a pesar de tener la KAT funcional. Esto enfocó el trabajo hacia el “brazo largo” de la VK iniciado por la enzima KMO, la cual en condiciones fisiológicas no se expresa en astrocitos.

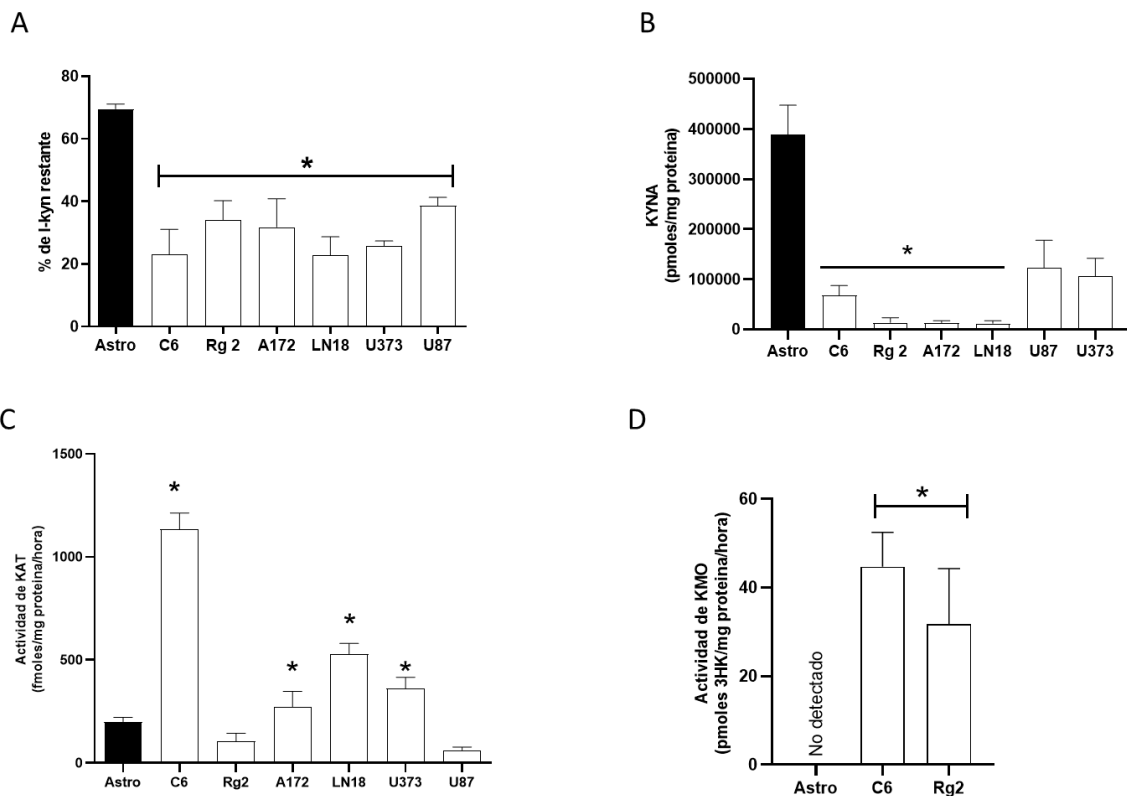




Figura 3. Catabolismo de l-kinurenina (l-kyn) en líneas celulares de glioma murino y líneas humanas de glioblastoma (GBM). **(A)** Porcentaje de los niveles de l-kyn restante después de la incubación de las líneas celulares de glioma murino (C6 y Rg2), las líneas humanas de GBM (A172, LN18, U373 y U87) y cultivos primarios de astrocitos (Astro), con l-kyn 100  $\mu$ M durante dos horas. **(B)** Niveles de ácido kinurénico (KYNA) producidos tras la incubación con l-kyn. **(C)** Actividad de la kinurenina aminotransferasa (KAT) en las líneas celulares y astrocitos primarios. **(D)** Actividad de kinurenina monooxigenasa (KMO) en líneas celulares de glioma murino C6 y Rg2 comparada con cultivos primarios de astrocitos. Media  $\pm$  error estándar. ANOVA de una vía seguido de prueba de Bonferroni; \* $p < 0.05$  con respecto a Astro. n=5

Al evaluar la actividad de KMO en las líneas de glioma murino C6 y Rg2 se demostró que estas líneas celulares presentaban actividad de esta enzima, contrario a los astrocitos primarios en los que no se detectó actividad de KMO (Figura 3D). Debido a esto se decidió evaluar la actividad de KMO durante el desarrollo de tumores intracraneales en un modelo *in vivo*.

#### Evaluación de KMO en el desarrollo de tumores *in vivo* e influencia en el infiltrado celular.

En los tumores derivados del implante intracraneal de células C6 la actividad de KAT no varió a lo largo del desarrollo de los tumores, además esta actividad fue menor que la presentada en homogenados de corteza cerebral de rata, utilizados como grupo control (Figura 4A). Por otra parte, se demostró una mayor actividad de KMO en las muestras de 10 y 20 días de desarrollo post-cirugía, con respecto a los homogenados de corteza cerebral de rata utilizados como grupo control. De manera interesante, la actividad de KMO se redujo a lo largo del tiempo de desarrollo tumoral (Figura 4B). De manera simultánea analizamos en las muestras de tumores intracraneales las poblaciones del sistema inmune infiltrantes del tumor.

**A**

**B**

Figura 4. La vía de las kinureninas durante el desarrollo tumoral. **(A)** Actividad de kinurenina aminotransferasa (KAT) en tumores intracraneales de 10 y 20 días de desarrollo comparada con corteza cerebral de rata "C". **(B)** Actividad de kinurenina monooxigenasa (KMO) en tumores intracraneales de 10 y 20 días de desarrollo comparada con corteza cerebral de rata "C". Media±error estándar. ANOVA de una vía seguida de prueba de Bonferroni. <sup>a</sup>p<0.05 con respecto a C, <sup>b</sup>p<0.05 con respecto a 20 d. n=7.

Se evaluó la presencia de poblaciones de leucocitos totales (CD45+), células NK (NKR+), monocitos (CD11b+), linfocitos T CD8+, linfocitos T CD4+, y linfocitos Tregs (CD4+/CD25+/FoxP3+) en la masa tumoral. Todas las poblaciones analizadas incrementaron su porcentaje dentro del tejido tumoral de 10 a 20 días de desarrollo, con excepción de los linfocitos Tregs (Figura 5). Estos resultados indican que la disminución en la expresión y actividad de KMO observada en los tumores intracraneales no se debe a una reducción en la infiltración de células del sistema inmune en el tejido tumoral. Posiblemente, los cambios observados en la expresión y actividad de KMO a lo largo del tiempo se deben a mecanismos inmunomoduladores ejercidos por las células tumorales.

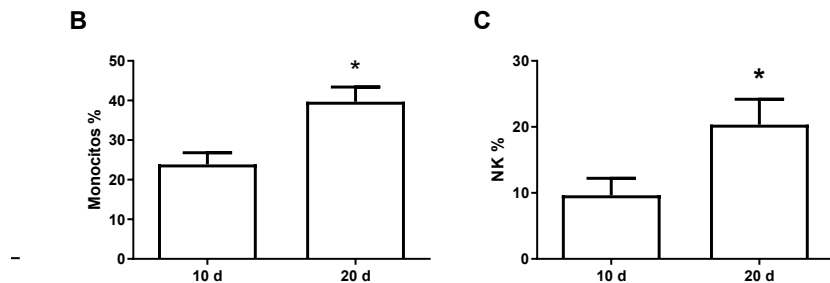


Figura 5. Poblaciones del sistema inmune infiltradas en tumores intracraneales. Porcentaje de **(A)** leucocitos totales (CD45+), **(B)** monocitos (CD11b+), **(C)** células asesinas naturales (NK, NKR+), **(D)** linfocitos citotóxicos (CD8+), **(E)** linfocitos T cooperadores (CD4+), **(F)** linfocitos Treguladores (Tregs, CD4+/CD25+/FoxP3+). Media±error estándar. Prueba de T de Student. \* $p < 0.05$  con respecto a 10 d.  $n=7$ .

#### Impacto de los catabolitos del triptófano en linfocitos T activados.

Debido a que no está del todo claro el efecto de los metabolitos de la VK en los linfocitos, se evaluó el efecto individual de los catabolitos del triptófano, I-kyn, KYNA, 3-HK, 3-HANA y Quin, en la capacidad de proliferación, arresto del ciclo celular e inducción de muerte celular en linfocitos T activados con PHA. Se encontró que todos los metabolitos redujeron entre 33% y 85% el porcentaje de proliferación de linfocitos activados a partir de una concentración de 50  $\mu\text{M}$ , siendo I-kyn, KYNA y 3-HANA los metabolitos que indujeron la mayor reducción de la proliferación



Debido a que la reducción en el porcentaje de proliferación inducida por los catabolitos del triptófano se podría deber al arresto del ciclo celular o a la inducción de muerte celular, decidimos evaluar ambos parámetros en los linfocitos activados con PHA en presencia de los catabolitos estudiados. De esto modo, se observó que con los linfocitos activados con PHA, 39.51% de las células se encontraron en fase  $G_0/G_1$ , 36.18% de células se encontraron en fase S y 17.04% de células se encontraron en fase  $G_2/M$ ; además, 5.36% de los linfocitos activados se encontraron en fase sub- $G_0$ , indicando cierto porcentaje de muerte celular en condiciones basales. Por el contrario, linfocitos que no se activaron con PHA presentaron 82.13% de células en fase  $G_0/G_1$ , 9.83% de células en fase S y 3.08% de células en fase  $G_2/M$ , así como 2.74% de células en fase sub- $G_0$ . Estas cifras indican que los linfocitos no activados con PHA permanecen con un arresto del ciclo celular en fase  $G_0/G_1$ , mientras que los linfocitos activados con PHA presentan poblaciones en todas las fases del ciclo celular (Figura 7). La incubación con los catabolitos del triptófano usados [50-500  $\mu\text{M}$ ] redujo de manera significativa el porcentaje de linfocitos activados con PHA en las fases S y  $G_2/M$  (Figura 7), mientras que no se encontraron cambios significativos en el porcentaje de linfocitos en fase  $G_0/G_1$  (Figura 7). Por otro lado, en los linfocitos incubados con los metabolitos de la vía de las kinureninas aumentó de manera significativa la población en fase sub- $G_0$ , indicando un aumento en la muerte celular de los linfocitos en presencia de los catabolitos del triptófano (Figura 7).

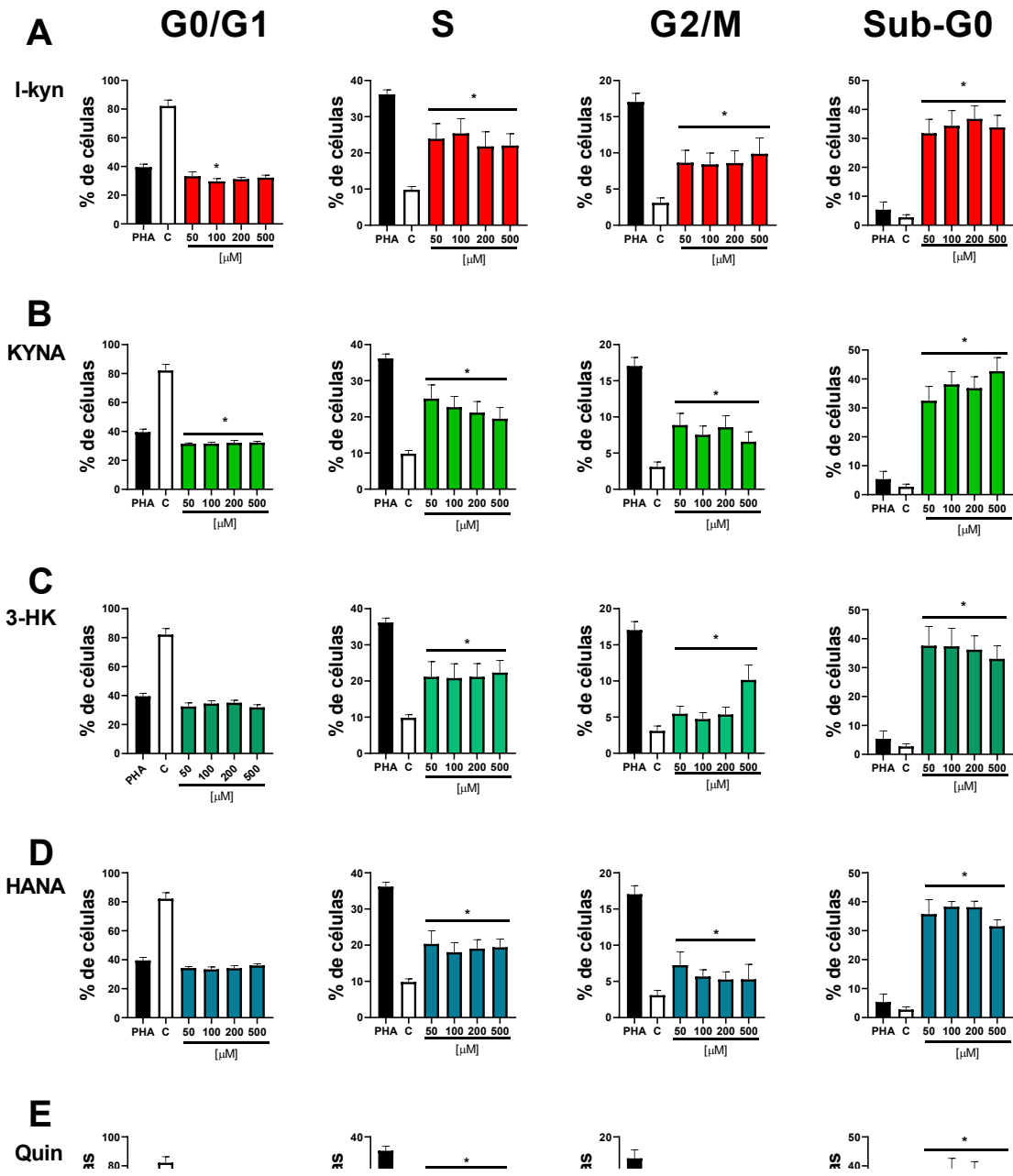


Figura 7. Ciclo celular de linfocitos activados, incubados con los catabolitos del triptófano. Porcentaje de linfocitos en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, fase S y fase G<sub>2</sub>/M activados con PHA e incubados con I-kinurenina (I-kyn, **A**), ácido kinurénico (KYNA, **B**), 3-hidroxicinurenina (3-HK, **C**), ácido 3-hidroxicinurénico (3-HANA, **D**) y

ácido quinolínico (Quin, **E**), [50-1,000  $\mu$ M]. Media $\pm$ error estándar. ANOVA de una vía, seguida de prueba de Bonferroni. \* $p < 0.05$  con respecto a linfocitos activados con PHA.  $n=5$ .

Por otro lado, los metabolitos de la VK utilizados en concentraciones desde 50 hasta 500  $\mu$ M redujeron el porcentaje de linfocitos viables, aumentando el porcentaje de linfocitos en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis (Figura 8).

I-kyn, 3-HK y 3-HANA presentaron los menores porcentajes de células viables. La muerte celular observada en este ensayo corresponde con las poblaciones de linfocitos en fase sub- $G_0$  observadas en el ensayo de ciclo celular.

De este modo, definimos que el catabolismo del triptófano a través de la VK se encuentra activo en las diferentes líneas celulares de glioma murino y líneas celulares humanas de GBM, aunque en patrones heterogéneos. Además, demostramos, *in vitro*, la actividad de KMO en líneas celulares de glioma murino, la cual varía a lo largo del desarrollo de tumores intracraneales *in vivo*. La disminución de KMO a lo largo del desarrollo tumoral se observó de manera inversa al aumento de poblaciones del sistema inmune infiltrantes del tumor, lo cual podría deberse a la interacción entre células tumorales y el sistema inmune. Finalmente demostramos que los metabolitos de la VK impactan en la proliferación, ciclo celular e inducción de apoptosis de linfocitos T activados, confirmando la importancia de la VK en la modulación de la respuesta inmune.

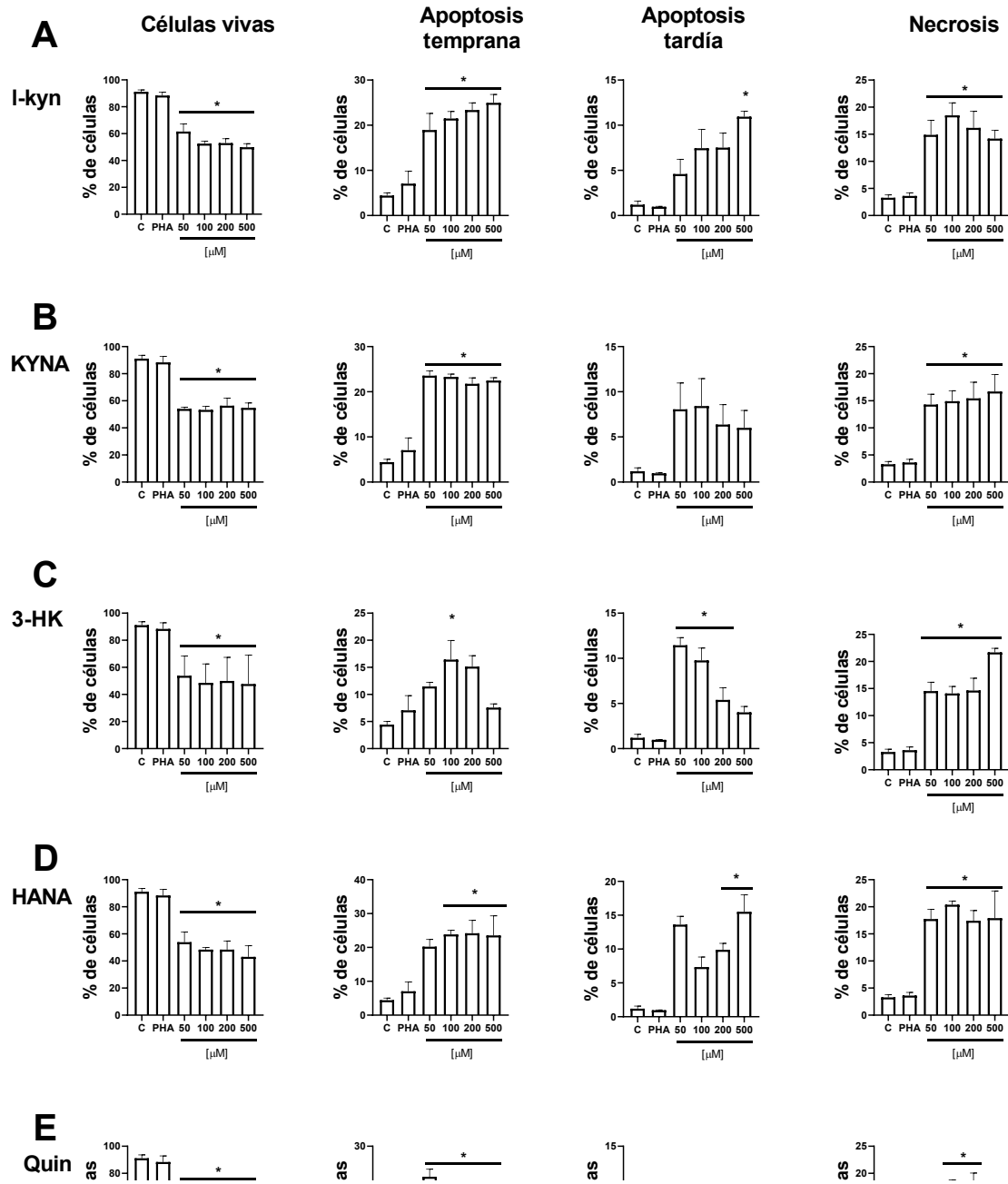


Figura 8. Muerte celular en linfocitos activados incubados con los catabolitos del triptófano. Porcentajes de linfocitos T vivos, en apoptosis temprana, apoptosis tardía y apoptosis total previamente activados con PHA e incubados con I-kinurenina (I-kyn, **A**), ácido kinurénico (KYNA, **B**), 3-



hidroxikinurenina (3-HK, **C**), ácido 3-hidroxiantranílico (3-HANA, **D**) y ácido quinolínico (Quin, **E**), [50-1,000  $\mu$ M]. Media $\pm$ error estándar. ANOVA de una vía, seguida de prueba de Bonferroni. \* $p < 0.05$  con respecto a C. n=5.

Debido a que se encontró la actividad de KMO en líneas celulares de glioma murino, se decidió investigar la expresión y actividad de esta enzima en las líneas celulares humanas de GBM en las que se había evaluado el consumo de l-kyn (A172, LN18, U87 y U373). Además, para resaltar la importancia de KMO y la VK en GBM, analizamos la expresión de las enzimas de la VK en modelos bioinformáticos así como la expresión y actividad de KMO en muestras de pacientes diagnosticados con astrocitomas de diferentes grados de malignidad.

#### Expresión y actividad de KMO en líneas celulares humanas de GBM.

Una vez que se demostró la actividad de KMO en las líneas de glioma murino, se evaluó la expresión de la enzima KMO en las líneas humanas de GMB (Figura 9). Se encontró que en las líneas celulares humanas de GBM hay expresión de ARNm y proteína, así como actividad de KMO, aunque en un patrón heterogéneo entre las diferentes líneas celulares.

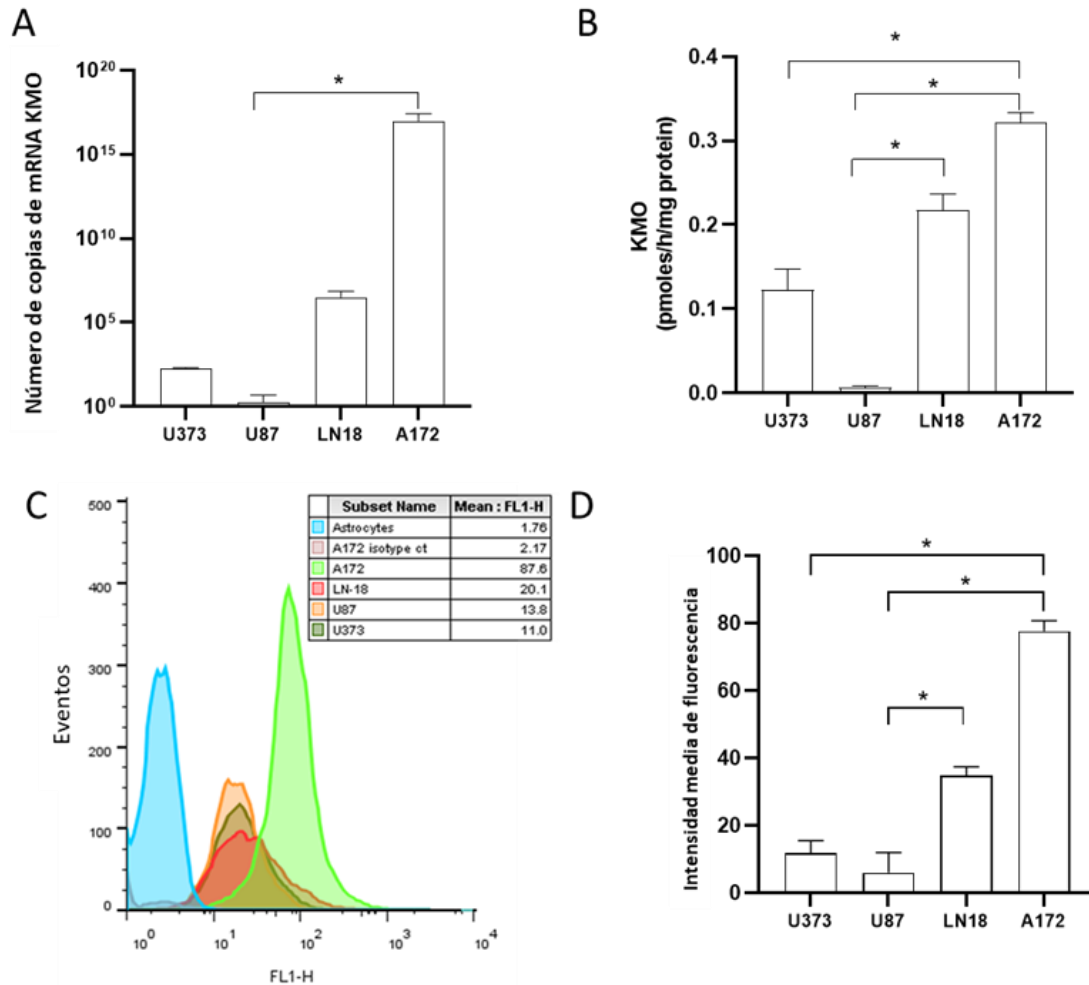


Figura 9. Expresión de kinurenina monooxigenasa (KMO) en líneas celulares humanas de glioblastoma (GBM). **(A)** Niveles de ARNm de KMO en las líneas celulares humanas de GBM A172, LN18, U87 y U373 por RT-qPCR. **(B)** Niveles de actividad de KMO en astrocitos y líneas celulares humanas de GBM A172, LN18, U87 y U373. **(C-D)** Niveles de expresión de proteína de KMO determinados la intensidad media de fluorescencia cuantificada por citometría de flujo. Media±error estándar. \* $p < 0.05$  basados en la prueba Kruskal Wallis con una prueba de Dunn para comparaciones por pares.

La línea A172 presentó los mayores niveles de expresión y actividad de KMO, seguida por las líneas LN18, U373 y U87 (Figuras 9 y 10). Es de resaltar la notable relación inversa encontrada entre la producción de KYNA y los niveles de expresión y actividad de KMO encontrados en las líneas celulares, en donde aquellas células

que presentaron una mayor producción de KYNA tuvieron menor expresión y actividad de KMO (U373 y U87), mientras que las células que produjeron menores niveles de KYNA, presentaron altos niveles de expresión y actividad de KMO (A172 y LN18; Figuras 3 y 9). Estos resultados demuestran por primera vez la expresión y actividad de KMO en células tumorales que se derivaron de un astrocito normal, el cual de manera basal no expresa esta enzima. La expresión de KMO en las células malignas de GBM puede estar contribuyendo tanto a la producción de metabolitos inmunosupresores como 3-HK, 3-HANA y Quin, así como al mantenimiento de la actividad metabólica tumoral al permitir la síntesis de  $\text{NAD}^+$ .

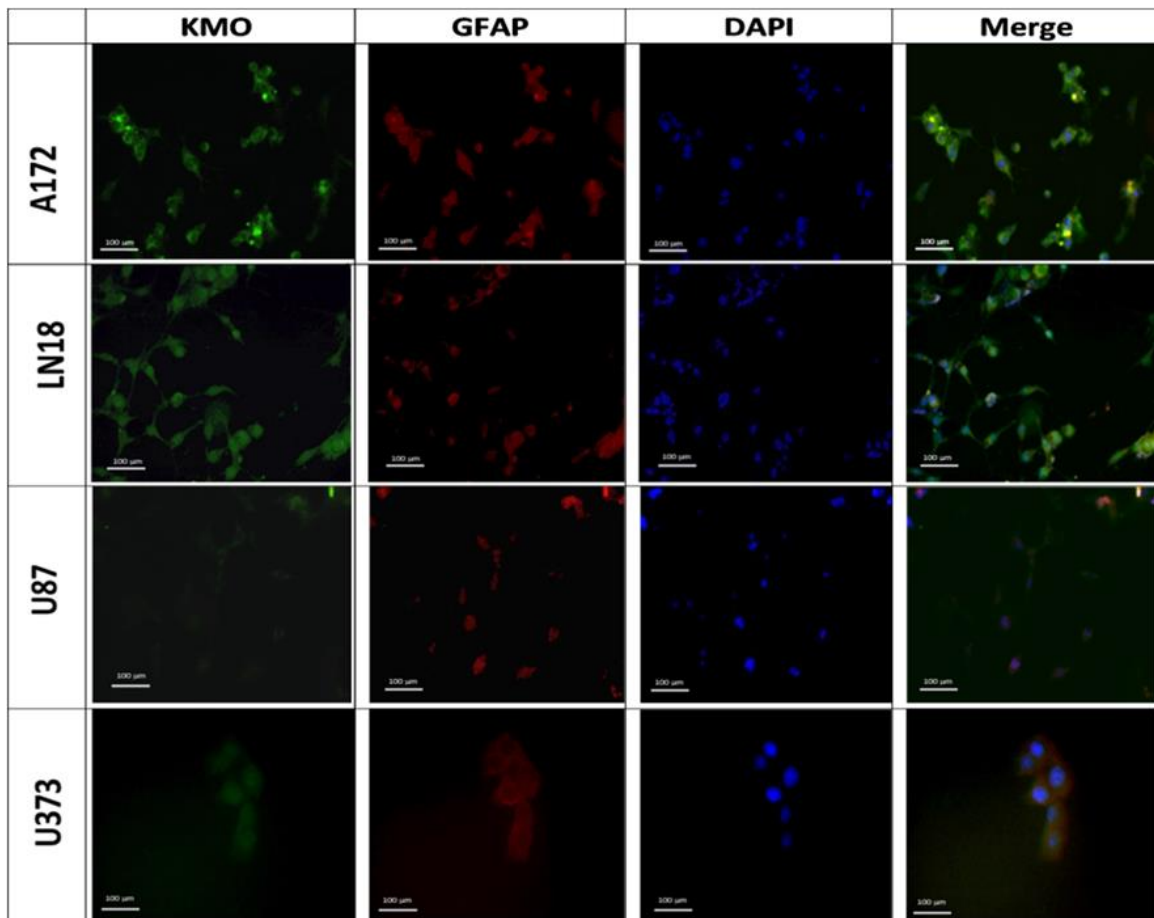


Figura 10. Localización de kinurenina monooxigenasa (KMO) en líneas humanas de glioblastoma (GBM). Imágenes representativas de las inmunofluorescencias para verificar la expresión de KMO (verde) en las líneas humanas de GBM A172, LN-18, U87 y U373. Se utilizó GFAP (rojo) para marcar a las células tumorales y DAPI (azul) para contrateñir los núcleos celulares.

#### Expresión de las enzimas de la VK en pacientes con astrocitomas.

Una vez demostrada la expresión y actividad de KMO en líneas celulares humanas de GBM, se realizó un análisis bioinformático para analizar el posible impacto de la expresión de las enzimas de la VK en muestras de astrocitomas de bajo grado de malignidad (ABG) y GBM con respecto a la expresión de estas enzimas en corteza cerebral. El análisis bioinformático de la expresión de las enzimas de la VK demostró que las enzimas IDO, TDO, KMO y QPRT se encuentran sobreexpresadas en muestras de tumores astrocíticos y esta expresión es diferente entre los astrocitomas, dependiendo del grado de malignidad. De manera que la expresión de IDO, TDO, KMO y QPRT fue significativamente mayor en GBM que en el grupo ABG (Figura 11A, 11B, 11D, 11E). Por otra parte, la expresión de KAT fue mayor en el grupo ABG con respecto al tejido no tumoral y al GBM (Figura 11C). Finalmente, el grupo de datos de GBM se separó de acuerdo con los niveles de expresión de KMO en “baja expresión” y “alta expresión”, y se analizó la sobrevida de estos grupos en una gráfica Kaplan-Meier. Se encontraron diferencias significativas en la mediana de sobrevida de manera que el grupo con alta expresión de KMO presentó menor sobrevida que el grupo de baja expresión de KMO (Figura 11F).

Estos resultados resaltan la importancia de la expresión de KMO como un factor que influye en la esperanza de vida de los pacientes diagnosticados con GBM

por lo que el siguiente paso de este estudio fue analizar la expresión y actividad de KMO en muestras de pacientes diagnosticados con astrocitomas de diferentes grados de malignidad encontradas en el repositorio de muestras y el departamento de Neuropatología del INNN.

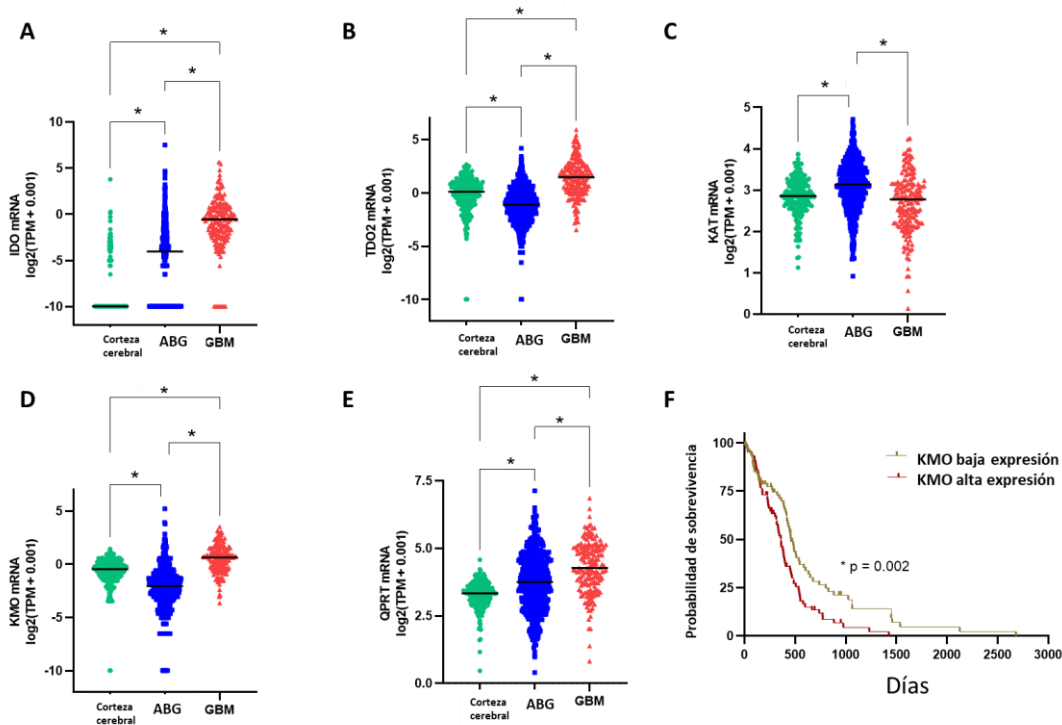


Figura 11. Análisis bioinformático de la expresión de las enzimas de la vía de las kinureninas (VK) en astrocitomas. **(A-E)** Niveles de expresión de mRNA de indolamina dioxigenasa (IDO), triptófano dioxigenasa (TDO), kinurenina aminotransferasa (KAT), kinurenina monooxigenasa (KMO) y quinolinato fosforribosiltransferasa (QPRT) en corteza cerebral, astrocitomas de bajo grado (ABG) y glioblastoma (GBM). **(F)** Comparación de la sobrevivencia de pacientes con GBM clasificados por altos niveles de expresión de KMO y bajos niveles de expresión de KMO. \* $p < 0.01$  con respecto a Corteza cerebral, prueba de Kruskal-Wallis seguida de prueba de Dunn.

De las muestras de pacientes cedidas por el repositorio del INNN se contó con dos muestras de astrocitoma grado 2, una muestra de astrocitoma grado 3, seis

muestras de GBM, además, se utilizó la muestra de un paciente diagnosticado con esclerosis mesial como tejido no tumoral y la muestra de un paciente diagnosticado con metástasis de carcinoma de tiroides como tejido tumoral no astrocítico, las características clínicas y demográficas de los pacientes se resumen en la tabla 3. Se encontró que los niveles de expresión de mRNA de KMO son significativamente mayores en las muestras de astrocitomas (grados 2, 3 y GBM) con respecto al grupo de no astrocitomas (Figura 12A), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la actividad de KMO entre los grupos estudiados (Figura 12B).

**Tabla 3.** Características clínicas y demográficas de los pacientes cuyas muestras fueron analizadas en este estudio.

	<b>Padecimiento neurológico</b>	<b>Tumor de cerebro (no astrocitoma)</b>	<b>Astrocitoma de bajo grado (Grado 2)</b>	<b>Astrocitoma de alto grado (Grado 3-4)</b>
<b>n</b>	6	1	2	7
<b>Diagnóstico</b>	Esclerosis mesial (16%) Esquizofrenia (16%) Parálisis facial (16%) Epilepsia (50%)	Metástasis de carcinoma tiroideo (100%)	Astrocitoma difuso (100%)	Astrocitoma anaplásico (14%) Glioblastoma multiforme (86%)
<b>Sexo</b> (Masculino%/Femenino%)	50/50	0/100	0/100	43/57
<b>Edad</b> (años)				
Media ± D.E.	32±19	40	47±7	58±12
Min-Max	20-64	40	42-53	23-75
<b>Sobrevivencia</b> (días)				
Mediana	--	242	1298	137



que células infiltradas en el tejido tumoral contribuyen con la expresión de KMO. Estos resultados corroboran lo encontrado en las líneas celulares humanas de GBM, demostrando que la expresión de KMO ocurre en las células tumorales que componen a los astrocitomas, además los niveles de expresión de esta enzima son mayores en astrocitomas que en tejidos no tumorales.



	H/E	KMO/Alexa 488	GFAP/PE	DAPI	Merge
Esclerosis					
Tiroides					
Astrocitoma grado II					
Astrocitoma grado II					
Astrocitoma grado III					
GBM					
GBM					
GBM					
GBM					
GBM					
GBM					

Figura 13. Localización de kinurenina monooxigenasa (KMO) en tejido tumoral. Imágenes representativas de tinciones de hematoxilina/eosina e inmunofluorescencias para la localización de KMO (verde), GFAP (rojo) y núcleos (azul) en cortes histológicos de muestras de pacientes diagnosticados con astrocitomas de diferentes grados de malignidad. Se utilizó la muestra de un paciente diagnosticado con esclerosis mesial como tejido no tumoral y la muestra de un paciente diagnosticado con metástasis de carcinoma de tiroides como tejido tumoral no astrocítico.

## Discusión.

Recientemente, el catabolismo del triptófano a través de la VK ha recibido atención en diferentes tipos de cánceres debido a su capacidad para modular el entorno inmunológico del tumor. Específicamente, la expresión de IDO se ha relacionado con GBM, pero el resto de la vía permanece poco explorado en esta patología. La relevancia de VK en GBM está relacionada con el hecho de que la kinurenina, el producto de oxidación del triptófano cruza predominantemente la barrera hematoencefálica y puede ser degradada por ambas ramas de la VK en el SNC, dando lugar a metabolitos inmunomoduladores que pueden favorecer un ambiente inmunosupresor en GBM. Este estudio demuestra por primera vez que KMO, una enzima crítica de la VK expresada en la microglía en el SNC, se expresa y es activa en los astrocitomas.

En este trabajo se demostró la capacidad de consumo de l-kyn, y su aprovechamiento a través ambas ramas de la VK, mediante la actividad de KAT y KMO, en diferentes líneas celulares de glioma murino y líneas celulares humanas de GBM (Figuras 3 y 9). Todas las líneas celulares de glioma utilizadas consumieron con mayor velocidad l-kyn, comparando con el cultivo primario de astrocitos, aunque se reveló un patrón heterogéneo entre las diferentes líneas celulares tumorales. Sin

embargo, las células tumorales produjeron una menor cantidad de KYNA, a pesar de consumir una mayor proporción de l-kyn y de ser células con linaje astrocítico, lo cual nos sugería que tendría una alta expresión y actividad de KAT (enzima encargada de la producción de KYNA). Al no observar una mayor producción de KYNA tras el alto consumo de l-kyn, se evaluó la actividad de KAT. Las líneas celulares Rg2 y U87 mostraron tener actividad de KAT similar a la encontrada para el cultivo de astrocitos, mientras que el resto de las líneas de glioma mostraron una actividad significativamente más alta que los astrocitos; la discordancia entre la producción de KYNA y la actividad de KAT llevó a la idea de que hubiera otra enzima capaz de utilizar a l-kyn como sustrato. En este caso, KMO es la enzima que da lugar al “brazo largo” de la VK y que tiene una afinidad mayor por l-kyn que KAT,  $Km_{KMO} = 2\mu\text{M}$  vs.  $Km_{KAT} = 4.7\text{ mM}$  (Han *et al.*, 2008; Lowe *et al.*, 2014; Hutchinson *et al.*, 2017), por lo que se evaluó la actividad de KMO en las líneas celulares murinas C6 y Rg2, encontrando que, a diferencia de los astrocitos, las células tumorales presentan actividad de KMO (Figura 3). A partir de este hallazgo se determinó la expresión y actividad de KMO en las líneas celulares humanas de GBM y se encontró un patrón, A172>LN18>U373>U87, tanto para la expresión como la actividad de KMO (Figura 9). Nuestros resultados confirman la expresión de ARNm de KMO en líneas celulares de GBM observada en diferentes reportes (Riess *et al.*, 2020; Palanichamy *et al.* 2016). Además, esta es la primera vez que se comprueba la actividad de KMO en células de GBM, demostrando que esta enzima es completamente funcional en células tumorales derivadas de astrocitos transformados y que da pie a la rama de la VK cuyo producto final es la síntesis de  $\text{NAD}^+$ , así como a la producción de metabolitos tóxicos para células del sistema

inmune (Figuras 6, 7 y 8; Frumento *et al.*, 2002; Belladonna *et al.*, 2007). Por lo que la actividad de KMO en células tumorales podría conferir de ventajas tanto metabólicas como inmunomoduladoras.

Aunado a lo anterior, se observó una relación inversa entre la expresión y actividad de KMO con la producción de KYNA tras la incubación de las líneas celulares con I-kyn, siendo que las células A172 que presentaron mayores niveles de expresión y actividad de KMO, produjeron menor nivel de KYNA, mientras que las células U87, que presentaron menor expresión y actividad de KMO, son las que produjeron mayores niveles de KYNA (Figuras 3 y 9). Tal diversidad en el consumo de I-kyn y la expresión de KMO se ha reportado en diferentes líneas celulares de cáncer de pulmón y de GBM, en dicho trabajo las líneas celulares humanas de GBM LN18 y U87 coinciden con las utilizadas en el presente trabajo en el que las células LN18 consumieron más I-kyn y presentaron mayor expresión de KMO que las células U87 (Palanichamy *et al.*, 2016). En este caso, se atribuyó la acumulación de I-kyn y la baja expresión de KMO en células U87 con una mayor capacidad inmunomoduladora al favorecer el aumento de I-kyn y KYNA, ligandos de los receptores GPR35 y AHR, asociados con la diferenciación de linfocitos cooperadores hacia linfocitos Tregs (Wang *et al.*, 2006; Mezrich *et al.*, 2010; Palanichamy *et al.*, 2016).

Debido a la heterogeneidad presente en GBM no se puede descartar el hecho de que ambas situaciones ocurran paralelamente, células tumorales con alta expresión de KMO y consumo de I-kyn y células tumorales con baja expresión de

KMO y consumo de l-kyn, coexistan en el mismo escenario, explotando el catabolismo del triptófano para diferentes fines.

En el modelo *in vivo* de desarrollo de tumores intracraneales se observó la disminución de la actividad de KMO con respecto al tiempo mientras que la actividad de KAT no varió (Figura 4). Sin embargo, el aumento observado en las poblaciones de leucocitos, monocitos, células NK, linfocitos T citotóxicos y cooperadores en el tejido tumoral a lo largo del tiempo demuestra que la disminución en la expresión y actividad de KMO en tumores no se debe a la pérdida de poblaciones infiltrantes del tumor (Figura 5). Se ha reportado que las poblaciones del sistema inmune asociadas a tumor en GBM, principalmente TAMs y MDSCs expresan altos niveles deIDO, contribuyendo con la formación del ambiente inmunosupresor (Terness *et al.*, 2002; Ochs *et al.*, 2013; Ribechini *et al.*, 2017; Zhai *et al.*, 2017). Sin embargo, no se ha estudiado la expresión de KMO en estas poblaciones infiltrantes del tumor. Se sugiere que los cambios en la expresión y actividad de KMO en células tumorales y poblaciones infiltrantes del tumor podrían deberse a cambios en el ambiente de citocinas dentro del tumor, esto debido a que la expresión de enzimas de la VK como KMO, IDO y QPRT, son inducibles por la presencia de citocinas pro-inflamatorias como interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Brooks *et al.*, 2016; Ueland *et al.*, 2017), mientras que el establecimiento de ambientes anti-inflamatorios que promueven la tolerancia del sistema inmune hacia las células tumorales disminuye la expresión de enzimas como IDO y QPRT en macrófagos (Minhas *et al.*, 2019), favoreciendo la diferenciación de estas poblaciones hacia fenotipos tolerogénicos (Minhas *et al.*, 2019). Más estudios son

necesarios para encontrar asociaciones entre los cambios en la expresión y actividad de KMO con la producción de citocinas pro- y anti-inflamatorias y la inducción de tolerancia o anergia en diferentes poblaciones del sistema inmune.

Los datos observados en las líneas celulares tumorales *in vitro* e *in vivo* señalan la importancia de KMO y su impacto en la modulación de la respuesta inmune en el ambiente del GBM, por lo que se exploró el impacto de la expresión de las enzimas de la VK en pacientes diagnosticados con astrocitomas de diferentes grados de malignidad. En el contexto de los astrocitomas, las enzimas de la VK más estudiadas han sido IDO y TDO, demostrando que estas enzimas se encuentran sobreexpresadas en el tejido tumoral de manera directamente proporcional al grado de malignidad, la presencia de linfocitos Tregs y con la baja sobrevida de los pacientes (Wainwright *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2020). Los resultados obtenidos del análisis bioinformático demostraron que las enzimas de la VK: IDO, TDO, KMO y QPRT se sobreexpresan de manera proporcional al grado de malignidad en tejido tumoral de astrocitomas con respecto a datos de corteza cerebral, por otra parte, la expresión de KAT fue mayor en astrocitomas de bajo grado de malignidad que en corteza cerebral y que en GBM (Figura 11). Además, separando los datos de los pacientes en “baja expresión” y “alta expresión” de acuerdo con la media de la expresión de KMO, encontramos que los pacientes con niveles de KMO por arriba de la media de expresión presentaron menor tiempo de sobrevida que aquellos pacientes con niveles de KMO menores que la media de expresión de esta enzima, sugiriendo que el nivel de expresión de KMO puede ser un indicador pronóstico en pacientes con GBM (Figura 11). Este tipo de estudios bioinformáticos se han

realizado para estudios de cáncer de mama, demostrando que la expresión de KMO está amplificada, mientras que no se encontraron cambios en la expresión de KAT en cáncer de mama; además, los niveles de expresión de KMO están directamente relacionados con el grado de malignidad de tumores de cáncer de mama y de cáncer de mama triple negativos (Huang *et al.*, 2020). A partir de análisis bioinformáticos, también se ha descrito el impacto de la expresión de KMO en la supervivencia de pacientes con cáncer colorrectal y de cáncer de mama, demostrando que los altos niveles de expresión de KMO influyen en la baja supervivencia de los pacientes (Lai *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2021a).

Por otra parte, la evaluación de muestras de tumores astrocíticos derivadas de pacientes del INNN-MVS, demostró que los niveles de expresión de ARNm de KMO son mayores en las muestras de gliomas que en las muestras de tejido no tumoral, si bien en la actividad de KMO se observó una tendencia similar a la expresión de ARNm, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 12). Esto indica la heterogeneidad en la actividad de esta enzima como se observó entre las diferentes líneas celulares humanas de GBM, sin embargo, un estudio más amplio en una población mayor podrá aclarar el panorama de la expresión y actividad de KMO en la población mexicana diagnosticada con GBM y tumores astrocíticos.

Las inmunotinciones realizadas en las muestras de los pacientes confirmaron la expresión de KMO en células de linaje astrocítico, GFAP+ (Figura 13), indicando que durante el proceso de carcinogénesis, astrocitos transformados que, de manera basal sólo expresan KAT, empiezan a expresar KMO, lo que confiere ventajas tanto

metabólicas como inmunomoduladoras que permiten el establecimiento de un tumor, esto contrasta con la tinción realizada en la muestra de un paciente diagnosticado con esclerosis mesial en la que la expresión de KMO no co-localizó con los astrocitos marcados con GFAP. Por otra parte, en las muestras de tumores también se observó la expresión de KMO en células no astrocíticas, GFAP-, que bien pudieran ser parte del infiltrado celular presente en el tejido tumoral y que contribuye con la expresión y actividad de KMO en el microambiente del GBM (Figura 13).

El impacto de la expresión de KMO en diferentes tipos de cáncer ha empezado a cobrar importancia, desde que se ha reportado recientemente que KMO se encuentra sobreexpresada en tumores de glándula mamaria y melanomas caninos, esta expresión se relaciona directamente con el grado de malignidad y la baja supervivencia de los individuos con tumores caninos (Chiu *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2021b). La misma tendencia se ha reportado en líneas celulares humanas y en tumores de pacientes humanos de cáncer colorrectal, cáncer de mama y cáncer de mama triple negativo, confirmando los datos bioinformáticos observados en las bases de datos del “Cancer Genome Atlas” (Huang *et al.*, 2020; Lai *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2021a).

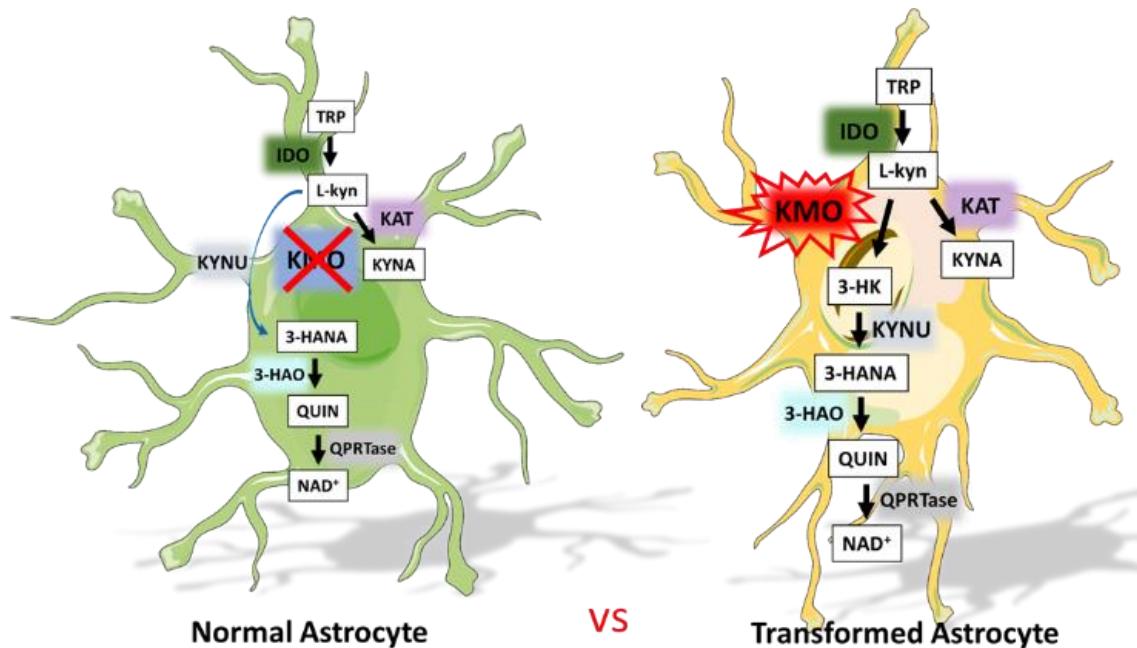
A pesar de que en este trabajo no se determinó el mecanismo a través del cual las células tumorales de GBM empiezan a expresar KMO, se ha hipotetizado que la respuesta inmune anti-tumoral durante las primeras etapas del establecimiento de un tumor influye en la sobreexpresión de enzimas de la VK (Prendergast, 2011; Adams *et al.*, 2012). Esto se debe a que citocinas pro-inflamatorias como INF- $\gamma$  o



TNF- $\alpha$  son inductoras de la expresión deIDO y KMO, por lo que las células tumorales que hayan sobrevivido a la eliminación por parte de la respuesta inmune pro-inflamatoria están expuestas a un ambiente de citocinas que les permite expresar estas enzimas de la VK (Connor et al., 2008; Prendergast, 2011; Adams et al., 2012; Brooks et al., 2016; Ueland et al., 2017). Por otra parte, en muestras de cáncer de mama se observó la correlación entre la expresión de KMO y genes relacionados con respuestas inflamatorias dentro del tejido tumoral, lo que podría estar contribuyendo a la malignidad de las células tumorales (Tsang et al., 2021). Es posible que esto suceda durante los procesos que moldean el ambiente del GBM, aunque hace falta esclarecer este caso. Además sería de interés conocer el papel de KMO en las poblaciones infiltrantes del tumor en diferentes etapas del desarrollo tumoral.

La importancia de KMO en la viabilidad y establecimiento tumoral ha sido demostrada con la inhibición de la proliferación y migración celular, inhibición de metástasis y disminución del volumen tumoral mediante el silenciamiento de la expresión de KMO en diferentes modelos, *in vitro* e *in vivo*, de cáncer de mama, colorrectal y melanoma (Chiu et al., 2019; Huang et al., 2020; Lai et al., 2021; Liu et al., 2021a; Liu et al., 2021b), demostrando incluso la localización de KMO en membrana celular (Lai et al., 2021). Por otra parte, se ha demostrado el papel de KMO más allá de su actividad enzimática, regulando la vía de señalización de  $\beta$ -catenina, promoviendo la expresión de genes pluripotentes en células de cáncer de mama (Huang et al., 2020); mientras que, en melanomas caninos, KMO se asocia con la activación de la señalización vía STAT3, promoviendo la metástasis de estos

tumores (Liu *et al.*, 2021b). Esta información señala a KMO como un posible blanco terapéutico para diferentes tipos de cáncer y, con lo observado en este trabajo, en el contexto del GBM se abre un nuevo campo hacia la investigación de la modulación de KMO en las células de GBM y su impacto en la viabilidad celular y su capacidad de formación de tumores (Figura 14).



**Figura 14.** Catabolismo del triptófano en astrocitos comparado con astrocitos transformados. Tomado de Vázquez-Cervantes *et al.*, 2021.

## Conclusiones.

Se demostró la dinámica de producción de los metabolitos de la VK en glioma murino.

Además, se reportó por primera vez que la expresión y actividad de KMO está presente en células de glioma.

El impacto de KMO en GBM y otros cánceres representa un campo novedoso de estudio hacia la modulación de la VK a través de KMO como posible blanco terapéutico en el tratamiento para combatir a los astrocitomas.

### Perspectivas.

Evaluar el efecto de la inhibición de la expresión y actividad de KMO en la viabilidad de células de glioma.

Evaluar el efecto de la inhibición de la expresión y actividad de KMO en el desarrollo de tumores en modelos *in vivo*.

Determinar el papel de la expresión y la actividad de KMO en las poblaciones infiltrantes del tumor en diferentes etapas del desarrollo tumoral *in vivo*.

Estudiar la relación de la expresión genética de las enzimas de la VK y la expresión de genes relacionados con las propiedades inmunomoduladoras, metabólicas, angiogénicas y de señalización características del GBM y gliomas de bajo grado de malignidad.

## Referencias Bibliográficas.

- Abdelzaher E. WHO grading-astrocytomas. PathologyOutlines.com website. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/cnstumorwhogradings.html>. Accessed June 29th, 2021.
- Adams S, Braidy N, Bessede A, Brew BJ, Grant R, Teo C, Guillemin GJ. The kynurenine pathway in brain tumor pathogenesis. *Cancer Res.* 2012 Nov 15;72(22):5649-57.
- Adams S, Teo C, McDonald KL, Zinger A, Bustamante S, Lim CK, Sundaram G, Braidy N, Brew BJ, Guillemin GJ. Involvement of the kynurenine pathway in human glioma pathophysiology. *PLoS One.* 2014 Nov 21;9(11):e112945.
- Agnihotri S, Zadeh G. Metabolic reprogramming in glioblastoma: the influence of cancer metabolism on epigenetics and unanswered questions. *Neuro Oncol.* 2016 Feb;18(2):160-72.
- Ahlstedt J, Konradsson E, Ceberg C, Redebrandt HN. Increased effect of two-fraction radiotherapy in conjunction with IDO1 inhibition in experimental glioblastoma. *PLoS One.* 2020 May 29;15(5):e0233617.
- Akasaki Y, Liu G, Chung NH, Ehtesham M, Black KL, Yu JS. Induction of a CD4+ T regulatory type 1 response by cyclooxygenase-2-overexpressing glioma. *Journal of immunology.* 2004. 173(7): 4352-9.
- Badawy AA. Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects. *Int J Tryptophan Res.* 2017 Mar 15;10:1178646917691938.
- Belladonna ML, Puccetti P, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Volpi C, Gizzi S, Pallotta MT, Fioretti MC, Grohmann U. Immunosuppression via tryptophan catabolism: the role of kynurenine pathway enzymes. *Transplantation.* 2007 Jul 15;84(1 Suppl):S17-20.
- Bender DA, Magboul BI, Wynick D. Probable mechanisms of regulation of the utilization of dietary tryptophan, nicotinamide and nicotinic acid as precursors of nicotinamide nucleotides in the rat. *Br J Nutr.* 1982 Jul;48(1):119-27.
- Berlinguer-Palmini R, Masi A, Narducci R, Cavone L, Maratea D, Cozzi A, Sili M, Moroni F, Mannaioni G. GPR35 activation reduces Ca<sup>2+</sup> transients and contributes to the kynurenic acid-dependent reduction of synaptic activity at CA3-CA1 synapses. *PLoS One.* 2013 Nov 29;8(11):e82180.
- Bordelon YM, Chesselet MF, Nelson D, Welsh F, Erecińska M. Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum. *J Neurochem.* 1997 Oct;69(4):1629-39.

- Boussiotis, V.A., Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *N Engl J Med*, 2016. 375(18): p. 1767-1778.
- Brettschneider EES, Terabe M. The Role of NKT Cells in Glioblastoma. *Cells*. 2021 Jun 30;10(7):1641.
- Broekman ML, Maas SLN, Abels ER, Mempel TR, Krichevsky AM, Breakefield XO. Multidimensional communication in the microenvirons of glioblastoma. *Nature reviews. Neurology*. 2018. 14(8): 482-95.
- Brooks AK, Lawson MA, Smith RA, Janda TM, Kelley KW, McCusker RH. Interactions between inflammatory mediators and corticosteroids regulate transcription of genes within the Kynurenine Pathway in the mouse hippocampus. *J Neuroinflammation*. 2016 May 3;13(1):98.
- Buchbinder, E.I. and A. Desai, CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol*, 2016. 39(1): p. 98-106.
- Buglione M, Pedretti S, Poliani PL, Liserre R, Gipponi S, Spena G, Borghetti P, Pegurri L, Saiani F, Spiazzi L, Tesini G, Uccelli C, Triggiani L, Magrini SM. Pattern of relapse of glioblastoma multiforme treated with radical radio-chemotherapy: Could a margin reduction be proposed? *J Neurooncol*. 2016 Jun;128(2):303-12.
- Campos B, Olsen LR, Urup T, Poulsen HS. A comprehensive profile of recurrent glioblastoma. *Oncogene*. 2016 Nov 10;35(45):5819-5825.
- Chen Y, Guillemin GJ. Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy States. *Int J Tryptophan Res*. 2009;2:1-19.
- Chiu YH, Lei HJ, Huang KC, Chiang YL, Lin CS. Overexpression of Kynurenine 3-Monooxygenase Correlates with Cancer Malignancy and Predicts Poor Prognosis in Canine Mammary Gland Tumors. *J Oncol*. 2019 May 2;2019:6201764.
- Connor TJ, Starr N, O'Sullivan JB, Harkin A. Induction of indolamine 2,3-dioxygenase and kynurenine 3-monooxygenase in rat brain following a systemic inflammatory challenge: a role for IFN-gamma? *Neurosci Lett*. 2008 Aug 15;441(1):29-34
- Cosi C, Mannaioni G, Cozzi A, Carlà V, Sili M, Cavone L, Maratea D, Moroni F. G-protein coupled receptor 35 (GPR35) activation and inflammatory pain: Studies on the antinociceptive effects of kynurenic acid and zaprinast. *Neuropharmacology*. 2011 Jun;60(7-8):1227-31.
- Dictionary of cancer terms. National Cancer Institute. Consultado el 25/06/21. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/astrocytoma>.

- Du L, Xing Z, Tao B, Li T, Yang D, Li W, Zheng Y, Kuang C, Yang Q. Both IDO1 and TDO contribute to the malignancy of gliomas via the Kyn-AhR-AQP4 signaling pathway. *Signal Transduct Target Ther*. 2020 Feb 21;5(1):10.
- El Andaloussi A, Han Y, Lesniak MS. Prolongation of survival following depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells in mice with experimental brain tumors. *Journal of neurosurgery*. 2006. 105(3): 430-7.
- El Andaloussi A, Lesniak MS. CD4+ CD25+ FoxP3+ T-cell infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with tumor grade in human gliomas. *Journal of neuro-oncology*. 2007. 83(2): 145:52.
- Foster AC, Vezzani A, French ED, Schwarcz R. Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid. *Neurosci Lett*. 1984 Aug 10;48(3):273-8.
- Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res*. 2017 May 1;7(5):1016-1036.
- Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med*. 2002 Aug 19;196(4):459-68.
- Gierzyng A, Pszczolkowska D, Walentynowicz KA, Rajan WD, Kaminska B. Immune microenvironment of gliomas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2017. 97(5): 498-518.
- Goda K, Kishimoto R, Shimizu S, Hamane Y, Ueda M. Quinolinic acid and active oxygens. Possible contribution of active Oxygens during cell death in the brain. *Adv Exp Med Biol*. 1996;398:247-54.
- Goldstein LE, Leopold MC, Huang X, Atwood CS, Saunders AJ, Hartshorn M, Lim JT, Faget KY, Muffat JA, Scarpa RC, Chylack LT Jr, Bowden EF, Tanzi RE, Bush AI. 3-Hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid generate hydrogen peroxide and promote alpha-crystallin cross-linking by metal ion reduction. *Biochemistry*. 2000 Jun 20;39(24):7266-75.
- Goshima N, Wadano A, Miura K. 3-Hydroxykynurenine as O<sub>2</sub><sup>-</sup> scavenger in the blowfly, *Aldrichina grahami*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986 Sep 14;139(2):666-72.
- Gossmann TI, Ziegler M, Puntervoll P, de Figueiredo LF, Schuster S, Heiland I. NAD(+) biosynthesis and salvage--a phylogenetic perspective. *FEBS J*. 2012 Sep;279(18):3355-63.

- Green AR, Aronson JK, Curzon G, Woods HF. Metabolism of an oral tryptophan load. II: Effect of pretreatment with the putative tryptophan pyrrolase inhibitors nicotinamide or allopurinol. *Br J Clin Pharmacol*. 1980 Dec;10(6):611-5.
- Han Q, Fang J, Li J. Kynurenine aminotransferase and glutamine transaminase K of *Escherichia coli*: identity with aspartate aminotransferase. *Biochem J*. 2001 Dec 15;360(Pt 3):617-23.
- Han Q, Cai T, Tagle DA, Robinson H, Li J. Substrate specificity and structure of human amino adipate aminotransferase/kynurenine aminotransferase II. *Biosci Rep*. 2008 Aug;28(4):205-15.
- Han S, Zhang C, Li Q, Dong J, Liu Y, Huang Y, Jiang T, Wu A. Tumour-infiltrating CD4(+) and CD8(+) lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma. *British journal of cancer*. 2014. 110(10): 2560-8.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
- Hanihara M, Kawataki T, Oh-Oka K, Mitsuka K, Nakao A, Kinouchi H. Synergistic antitumor effect with indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition and temozolomide in a murine glioma model. *J Neurosurg*. 2016 Jun;124(6):1594-601.
- Hayaishi O. Properties and function of indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Biochem*. 1976 Apr;79(4):13P-21P.
- Huang TT, Tseng LM, Chen JL, Chu PY, Lee CH, Huang CT, Wang WL, Lau KY, Tseng MF, Chang YY, Chiang TY, Ueng YF, Lee HC, Dai MS, Liu CY. Kynurenine 3-monooxygenase upregulates pluripotent genes through  $\beta$ -catenin and promotes triple-negative breast cancer progression. *EBioMedicine*. 2020 Apr;54:102717.
- Huether G, Thömke F, Adler L. Administration of tryptophan-enriched diets to pregnant rats retards the development of the serotonergic system in their offspring. *Brain Res Dev Brain Res*. 1992 Aug 21;68(2):175-81.
- Hutchinson JP, Rowland P, Taylor MRD, Christodoulou EM, Haslam C, Hobbs CI, Holmes DS, Homes P, Liddle J, Mole DJ, Uings I, Walker AL, Webster SP, Mowat CG, Chung CW. Structural and mechanistic basis of differentiated inhibitors of the acute pancreatitis target kynurenine-3-monooxygenase. *Nat Commun*. 2017 Jun 12;8:15827
- Jellinger K. Glioblastoma multiforme: morphology and biology. *Acta Neurochir (Wien)*. 1978;42(1-2):5-32.
- Jin H, Zhang Y, You H, Tao X, Wang C, Jin G, Wang N, Ruan H, Gu D, Huo X, Cong W, Qin W. Prognostic significance of kynurenine 3-monooxygenase and

- effects on proliferation, migration, and invasion of human hepatocellular carcinoma. *Sci Rep.* 2015 Jun 23;5:10466.
- Kim J, Han J, Jang Y, Kim SJ, Lee MJ, Ryu MJ, Kweon GR, Heo JY. High-capacity glycolytic and mitochondrial oxidative metabolisms mediate the growth ability of glioblastoma. *Int J Oncol.* 2015 Sep;47(3):1009-16. doi: 10.3892/ijo.2015.3101. Epub 2015 Jul 21. PMID: 26202438.
- Kudo, T.; Prentzell, M.T.; Mohapatra, S.R.; Sahm, F.; Zhao, Z.; Grummt, I.; Wick, W.; Opitz, C.A.; Platten, M.; Green, E.W. Constitutive Expression of the Immunosuppressive Tryptophan Dioxygenase TDO2 in Glioblastoma Is Driven by the Transcription Factor C/EBPbeta. *Front Immunol* 2020, 11, 657, doi:10.3389/fimmu.2020.00657.
- Lai MH, Liao CH, Tsai NM, Chang KF, Liu CC, Chiu YH, Huang KC, Lin CS. Surface Expression of Kynurenine 3-Monooxygenase Promotes Proliferation and Metastasis in Triple-Negative Breast Cancers. *Cancer Control.* 2021 Jan-Dec;28:10732748211009245.
- Lauro GM, Di Lorenzo N, Grossi M, Maleci A, Guidetti B. Prostaglandin E2 as an immunomodulating factor released in vitro by human glioma cells. *Acta neuropathologica.* 1986. 69(3-4): 278-82.
- Leipnitz G, Schumacher C, Dalcin KB, Scussiato K, Solano A, Funchal C, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wannmacher CM, Latini A, Wajner M. In vitro evidence for an antioxidant role of 3-hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid in the brain. *Neurochem Int.* 2007 Jan;50(1):83-94.
- Li M, Bolduc AR, Hoda MN, Gamble DN, Dolisca SB, Bolduc AK, Hoang K, Ashley C, McCall D, Rojiani AM, Maria BL, Rixe O, MacDonald TJ, Heeger PS, Mellor AL, Munn DH, Johnson TS. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway controls complement-dependent enhancement of chemo-radiation therapy against murine glioblastoma. *J Immunother Cancer.* 2014 Jul 7;2:21.
- Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci.* 2016 Mar;41(3):211-218. doi: 10.1016/j.tibs.2015.12.001. Epub 2016 Jan 5. Erratum in: *Trends Biochem Sci.* 2016 Mar;41(3):287. Erratum in: *Trends Biochem Sci.* 2016 Mar;41(3):287.
- Liu CY, Huang TT, Chen JL, Chu PY, Lee CH, Lee HC, Lee YH, Chang YY, Yang SH, Jiang JK, Chen WS, Chao Y, Teng HW. Significance of Kynurenine 3-Monooxygenase Expression in Colorectal Cancer. *Front Oncol.* 2021a Apr 16;11:620361.
- Liu IL, Chung TF, Huang WH, Hsu CH, Liu CC, Chiu YH, Huang KC, Liao AT, Lin CS. Kynurenine 3-monooxygenase (KMO), and signal transducer and



- activator of transcription 3 (STAT3) expression is involved in tumour proliferation and predicts poor survival in canine melanoma. *Vet Comp Oncol.* 2021b Mar;19(1):79-91.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007 Aug;114(2):97-109. doi: 10.1007/s00401-007-0243-4. Epub 2007 Jul 6. Erratum in: *Acta Neuropathol.* 2007 Nov;114(5):547.
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016 Jun;131(6):803-20. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1. Epub 2016 May 9.
- Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister SM, Reifenberger G, Soffietti R, von Deimling A, Ellison DW. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 2021 Aug 2;23(8):1231-1251.
- Lowe DM, Gee M, Haslam C, Leavens B, Christodoulou E, Hissey P, Hardwicke P, Argyrou A, Webster SP, Mole DJ, Wilson K, Binnie M, Yard BA, Dean T, Liddle J, Uings I, Hutchinson JP. Lead discovery for human kynurenine 3-monooxygenase by high-throughput RapidFire mass spectrometry. *J Biomol Screen.* 2014 Apr;19(4):508-15.
- Lugo-Huitrón R, Blanco-Ayala T, Ugalde-Muñiz P, Carrillo-Mora P, Pedraza-Chaverrí J, Silva-Adaya D, Maldonado PD, Torres I, Pinzón E, Ortiz-Islas E, López T, García E, Pineda B, Torres-Ramos M, Santamaría A, La Cruz VP. On the antioxidant properties of kynurenic acid: free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicol Teratol.* 2011 Sep-Oct;33(5):538-47.
- Majewski M, Kozłowska A, Thoene M, Lepiarczyk E, Grzegorzewski WJ. Overview of the role of vitamins and minerals on the kynurenine pathway in health and disease. *J Physiol Pharmacol.* 2016 Feb;67(1):3-19.
- Mashimo T, Pichumani K, Vemireddy V, Hatanpaa KJ, Singh DK, Sirasanagandla S, Nannepaga S, Piccirillo SG, Kovacs Z, Foong C, Huang Z, Barnett S, Mickey BE, DeBerardinis RJ, Tu BP, Maher EA, Bachoo RM. Acetate is a bioenergetic substrate for human glioblastoma and brain metastases. *Cell.* 2014 Dec 18;159(7):1603-14.
- Masui K, Tanaka K, Akhavan D, Babic I, Gini B, Matsutani T, Iwanami A, Liu F, Villa GR, Gu Y, Campos C, Zhu S, Yang H, Yong WH, Cloughesy TF, Mellinghoff IK, Cavenee WK, Shaw RJ, Mischel PS. mTOR complex 2 controls glycolytic

- metabolism in glioblastoma through FoxO acetylation and upregulation of c-Myc. *Cell Metab.* 2013 Nov 5;18(5):726-39.
- Mezrich JD, Fechner JH, Zhang X, Johnson BP, Burlingham WJ, Bradfield CA. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol.* 2010 Sep 15;185(6):3190-8.
- Minhas PS, Liu L, Moon PK, Joshi AU, Dove C, Mhatre S, Contrepois K, Wang Q, Lee BA, Coronado M, Bernstein D, Snyder MP, Migaud M, Majeti R, Mochly-Rosen D, Rabinowitz JD, Andreasson KI. Macrophage de novo NAD<sup>+</sup> synthesis specifies immune function in aging and inflammation. *Nat Immunol.* 2019 Jan;20(1):50-63.
- Mohapatra, S.R.; Sadik, A.; Tykocinski, L.O.; Dietze, J.; Poschet, G.; Heiland, I.; Opitz, C.A. Hypoxia Inducible Factor 1alpha Inhibits the Expression of Immunosuppressive Tryptophan-2,3-Dioxygenase in Glioblastoma. *Front Immunol* 2019, 10, 2762.
- Moroni F, Cozzi A, Sili M, Mannaioni G. Kynurenic acid: a metabolite with multiple actions and multiple targets in brain and periphery. *J Neural Transm (Vienna).* 2012 Feb;119(2):133-9.
- Moroni F, Lombardi G, Carlà V, Moneti G. The excitotoxin quinolinic acid is present and unevenly distributed in the rat brain. *Brain Res.* 1984 Mar 19;295(2):352-5.
- Nakagami Y, Saito H, Katsuki H. 3-Hydroxykynurenine toxicity on the rat striatum in vivo. *Jpn J Pharmacol.* 1996 Jun;71(2):183-6.
- Nathoo N, Barnett GH, Golubic M. The eicosanoid cascade: possible role in gliomas and meningiomas. *Journal of clinical pathology.* 2004. 57(1): 6-13.
- Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Mar;11(3):220-8.
- Nematollahi A, Sun G, Jayawickrama GS, Church WB. Kynurenine Aminotransferase Isozyme Inhibitors: A Review. *Int J Mol Sci.* 2016 Jun 15;17(6):946.
- Ochs K, Sahm F, Opitz CA, Lanz TV, Oezen I, Couraud PO, von Deimling A, Wick W, Platten M. Immature mesenchymal stem cell-like pericytes as mediators of immunosuppression in human malignant glioma. *Journal of neuroimmunology.* 2013. 265(1-2): 106-116.
- Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2013 Feb 15;19(4):764-72.

- Okuda S, Nishiyama N, Saito H, Katsuki H. 3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity. *J Neurochem*. 1998 Jan;70(1):299-307.
- Ostrom QT, Patil N, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017. *Neuro Oncol*. 2020 Oct 30;22(12 Suppl 2):iv1-iv96.
- Palanichamy K, Thirumoorthy K, Kanji S, Gordon N, Singh R, Jacob JR, Sebastian N, Litzenberg KT, Patel D, Bassett E, Ramasubramanian B, Lautenschlaeger T, Fischer SM, Ray-Chaudhury A, Chakravarti A. Methionine and Kynurenine Activate Oncogenic Kinases in Glioblastoma, and Methionine Deprivation Compromises Proliferation. *Clin Cancer Res*. 2016 Jul 15;22(14):3513-23.
- Patil V, Pal J, Somasundaram K. Elucidating the cancer-specific genetic alteration spectrum of glioblastoma derived cell lines from whole exome and RNA sequencing. *Oncotarget*. 2015 Dec 22;6(41):43452-71.
- Perng P, Lim M. Immunosuppressive Mechanisms of Malignant Gliomas: Parallels at Non-CNS Sites. *Frontiers in oncology*. 2015. 5:153.
- Phillips RS. Structure and mechanism of kynureninase. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Feb 15;544:69-74.
- Prendergast GC. Cancer: Why tumours eat tryptophan. *Nature*. 2011 Oct 12;478(7368):192-4.
- Qazi MA, Vora P, Venugopal C, Sidhu SS, Moffat J, Swanton C, Singh SK. Intratumoral heterogeneity: pathways to treatment resistance and relapse in human glioblastoma. *Ann Oncol*. 2017 Jul 1;28(7):1448-1456.
- Quagliariello E, Palmieri F, Alifano A, Papa S. 3-hydroxyanthranilic acid-mediated respiration in the inhibited respiratory chain. *Biochim Biophys Acta*. 1966 Mar 7;113(3):482-9.
- Quagliariello E, Papa S, Saccone C, Alifano A. Effect of 3-hydroxyanthranilic acid on the mitochondrial respiratory system. *Biochem J*. 1964 Apr;91(1):137-46.
- Rabinovich GA, Gabilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annual review of immunology*. 2007. 25: 267-96.
- Ribechini E, Hutchinson JA, Hergovits S, Heuer M, Lucas J, Schleicher U, Jordán Garrote AL, Potter SJ, Riquelme P, Brackmann H, Müller N, Raifer H, Berberich I, Huber M, Beilhack A, Lohoff M, Bogdan C, Eyrich M, Hermanns HM, Geissler EK, Lutz MB. Novel GM-CSF signals via IFN- $\gamma$ R/IRF-1 and AKT/mTOR license monocytes for suppressor function. *Blood Adv*. 2017 Jun 7;1(14):947-960.

- Ribeiro CA, Grando V, Dutra Filho CS, Wannmacher CM, Wajner M. Evidence that quinolinic acid severely impairs energy metabolism through activation of NMDA receptors in striatum from developing rats. *J Neurochem.* 2006 Dec;99(6):1531-42.
- Riess C, Schneider B, Kehnscherper H, Gesche J, Irmischer N, Shokraie F, Classen CF, Wirthgen E, Domanska G, Zimpfer A, Strüder D, Junghanss C, Maletzki C. Activation of the Kynurenine Pathway in Human Malignancies Can Be Suppressed by the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Dinaciclib. *Front Immunol.* 2020 Feb 14;11:55.
- Saga I, Shibao S, Okubo J, Osuka S, Kobayashi Y, Yamada S, Fujita S, Urakami K, Kusuhara M, Yoshida K, Saya H, Sampetean O. Integrated analysis identifies different metabolic signatures for tumor-initiating cells in a murine glioblastoma model. *Neuro Oncol.* 2014 Aug;16(8):1048-56.
- Schlegel J, Piontek G, Kersting M, Schuermann M, Kappler R, Scherthan H, Weghorst C, Buzard G, Mennel H. The p16/Cdkn2a/lnk4a gene is frequently deleted in nitrosourea-induced rat glial tumors. *Pathobiology.* 1999 Jul-Aug;67(4):202-6.
- Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science.* 2015 Apr 3;348(6230):69-74.
- Shibao S, Minami N, Koike N, Fukui N, Yoshida K, Saya H, Sampetean O. Metabolic heterogeneity and plasticity of glioma stem cells in a mouse glioblastoma model. *Neuro Oncol.* 2018 Feb 19;20(3):343-354. doi: 10.1093/neuonc/nox170. PMID: 29016888; PMCID: PMC5817950.
- Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010 Jan;119(1):7-35.
- Soomro SH, Ting LR, Qing YY, Ren M. Molecular biology of glioblastoma: Classification and mutational locations. *J Pak Med Assoc.* 2017 Sep;67(9):1410-1414.
- Stavrum AK, Heiland I, Schuster S, Puntervoll P, Ziegler M. Model of tryptophan metabolism, readily scalable using tissue-specific gene expression data. *J Biol Chem.* 2013 Nov 29;288(48):34555-66.
- Strege RJ, Godt C, Stark AM, Hugo HH, Mehdorn HM. Protein expression of Fas, Fas ligand, Bcl-2 and TGFbeta2 and correlation with survival in initial and recurrent human gliomas. *J Neurooncol.* 2004 Mar-Apr;67(1-2):29-39.
- Strickland M, Stoll EA. Metabolic Reprogramming in Glioma. *Front Cell Dev Biol.* 2017 Apr 26;5:43.

- Stupp R, Brada M, van den Bent MJ, Tonn JC, Pentheroudakis G; ESMO Guidelines Working Group. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2014 Sep;25 Suppl 3:iii93-101. doi: 10.1093/annonc/mdu050. Epub 2014 Apr 29.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):987-96. doi: 10.1056/NEJMoa043330.
- Sun S, Du G, Xue J, Ma J, Ge M, Wang H, Tian J. PCC0208009 enhances the anti-tumor effects of temozolomide through direct inhibition and transcriptional regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in glioma models. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2018 Jan-Dec;32:2058738418787991.
- Tao BB, He H, Shi XH, Wang CL, Li WQ, Li B, Dong Y, Hu GH, Hou LJ, Luo C, Chen JX, Chen HR, Yu YH, Sun QF, Lu YC. Up-regulation of USP2a and FASN in gliomas correlates strongly with glioma grade. *J Clin Neurosci*. 2013 May;20(5):717-20. doi: 10.1016/j.jocn.2012.03.050. Epub 2013 Feb 14. PMID: 23416128.
- Tavares RG, Tasca CI, Santos CE, Wajner M, Souza DO, Dutra-Filho CS. Quinolinic acid inhibits glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain. *Neuroreport*. 2000 Feb 7;11(2):249-53.
- Terness P, Bauer TM, Röse L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, Opelz G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *The journal of experimental medicine*. 2002. 196(4): 447-457.
- Tsang YW, Liao CH, Ke CH, Tu CW, Lin CS. Integrated Molecular Characterization to Reveal the Association between Kynurenine 3-Monooxygenase Expression and Tumorigenesis in Human Breast Cancers. *J Pers Med*. 2021 Sep 24;11(10):948.
- U.S. National Institutes of Health. National Library of Medicine. Clinical Trials. 2021. [Consultado el 09/07/2021]. [https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=indoximod&age\\_v=&qndr=&type=&rslt=With&Search=Apply](https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=indoximod&age_v=&qndr=&type=&rslt=With&Search=Apply).
- Ueland PM, McCann A, Midttun Ø, Ulvik A. Inflammation, vitamin B6 and related pathways. *Mol Aspects Med*. 2017 Feb;53:10-27. doi: 10.1016/j.mam.2016.08.001.

- Vazquez S, Aquilina JA, Jamie JF, Sheil MM, Truscott RJ. Novel protein modification by kynurenine in human lenses. *J Biol Chem*. 2002 Feb 15;277(7):4867-73.
- Vázquez Cervantes GI, Pineda B, Ramírez Ortega D, Salazar A, González Esquivel DF, Rembao D, Zavala Vega S, Gómez-Manzo S, Pérez de la Cruz G, Pérez de la Cruz V. Kynurenine Monooxygenase Expression and Activity in Human Astrocytomas. *Cells*. 2021 Aug 8;10(8):2028.
- Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN; Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010 Jan 19;17(1):98-110.
- Vlashi E, Lagadec C, Vergnes L, Matsutani T, Masui K, Poulou M, Popescu R, Della Donna L, Evers P, Dekmezian C, Reue K, Christofk H, Mischel PS, Pajonk F. Metabolic state of glioma stem cells and nontumorigenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Sep 20;108(38):16062-7.
- Wang J, Simonavicius N, Wu X, Swaminath G, Reagan J, Tian H, Ling L. Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. *J Biol Chem*. 2006 Aug 4;281(31):22021-22028.
- Wang Q, Liu D, Song P, Zou MH. Tryptophan-kynurenine pathway is dysregulated in inflammation, and immune activation. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2015 Jun 1;20:1116-43.
- Wang X, Chen Y, Zhang S, Zhang L, Liu X, Zhang L, Li X, Chen D. Co-expression of COX-2 and 5-LO in primary glioblastoma is associated with poor prognosis. *Journal of neuro-oncology*. 2015b. 125(2): 277-85.
- Wainwright DA, Balyasnikova IV, Chang AL, Ahmed AU, Moon KS, Auffinger B, Tobias AL, Han Y, Lesniak MS. IDO expression in brain tumors increases the recruitment of regulatory T cells and negatively impacts survival. *Clin Cancer Res*. 2012 Nov 15;18(22):6110-21.
- Wainwright DA, Chang AL, Dey M, Balyasnikova IV, Kim CK, Tobias A, Cheng Y, Kim JW, Qiao J, Zhang L, Han Y, Lesniak MS. Durable therapeutic efficacy utilizing combinatorial blockade against IDO, CTLA-4, and PD-L1 in mice with brain tumors. *Clin Cancer Res*. 2014 Oct 15;20(20):5290-301.
- Waziri A. Glioblastoma-derived mechanisms of systemic immunosuppression. *Neurosurgery clinics of North America*. 2010. 21(1): 31-42.








- Wolf A, Agnihotri S, Guha A. Targeting metabolic remodeling in glioblastoma multiforme. *Oncotarget*. 2010 Nov;1(7):552-62. doi: 10.18632/oncotarget.190. Erratum in: *Oncotarget*. 2018 Oct 5;9(78):34855.
- Yang W, Zheng Y, Xia Y, Ji H, Chen X, Guo F, Lyssiotis CA, Aldape K, Cantley LC, Lu Z. ERK1/2-dependent phosphorylation and nuclear translocation of PKM2 promotes the Warburg effect. *Nat Cell Biol*. 2012 Dec;14(12):1295-304.
- Ye F, Zhang Y, Liu Y, Yamada K, Tso JL, Menjivar JC, Tian JY, Yong WH, Schae D, Mischel PS, Cloughesy TF, Nelson SF, Liao LM, McBride W, Tso CL. Protective properties of radio-chemoresistant glioblastoma stem cell clones are associated with metabolic adaptation to reduced glucose dependence. *PLoS One*. 2013 Nov 18;8(11):e80397.
- Zhai L, Ladomersky E, Dostal CR, Lauing KL, Swoap K, Billingham LK, Gritsina G, Wu M, McCusker RH, Binder DC, Wainwright DA. Non-tumor cell IDO1 predominantly contributes to enzyme activity and response to CTLA-4/PD-L1 inhibition in mouse glioblastoma. *Brain Behav Immun*. 2017 May;62:24-29.
- Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, Yu W, Li Z, Gong L, Peng Y, Ding J, Lei Q, Guan KL, Xiong Y. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. *Science*. 2009 Apr 10;324(5924):261-5.

Anexo (artículo requisito para la obtención de grado).



Article

# Kynurenine Monoxygenase Expression and Activity in Human Astrocytomas

Gustavo Ignacio Vázquez Cervantes <sup>1,2</sup> , Benjamín Pineda <sup>3</sup> , Daniela Ramírez Ortega <sup>1</sup> , Alelí Salazar <sup>3</sup> ,  
Dinora Fabiola González Esquivel <sup>1</sup> , Daniel Rembao <sup>4</sup>, Sergio Zavala Vega <sup>4</sup>, Saúl Gómez-Manzo <sup>5</sup> ,  
Gonzalo Pérez de la Cruz <sup>6</sup> and Verónica Pérez de la Cruz <sup>1,\*</sup> 

- <sup>1</sup> Neurochemistry and Behavior Laboratory, National Institute of Neurology and Neurosurgery “Manuel Velasco Suárez”, Mexico City 14269, Mexico; guigvace@gmail.com (G.I.V.C.); drnz\_ortega@hotmail.com (D.R.O.); dinora.gonzalez@innn.edu.mx (D.F.G.E.)
- <sup>2</sup> Posgrado en Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado, Edificio A, 1° Piso, Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, Mexico
- <sup>3</sup> Neuroimmunology Department, National Institute of Neurology and Neurosurgery “Manuel Velasco Suárez”, Mexico City 14269, Mexico; benpio76@hotmail.com (B.P.); ajsalazar27@gmail.com (A.S.)
- <sup>4</sup> Neuropathology Department, National Institute of Neurology and Neurosurgery “Manuel Velasco Suárez”, Mexico City 14269, Mexico; jdrbojorquez2002@gmail.com (D.R.); sergio.zavala.vega@gmail.com (S.Z.V.)
- <sup>5</sup> Laboratorio de Bioquímica Genética, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, México City 04530, Mexico; saulmanzo@ciencias.unam.mx
- <sup>6</sup> Department of Mathematics, Faculty of Sciences, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Mexico City 04510, Mexico; gonzalo.perez@ciencias.unam.mx
- \* Correspondence: veped@yahoo.com.mx; Tel.: +52-555-606-3822 (ext. 2006)



**Citation:** Vázquez Cervantes, G.I.; Pineda, B.; Ramírez Ortega, D.; Salazar, A.; González Esquivel, D.F.; Rembao, D.; Zavala Vega, S.; Gómez-Manzo, S.; Pérez de la Cruz, G.; Pérez de la Cruz, V. Kynurenine Monoxygenase Expression and Activity in Human Astrocytomas. *Cells* **2021**, *10*, 2028. <https://doi.org/10.3390/cells10082028>

Academic Editor: Marco G. Paggi

Received: 10 June 2021

Accepted: 5 August 2021

Published: 8 August 2021

**Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and aggressive primary brain tumor. The enzyme indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), which participates in the rate-limiting step of tryptophan catabolism through the kynurenine pathway (KP), is associated with poor prognosis in patients with GBM. The metabolites produced after tryptophan oxidation have immunomodulatory properties that can support the immunosuppressor environment. In this study, mRNA expression, protein expression, and activity of the enzyme kynurenine monoxygenase (KMO) were analyzed in GBM cell lines (A172, LN-18, U87, U373) and patient-derived astrocytoma samples. KMO mRNA expression was assessed by real-time RT-qPCR, KMO protein expression was evaluated by flow cytometry and immunofluorescence, and KMO activity was determined by quantifying 3-hydroxykynurenine by HPLC. Heterogenous patterns of both KMO expression and activity were observed among the GBM cell lines, with the A172 cell line showing the highest KMO expression and activity. Higher KMO mRNA expression was observed in glioma samples than in patients diagnosed with only a neurological disease; high KMO mRNA expression was also observed when using samples from patients with GBM in the TCGA program. The KMO protein expression was localized in GFAP<sup>+</sup> cells in tumor tissue. These results suggest that KMO is a relevant target to be explored in glioma since it might play a role in supporting tumor metabolism and immune suppression.

**Keywords:** tryptophan catabolism; kynurenine monoxygenase; glioblastoma

## 1. Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM) is an astrocyte-derived neoplasm and is the most frequent and aggressive of the primary brain tumors [1,2]. The standard care for GBM consists of surgical resection and radiotherapy plus concomitant chemotherapy with temozolomide, which provides a median overall survival of 18 months. Less than 10% of patients with GBM survive for more than 5 years [2–4], so GBM remains an incurable disease.

Over the past two decades, knowledge about cancer biology has been modeled around the “Hallmarks of Cancer”, a series of intrinsic properties of malignant cells that allow tumor formation [5,6]. Some of these properties allow malignant cells to uncontrollably

proliferate and escape programmed cell death, while others allow malignant cells to modify their microenvironment in their favor, such as modulating the immune response, promoting angiogenesis, and promoting aberrant metabolic activity [5]. These properties could lead to the formation of a heterogeneous landscape not only by malignant cells that differ from each other, depending on their metabolic requirements, but also by the presence of endothelial cells and populations of the innate and adaptive immune system [6,7]. Tumor heterogeneity shaped by genetic and metabolic aberrations as well as by immunoeediting mechanisms confers GBM high resistance to drugs, which leads to poor prognosis for the patient [8]. Therefore, the interconnections between two or more malignant cell hallmarks and the revelation of intercellular associations could offer novel insights into cancer biology, as well as promising targets for therapeutic strategies.

GBM presents metabolic and immune advantages [9–13] that favor the modeling of a heterogeneous tumor landscape, rapid growth rates, and evasion of anti-tumor immune responses [14–17]. One of these mechanisms of recent importance is the high expression of the enzyme indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO). The presence of IDO in GBM tissue is associated with the infiltration of tumor-associated macrophages (TAMs) and regulatory T lymphocytes (Tregs) and with poor prognosis [18,19]. IDO participates in the initial and rate-limiting step of tryptophan catabolism through the kynurenine pathway (KP). N-folmylkynurenine is the cleavage product of tryptophan catabolism by IDO in extrahepatic tissue, which is rapidly converted to kynurenine (KYN) [20]. The catabolite KYN can be taken by kynurenine aminotransferase (KAT), kynureninase (KYNU), and kynurenine monooxygenase (KMO) to produce kynurenic acid (KYNA), anthranilic acid (ANA), and 3-hydroxykynurenine (3-HK), respectively. Then, 3-hydroxyanthranilic acid (3-HANA) is produced and leads to picolinic and quinolinic acid (QUIN) formation. Finally, quinolinic acid phosphoribosyl transferase (QPRT) produces the coenzyme NAD<sup>+</sup> de novo [21]. The KP intermediary products are relevant for central nervous system homeostasis and the regulation of the immune response that may play a role in gliomagenesis [21,22].

Due to the clinical importance of IDO in GBM pathophysiology, studies have searched for pharmacological inhibitors or abrogation of IDO expression [23–26]. The use of the IDO inhibitor 1-methyl-tryptophan is related to tumor growth suppression and alone or in combination with temozolomide favorably affects the survival of glioma experimental models [24,25,27,28]. IDO inhibitors are also under investigation in clinical trials, but until now, there is no information about the results. Another enzyme of KP metabolism involved in many tumors, including malignant gliomas, is tryptophan dioxygenase-2 (TDO2) [29]. TDO2 is constitutively present in the liver and regulates the systemic levels of Trp, leading to KYN formation. A recent study showed that under normoxic conditions, TDO2 is expressed in GBM cells and suppresses T cell proliferation, while under hypoxic conditions, TDO2 expression is reversibly downregulated in GBM cells, restoring T cell proliferation, suggesting an immunomodulatory effect of TDO2 [30]. In accordance with this, KYN is shown to promote the differentiation of regulatory T cells through a mechanism involving AhR [31]. Additionally, 3-HANA and QUIN can inhibit T cell function and induce Th1 cell death [32,33]. However, the relevance of circulating tryptophan catabolites, such as KYN, and the expression of TDO2 and downstream KP enzymes in tumor pathophysiology are unclear.

The importance of KP components in immunosuppression has been demonstrated in other types of cancer; however, their role in malignant glioma cells is unclear. A recent study demonstrated that GBM cell lines can produce metabolites from the two branches of the KP [30]. In accordance with this, KMO leads to the long branch of the KP using KYN as a substrate to produce immunoregulatory tryptophan metabolites related to immune tolerance, such as 3-HK, 3-HANA, and QUIN [34–37]. KMO expression is present in macrophage and monocyte populations as well as in the microglia of the central nervous system (CNS) [38]. In these cells, KMO expression supports mitochondrial metabolism during pro-inflammatory polarization [39–41]. KMO expression remains restricted to microglia and some neuronal populations within the CNS under healthy conditions [42].

However, it has been postulated that the presence of the active KMO branch of the KP could represent an advantage for malignant cells in GBM [43,44]. Therefore, this work aimed to explore KMO expression and activity in different GBM cell lines as well as in tumoral tissue from patients with GBM.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

Kynurenine (L-KYN), 3-hydroxykynurenine (3-HK), NADPH, glucose-6-phosphate (G6P), and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Cyto-Fast Fix/Perm solution was obtained from BioLegend (San Diego, CA, USA). All other chemicals were of the highest commercially available purity. All solutions were prepared using deionized water obtained from a Milli-RQ (Millipore; Burlington, MA, USA) purifier system.

### 2.2. Glioblastoma Cell Lines

GBM cell lines U373, U87, LN18, and A172 (ATCC) were cultured in fresh DMEM (Dulbecco) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% streptomycin at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The main genetic alterations for each cell line are shown in Table 1. For the experiments, the cells were collected and resuspended in Total RNA Isolation Reagent (TRIzol; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for mRNA purification or in 1 × PBS for KMO protein and enzyme activity determination.

**Table 1.** Main genetic alterations of GBM cell lines.

Cell Line	U373	U87	LN18	A172
Main genetic alterations	p53 mutated PTEN mutated NF1 mutated EGFR amplification IDH <sup>wt</sup>	NF1 mutated IDH <sup>wt</sup>	p53 mutated PTEN mutated Chromosome p16 deletion IDH <sup>wt</sup>	p53 mutated PTEN deletion IDH (non-reported)

### 2.3. Tumor Tissue Samples

Tumor samples were obtained from the National Institute of Neurology and Neurosurgery tumor bank (Mexico City, Mexico). The patients were diagnosed with different grades of astrocytoma without previous treatment and had enrolled for their first tumor resection between 2013 and 2014. Tumor samples kept in TRIzol were used for mRNA extraction and PCR, while samples kept in liquid N<sub>2</sub> (freezing) were used to determine KMO activity. For immunofluorescence staining, paraffin-preserved tissue blocks from the same patients were obtained from the Department of Pathology of the National Institute of Neurology and Neurosurgery. A blinded expert pathologist determined the tumor grade. Data of the age, gender, overall survival (OS), and post-surgery treatment of each patient were obtained from the institute's clinical files and are summarized in Results section.

### 2.4. KMO mRNA Expression

Total RNA was obtained from  $1.5 \times 10^7$  cells from TRIzol-conserved cell lines and patient samples according to the manufacturer's specifications. Briefly, after phenol/chloroform separation, cold isopropanol was used for RNA precipitation. Samples were dried at room temperature and dissolved in pyrogen-free distilled water. cDNA was obtained using the First Strand cDNA Synthesis System for quantitative RT-PCR (RT-qPCR) (NP100042; OriGene, Rockville, MD, USA) according to the manufacturer's specifications. The cDNA was kept at −20 °C before real-time qRT-PCR. The SensiFAST SYBR Master Mix Kit (QP100016; OriGene) was used for RT-qPCR-based determination of KMO expression according to the manufacturer's instructions. The KMO Human qPCR Primer Pair (HP 207154; OriGene) and GAPDH Human qPCR Primer Pair (HP205798; OriGene) were used, and their sequences are listed in Table 2. GAPDH was used as a housekeeping gene. A peripheral

blood mononuclear-cell-derived DNA standard curve was used to quantify the mRNA copy number from the samples; data were expressed as the KMO mRNA copy number.

**Table 2.** Forward and reverse sequences of KMO and GAPDH primer pairs used for quantitative real-time RT-qPCR.

Primer Pair	Sequence
KMO human	Forward: CGGATGCCATCCCTCTAATTGG Reverse: TGCATCTCCCAGCAGTACACAG
GAPDH human	Forward: GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG Reverse: ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

### 2.5. KMO Protein Expression

Cells were washed with  $1 \times$  PBS, incubated with trypsin/EDTA solution, and then collected and permeabilized with  $1 \times$  Cyto-Fast Fix/Perm solution for 30 min. Next, the cells were washed with  $1 \times$  PBS, centrifuged at 2000 rpm for 5 min, and incubated with anti-KMO-middle region primary antibody (OAAB05255; Aviva, San Diego, CA, USA) for 30 min. After incubation, the cells were washed and centrifuged again, goat anti-rabbit IgG/Alexa 488 antibody (A11008; Invitrogen; Waltham, MA, USA) was added, and 10,000 total events were acquired. Finally, the KMO-positive mark, green fluorescence, was determined using a FACSCalibur flow cytometer and CellQuestPro software (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA).

### 2.6. KMO Activity

KMO activity was measured in GBM cell lines (U87, U373, LN18, and A172) as well as in tumor tissue homogenates. Briefly,  $2 \times 10^6$  cells or 150  $\mu$ L of homogenized tissues were diluted in 450  $\mu$ L of KMO buffer (100 mM TRIS, 10 mM KCl, and 1 mM EDTA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Then, 80  $\mu$ L of the mixture was incubated with 100  $\mu$ L of assay cocktail (1 mM NADPH, 3 mM G6P, 1 U/mL of G6PDH, and 100  $\mu$ M KYN) in a final volume of 200  $\mu$ L at 37  $^{\circ}$ C for 2 h. The reaction was stopped with 25  $\mu$ L of 6% perchloric acid. Blanks were obtained by boiling the samples for 10 min. The samples were centrifuged at  $14,000 \times g$  for 10 min. The samples were collected, and 3-HK was determined by HPLC using an electrochemical method [45]. Briefly, 100  $\mu$ L of the supernatant was eluted at a constant flow rate of 0.5 mL/min with a mobile phase (0.59% phosphoric acid, 1.5% acetonitrile, 0.9% triethylamine, 0.27 mM EDTA, and 8.9 mM sodium heptane sulphonic acid) through an Adsorbosphere Catecholamine C18 reverse-phase column (3  $\mu$ m, 4.6 mm  $\times$  100 mm; Thermo Fisher Scientific, Hampton, NH, USA). The oxidation voltage was 0.5 V at a range of 1.0 nA and a filter of 0.10 Hz (LC-4C detector; BAS). The retention time was  $\sim$ 11 min. The results are shown as pmoles of 3-HK/h/mg of protein.

### 2.7. Immunofluorescence Staining

For all cell lines,  $3 \times 10^4$  cells were seeded in 8-well slides in fresh culture medium and left overnight. Then, the cells were fixed in 100% methanol for 5 min. For the glioma tissue block, 5- $\mu$ m-thick sections were cut, submerged in sodium citrate buffer (10 mM sodium citrate, 0.05% Tween 20, pH 6.0), and incubated in boiling water for 5 min for antigen retrieval. The sections were washed with  $1 \times$  PBS and blocked for 30 min with 1% bovine serum albumin. After blocking, the sections were incubated with rabbit anti-KMO-middle region primary antibody (OAAB05255; Aviva, San Diego, CA, USA) for 30 min, washed, and incubated with mouse anti-rabbit IgG/Alexa Fluor 488 antibody (A11008; Invitrogen) for 30 min. The mouse anti-GFAP/PE primary antibody (sc-33673; BioLegend) was used to label astrocytic malignant cells. Images of the sections were obtained at  $40 \times$  magnification using an OLYMPUS 1X81 microscope.

### 2.8. Protein Determination

Protein was determined according to Lowry's method [46] using bovine serum albumin as a standard.

### 2.9. Statistics

Data of KMO activity were corrected by mg of protein. Results were expressed as the mean  $\pm$  SEM. The Mann–Whitney test was performed to compare distributions of control and glioma groups using Prism software (GraphPad, San Diego, CA, USA).  $p$ -values  $< 0.05$  were considered statistically significant. Survival time in each group was calculated using the Kaplan–Meier method and compared using the Mantel–Cox test.

### 2.10. Genomic Expression Analysis

The data were based on a combined cohort of the Cancer Genomic Atlas (TCGA) and the Genotype-Tissue Expression (GTEx) samples available on the Xena platform [47] and used in GEPIA2 [48]. The analysis included 207 brain cortex (non-diseased), 523 low-grade glioma, and 171 GBM samples. Expression values were plotted using Prism v 9.1.2 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Differences in gene expression levels between the groups were evaluated using the Kruskal–Wallis test, with Dunn's test for pairwise comparisons. A  $p$ -value  $< 0.001$  was considered statistically significant. Kaplan–Meier plots were used for survival analysis using the data from the GBM group; the patients were divided into two groups based on the median of KMO expression, and the log-rank test was performed to compare between the groups.

## 3. Results

### 3.1. Expression and Activity of Kynurenine Monooxygenase in Glioblastoma Cell Lines

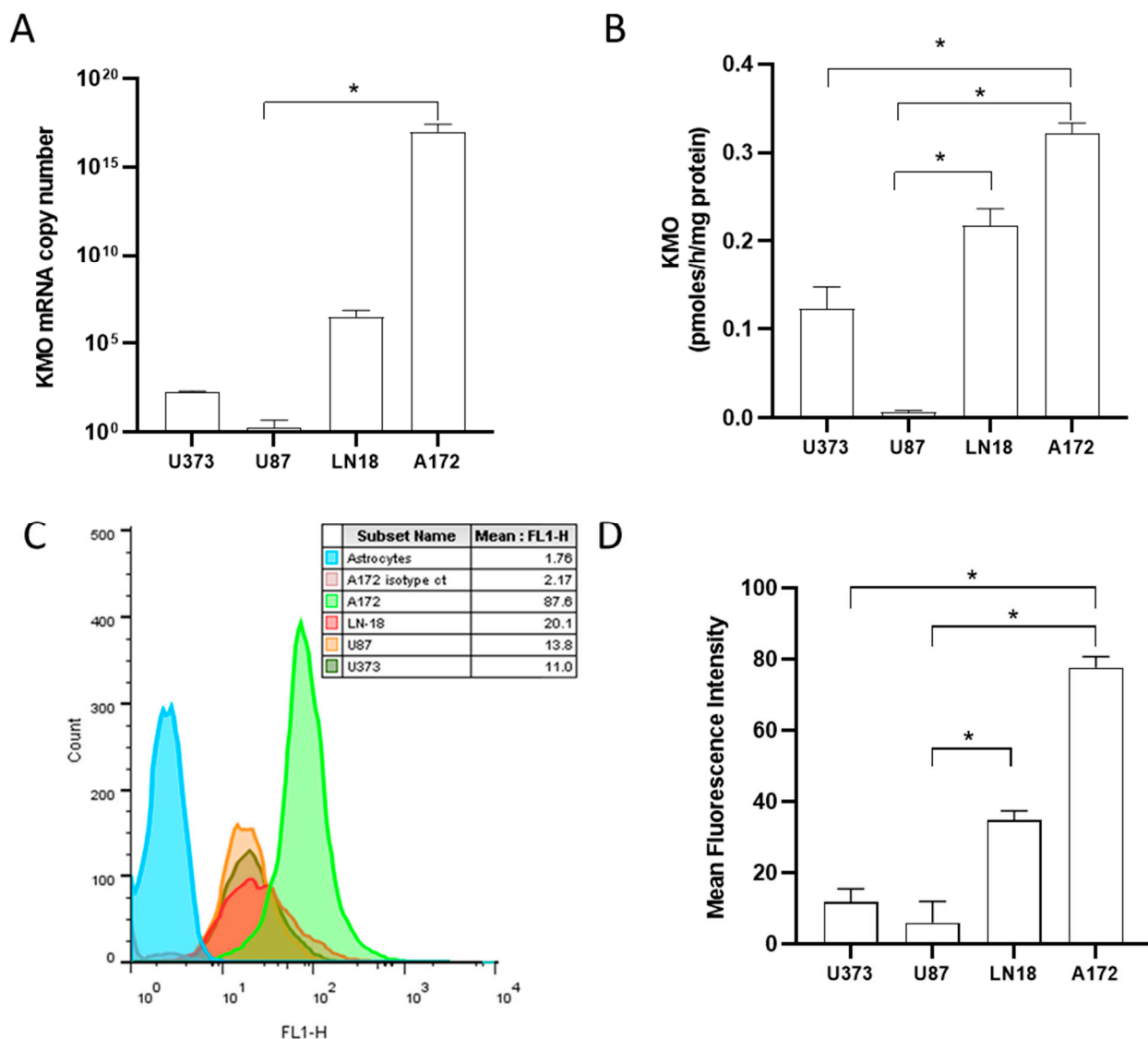
KMO leads to the KP branch that drives  $\text{NAD}^+$  formation, and KMO expression could represent a selective advantage for malignant cells. Thus, we quantified the KMO mRNA expression using real-time RT-qPCR in U87, U373, LN18, and A172 GBM cell lines. We found heterogeneous expression levels among the different cell lines, with A172 cells showing the highest KMO mRNA expression (Figure 1A). KMO protein expression among the different cell lines was different, with A172 cells again exhibiting the highest expression (Figure 1C,D). In addition to KMO mRNA and protein expression, KMO activity was analyzed in the cell lines. Figure 1B shows that all GBM cell lines exhibited KMO activity, with A172 cells showing the highest activity ( $0.322 \pm 0.01$  pmoles/h/mg protein), followed by LN18 and U373 cells. The U87 cell line showed less than 0.1 pmoles/h/mg protein expression, which, compared to KMO activity in peripheral blood mononuclear cells ( $2.9 \pm 0.3$  pmoles/h/mg protein), is low.

Furthermore, KMO protein expression was observed by immunofluorescence. Figure 2 shows that KMO protein was expressed in A172, LN18, and U373 cells, with A172 cells expressing more KMO protein than the other cell lines, which corresponds to the results in Figure 1D. Our results on GBM cell lines demonstrate that KMO is expressed and active in GBM malignant cells, but both mRNA and protein expression as well as KMO activity differ among the GBM cell lines.

### 3.2. Kynurenine Monooxygenase Expression in the GBM Tumor Mass

The next step was to quantify the KMO mRNA expression, KMO mRNA protein, and KMO activity in GBM tumor tissue. Tissue samples from patients (National Institute of Neurology and Neurosurgery, Mexico City, Mexico) diagnosed with neurological diseases ( $n = 6$ ), non-astrocytic brain tumors ( $n = 1$ ), diffuse astrocytoma ( $n = 2$ ), and high-grade astrocytoma ( $n = 7$ ) were analyzed. The clinical and demographic data of these patients are summarized in Table 3.





**Figure 1.** Kynurenine monoxygenase expression and activity in GBM cell lines. Quantification of KMO mRNA copies (A) and KMO activity (B) in GBM cell lines A172, LN-18, U87, and U373. Representative histogram (C) and KMO protein expression in GBM cell lines (D). Data in (A,B,D) are the mean  $\pm$  SEM ( $n = 3-5$ ); \*  $p < 0.05$  based on the Kruskal–Wallis test, with Dunn’s test for pairwise comparisons.

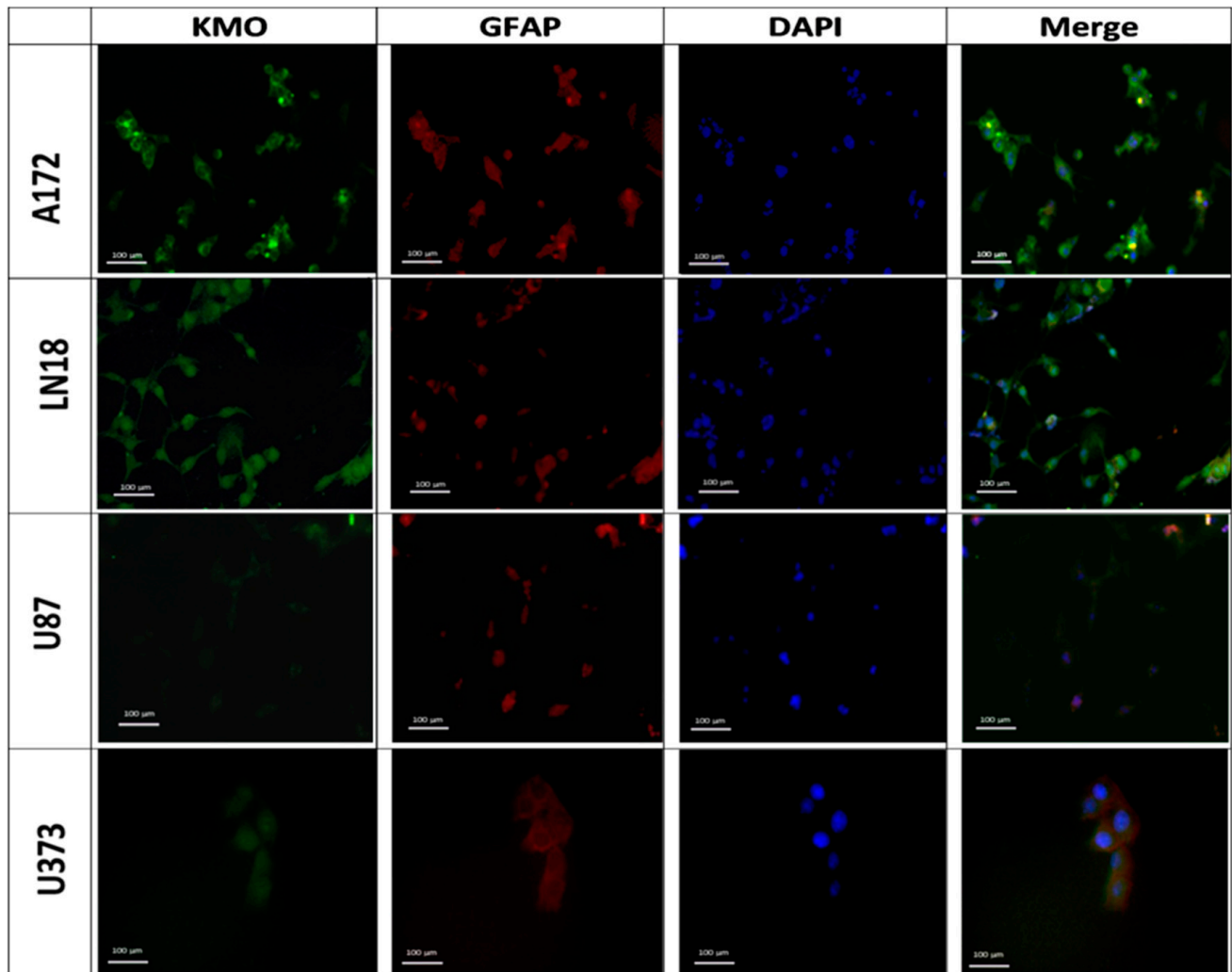
The KMO mRNA expression in tissue samples from patients with neurological diseases was significantly lower compared with patients with astrocytoma ( $0.13 \times 10^6 \pm 0.086 \times 10^6$  vs.  $140.9 \times 10^6 \pm 137.4 \times 10^6$ ;  $p = 0.03$ ; Figure 3A). However, no difference was observed in 3-HK levels (a product of KMO activity) between patients with neurological diseases and those with astrocytoma (Figure 3B).

To ensure that the KMO mRNA expression and KMO activity in tumor tissue were due to the presence of KMO in malignant cells, KMO protein localization was determined by immunofluorescence staining (Figure 4, second column) in paraffin-embedded samples from the same patients analyzed by real-time RT-qPCR for KMO activity. Images of H/E-stained sections of tumor tissue were obtained to corroborate tissue architecture (Figure 4, first column). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunofluorescence was used as an astrocytic lineage marker (Figure 4, third column). Tissue derived from a patient diagnosed with mesial sclerosis was used as a non-tumor tissue control, while that derived from a patient diagnosed with brain metastasis from thyroid carcinoma was used as a non-astrocytic tumor tissue. The mesial sclerosis sample showed KMO staining,

where, in a few cases, GFAP<sup>+</sup> cells were found (Figure 4, line 1). The thyroid carcinoma metastasis tissue did not show KMO and GFAP immunostaining (Figure 4, line 2). However, the astrocytoma tissue mainly localized KMO and GFAP in the same cells; furthermore, on some astrocytoma slides, KMO immunofluorescence was found unrelated to GFAP marking, suggesting a contribution to KMO expression in tumor-infiltrated cells (Figure 4, lines 3–10).

Cells 2021, 10, x FOR PEER REVIEW

7 of 15



**Figure 2.** Kynurenine monoxygenase expression in GBM cell lines. Representative images of KMO protein expression in GBM cell lines A172, LN-18, U87, and U373. Images were acquired at 40× magnification. Scale bars represent 100 μm.

Additionally, we evaluated whether KMO mRNA expression could be an indicator of prognosis. The astrocytoma group was further divided into two groups, low KMO and high KMO, using the median KMO mRNA copy number. The survival time was considered an indicator of prognosis and compared between these two groups. However, no difference was observed (data not shown).

**3.2. Kynurenine Monoxygenase Expression in the GBM Tumor Mass**

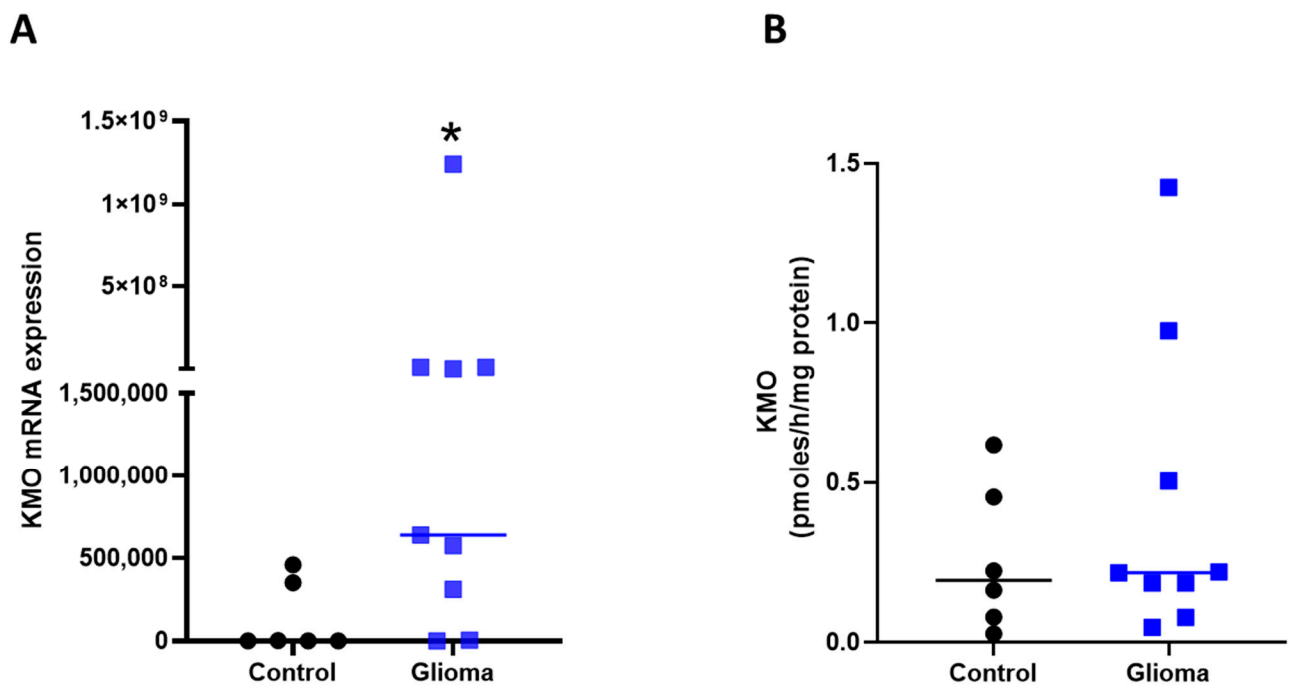
Tissue samples from patients (National Institute of Neurology and Neurosurgery, Mexico City, Mexico) diagnosed with neurological diseases ( $n = 6$ ), non-astrocytic brain tumors ( $n = 1$ ), diffuse astrocytoma ( $n = 2$ ), and high grade astrocytoma ( $n = 7$ ) were analyzed. The clinical and demographic data of these patients are summarized in Table 3.

**Table 3.** Clinical and demographic features of patients.

	Neurological Disease	Non-Astrocytic Brain Tumor	Low-Grade Astrocytoma (Grade I/II)	High-Grade Astrocytoma (Grade III/IV)
n	6	1	2	7
Diagnosis	Mesial sclerosis (16%) Schizophrenia (16%)	Metastasis from thyroid carcinoma	Diffuse astrocytoma (100%)	Anaplastic astrocytoma (14%) Glioblastoma multiforme

**Table 3.** Clinical and demographic features of patients.

	Neurological Disease	Non-Astrocytic Brain Tumor	Low-Grade Astrocytoma (Grade I/II)	High-Grade Astrocytoma (Grade III/IV)
<i>n</i>	6	1	2	7
Diagnosis	Mesial sclerosis (16%) Schizophrenia (16%) Facial paralysis (16%) Epilepsy (50%)	Metastasis from thyroid carcinoma (100%)	Diffuse astrocytoma (100%)	Anaplastic astrocytoma (14%) Glioblastoma multiforme (86%)
Sex (Men%/Women%)	50/50	0/100	0/100	43/57
Age (years) Mean ± SD Min.–Max.	The KMO mRNA expression in tissue samples from patients with neurological diseases was significantly lower compared with patients with astrocytoma ( $0.13 \times 10^6 \pm 0.086 \times 10^6$ vs. $140.9 \times 10^6 \pm 137.4 \times 10^6$ ; $p = 0.03$ , Figure 3A). However, no difference was observed in 3-HK levels (a product of KMO activity) between patients with neurological diseases and those with astrocytoma (Figure 3B).			
Survival (days) Median	242		1298	137

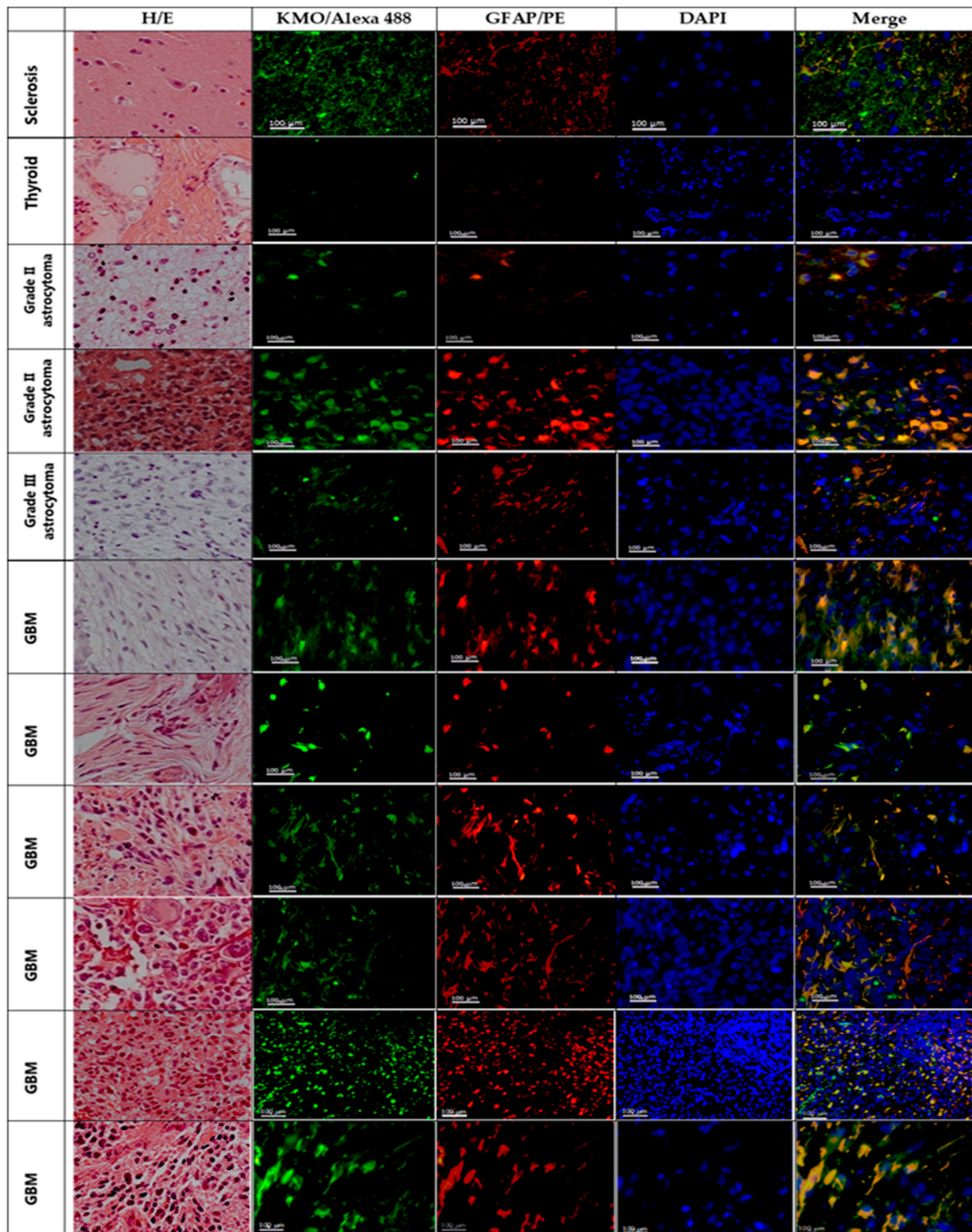


**Figure 3.** KMO mRNA expression in GBM tissue. (A) KMO mRNA copy number in tissue samples: patients diagnosed with a neurological disease (control,  $n = 6$ ) versus patients diagnosed with grade III to IV astrocytoma (glioma,  $n = 9$ ). (B) Determination of KMO activity by quantification of 3-HK levels. A incubation of the same samples plus or minus KMO expression. Data are shown with the median (horizontal line);  $p < 0.05$  based on the Mann-Whitney test.

In addition, the KMO mRNA expression (data KMO, GFAP and GFAP) were analyzed in the Figure 5. KMOs that all of the KMO, KMO and GFAP were expressed in low-grade glioma and GBM, confirming our KMO experimental results. Furthermore, the KMO expression in the GBM samples appeared to be related to the long survival of the KP, which leads to QJIN and NAD<sup>+</sup> production (Figure 5D,E). The GBM patients were further divided into two groups: low KMO and high KMO (according to the median KMO expression). The Kaplan–Meier plot and the log-rank test were used to assess the prognosis in these groups (Figure 5F). Results indicated that high KMO expression is associated with lower survival in patients with GBM. A non-astrocytic tumor tissue control, while that derived from a patient diagnosed with brain metastasis from thyroid carcinoma was used as a non-astrocytic tumor tissue. The mesial sclerosis sample showed KMO staining, where, in a few cases, GFAP<sup>+</sup> cells were found (Figure 4, line 1). The thyroid carcinoma metastasis tissue did not show KMO and GFAP immunostaining (Figure 4, line 2). However, the astrocytoma tissue mainly localized KMO and GFAP in the same cells; furthermore, on some astrocytoma slides, KMO immunofluorescence was found unrelated to GFAP marking, suggesting a contribution to KMO expression in tumor-infiltrated cells (Figure 4, lines 3–10).

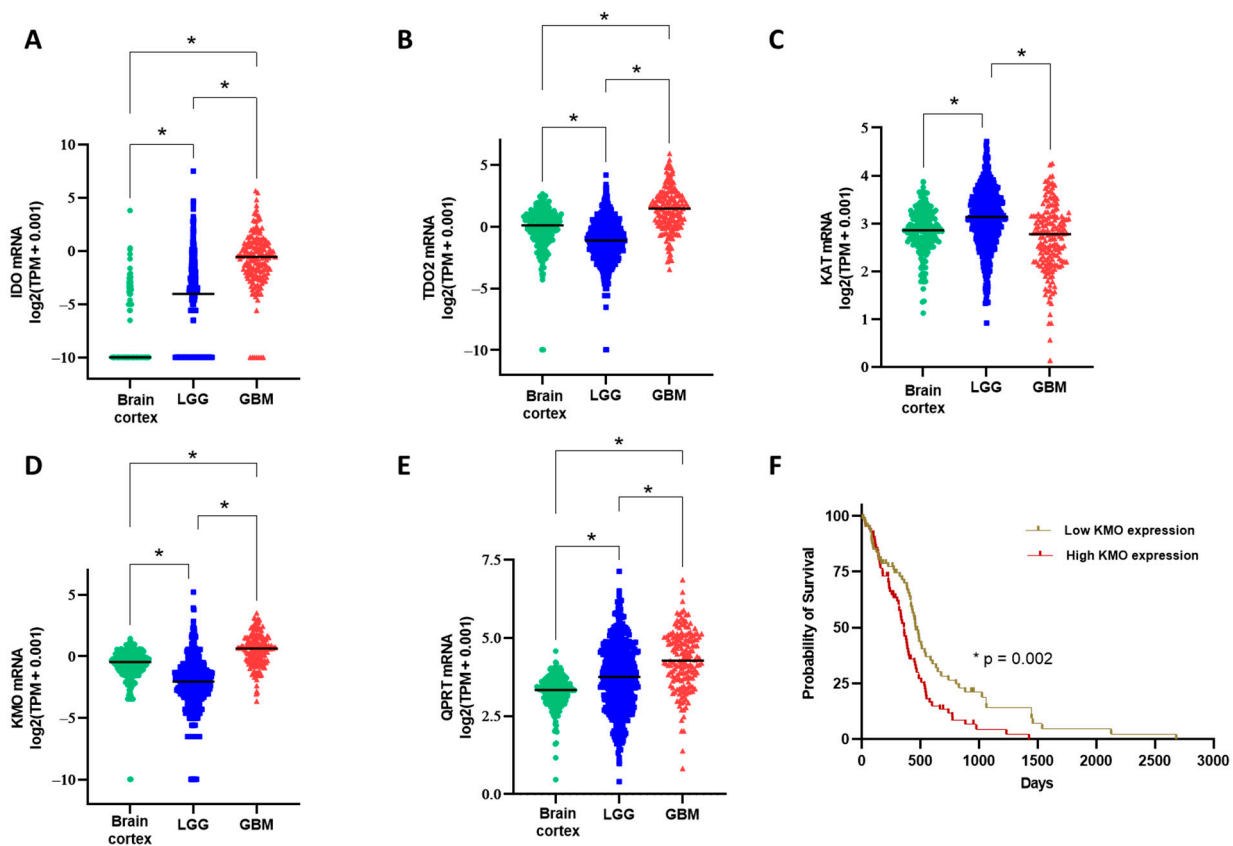
Additionally, we evaluated whether KMO mRNA expression could be an indicator of prognosis. The astrocytoma group was further divided into two groups: low KMO and





**Figure 4.** KMO in astrocytoma malignant cells. Representative images of hematoxylin/eosin (H/E) staining and immunofluorescence staining for KMO (KMO/Alexa Fluor 488; green), astrocytes or astrocytoma cells (GFAP/PE; red), and nuclei (DAPI; blue) in tissue samples from patients diagnosed with mesial sclerosis (line 1), thyroid carcinoma (line 2), and astrocytoma (lines 3–10). Images were acquired at 40× magnification. Scale bars represent 100 µm.

Furthermore, the KP enzyme expression in the GBM samples appeared to favor the long arm of the KP, which leads to QUIN and NAD<sup>+</sup> production (Figure 5D,E). The GBM patients were further divided into two groups, low KMO and high KMO, according to the median KMO expression. The Kaplan–Meier plot and the log-rank test were used to assess the prognosis in these groups (Figure 5F). Results indicated that high KMO expression is associated with lower survival in patients with GBM.



**Figure 5.** Comparison of gene expression levels (transcripts per million, TPM) on KP enzymes among three groups: brain cortex (non-diseased, CITE project), low-grade glioma (TCGA program), and GBM (TCGA program). (A–E) mRNA expression of indoleamine dioxygenase (IDO), tryptophan dioxygenase (TDO), kynurenine aminotransferase II (KAT2), kynurenine monooxygenase (KMO), and quinoline acid phosphoribosyl transferase (QPRT). \* $p < 0.001$  based on the Kruskal–Wallis test, with Dunn’s test for pairwise comparisons. (F) Kaplan–Meier plot using the data from the GBM group; patients were divided into two groups based on the median KMO expression, and the  $p$ -value is based on the log-rank test.

#### 4. Discussion

Tryptophan catabolism through the KP in different kinds of cancers is receiving increasing attention because of its capacity to modulate the tumor immune environment. Specifically, IDO expression is related to GBM, but the rest of the KP in this pathology is still unclear. The relevance of the KP in GBM is related to the fact that kynurenine, the oxidation product of tryptophan, predominantly crosses the blood–brain barrier and can be degraded by both KP branches in the CNS, leading to immunomodulatory metabolites that can favor an immunosuppressive environment in GBM. This study showed for the first time that KMO, a critical enzyme of the KP, expressed on microglia in the CNS, is expressed and active in astrocytoma (Figure 6). The results showed heterogeneous KMO mRNA expression as well as differential KMO activity and protein expression in GBM cell lines, with A172 cells exhibiting the highest KMO expression and activity. The KMO expression and activity differences between GBM cell lines could be due to the distinct mutations in them (Table 1). It is noteworthy that the U87 cell line that showed the lowest KMO expression and activity did not show the p53 mutation according to the genomic profiles of several GBM cell lines [49]. Moreover, KMO was expressed and active in samples from patients diagnosed with astrocytoma of different grades. Interpatient heterogeneity was observed in this study, where a low/high KMO mRNA expression and activity pattern was found. However, the fact that KMO expression and activity are present in astrocytoma samples could be due to tumor-infiltrating cells, since KMO is highly expressed in immune cells, such as macrophages and monocytes and in CNS microglia [50].

expression and activity differences between GBM cell lines could be due to the distinct mutations in them (Table 1). It is noteworthy that the U87 cell line that showed the lowest KMO expression and activity did not show the p53 mutation according to the genomic profiles of several GBM cell lines [49]. Moreover, KMO was expressed and active in samples from patients diagnosed with astrocytoma of different grades. Interpatient heterogeneity was observed in this study, where a low/high KMO mRNA expression and activity pattern was found. However, the fact that KMO expression and activity are present in astrocytoma samples could be due to tumor-infiltrating cells, since KMO is highly expressed and maintained in cells. KMO showed cytoplasmic and protein is mainly localized to GBM cells [50]. Nevertheless, immunostaining for KMO showed that the protein KMO, but not localized to GFAP+ cells, indicating that tumor cells of the astrocytic lineage express KMO with a heterogeneous way between different tumor samples. These data are in agreement with the data obtained by genetic analysis from ICGA and GTEx programs and from a recent study on patient-derived GBM cell lines that showed high heterogeneity in the expression of enzymes involved in the KP, including KMO [51].

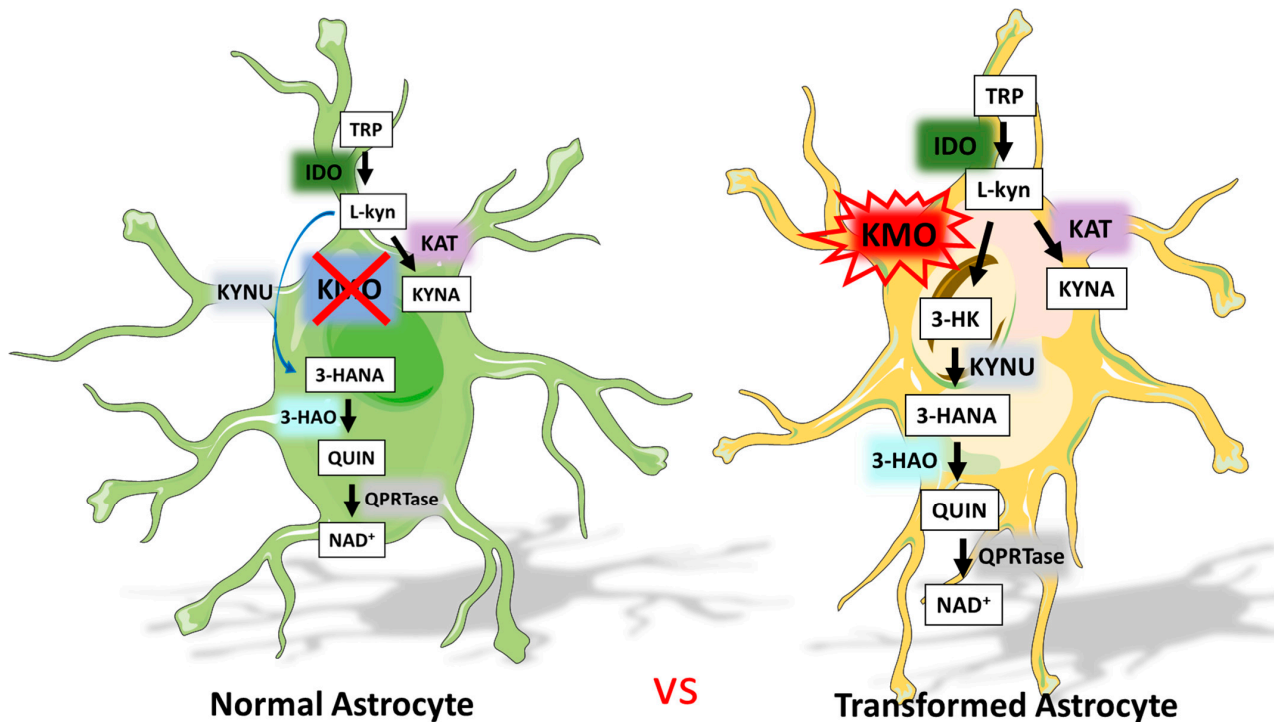


Figure 6. Tryptophan catabolism through the KP in normal astrocytes vs. transformed astrocytes.

These findings of KMO expression and activity in GBM cells represent a novel phenotypic characteristic that makes them different from normal astrocytes, which do not express KMO. In KMO-deficient mice, thymic and splenic atrophy were observed, and mice were unable to produce ILK and KMO and KMO expression was not detected, detected when they were stimulated with cytokines. However, KMO, 3-HAO, QPRTase, and QPRTase and KYNU expressed in human astrocyte cultures, indicating that KMO is the only KP enzyme that is not present in this cell type [52,53]. This change in KMO expression could be a consequence of the de-differentiation process described in glioma models that involves differentiated malignant cells gaining plasticity [54,55]. Furthermore, aberrant protein expression is related to tumorigenesis [56]. Our results are in agreement with a previous study that showed 3-HANA production in A172 cells under normoxic and hypoxic conditions, indicating that GBM malignant cells can produce KP downstream metabolites through KMO [30]. A recent study demonstrated that KMO is located in the cell membranes of canine mammary gland tumors as well as in human breast cancer samples. Furthermore, blocking the KMO surface with a KMO polyclonal antibody reduces migration and invasion of MDA-MB-231 cells [57]. Additionally, inhibition of KMO activity represses colorectal cancer cell migration, invasion, and tumor sphere formation [58].

There are three main hypotheses with regard to the relevance of active tryptophan catabolism through the KP in the tumor microenvironment [59]: first, overexpression of active IDO from malignant cells may deplete the tryptophan pool, thus inhibiting lymphocyte proliferation and abrogating the anti-tumor immune response [34]; second, active KP metabolism could favor the formation of tryptophan derivatives that inhibit the proliferation of cytotoxic lymphocytes and induce their death [35,36]; and third, the KP can



lead to the constant formation of NAD<sup>+</sup>, a coenzyme involved in metabolic and signaling pathways, contributing to the suitability of malignant cells [60]. In accordance with this, KMO is the pivotal enzyme in the KP that leads to NAD<sup>+</sup> synthesis [61] and is related to poor prognosis in several cancers [58,62–64].

Our results support the heterogeneity of the KP within the GBM landscape; furthermore, in the cell lines tested, KMO is enzymatically active, and thus, tryptophan catabolism in GBM cells could lead to the formation of both KP metabolite immunoregulators and NAD<sup>+</sup>. Further analysis of the expression of enzymes such as QPRTase in GBM malignant cells will complement the findings of this study. The constant NAD<sup>+</sup> synthesis in GBM cells supports the high metabolic and proliferative demand inherent in these tumors [65]. However, the differences in KMO expression and activity between the different GBM cell lines are also a reflection of the high heterogeneity of the GBM landscape [66]. Moreover, the presence of KMO activity in GBM cell lines could support the formation and accumulation of tryptophan catabolites, which have been described as toxic to immune populations, such as NK cells and T and B lymphocytes, since reports suggest that KP products 3-HK, 3-HANA, and QUIN decrease proliferation and increase apoptosis in these immune populations. Thus, the importance of KMO in GBM cells supports two of the main characteristics of the tumor microenvironment, namely metabolic activity and immune response modulation, making this enzyme a promising target for further study on GBM.

KMO expression in other types of cancer has also been explored. In this study, KMO mRNA expression did not affect patient survival, which could be due to the population size. However, KMO overexpression is related to malignancy and poor prognosis in patients with triple-negative breast cancer and colorectal cancer [58,62]. Furthermore, the oncogenic activity of KMO favors the potentiation of  $\beta$ -catenin signaling in an enzyme-activity-independent manner, indicating the role of KMO beyond 3-HK production [62]. KMO overexpression is also related to malignancy and poor prognosis in canine mammary gland tumors and melanomas. These studies show that KMO overexpression is parallel to signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and pSTAT3 increase, which are related to the proliferation, survival, invasiveness, malignancy, and metastasis of tumor cells. In vitro pharmacological inhibition of KMO reduces tumor cell viability and STAT3 and pSTAT3 expression, confirming an oncogenic role of KMO outside of its catabolic activity [63,64]. In contrast, KMO expression increases in patients with advanced melanoma who show clinical benefit after PD-1 blockade therapy compared with PD-1-blockade-unresponsive patients [67]; however, the implications of KMO increase in these patients have not been discussed. Furthermore, the regulation of KMO expression could be crucial for the treatment of GBM, since in GBM cell cultures, KMO expression is upregulated after incubation with temozolomide but downregulated after incubation with the cyclin dependent kinase inhibitor, dinaciclib [51]. Nevertheless, the biological function of KMO in immunomodulation in glioblastoma and other cancers, as well as the association between KMO expression and the GBM genomic profile, should be clarified.

## 5. Conclusions

This study showed for the first time that KMO expression and activity are present in glioma cells. Assessing the importance of KMO in GBM and other cancers represents a novel field for understanding tumor cell biology with promising results. More information is needed to understand how KMO works in malignant cells as well as other types of cells that form a tumor mass. Therefore, future studies should focus on the dynamics of KP metabolism within CNS and immune cells.

**Author Contributions:** Conceptualization, V.P.d.I.C. and B.P.; methodology, V.P.d.I.C., B.P., G.P.d.I.C. and G.I.V.C.; validation, D.R.O., G.I.V.C., D.F.G.E. and A.S.; formal analysis, G.I.V.C., D.R.O., S.G.-M., S.Z.V., D.R. and G.P.d.I.C.; investigation, G.I.V.C., V.P.d.I.C., B.P., D.F.G.E.; resources, D.R., B.P., V.P.d.I.C.; writing—original draft preparation, G.I.V.C., V.P.d.I.C.; writing—review and editing, G.I.V.C., B.P., D.F.G.E., A.S., D.R.O., S.G.-M., S.Z.V., D.R., V.P.d.I.C. and G.P.d.I.C.; funding acquisition, B.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Consejo de Investigación sobre Salud y Cerveza de México, A. C. Fomento a la Investigación 2019 (grant no. 110-19).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board of the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (protocol 127/17 and approval date 3 February 2018).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available upon request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** This study was performed in partial fulfillment of the requirements of G.I.V.C. in the field of experimental biology in the Posgrado en Ciencias Biológicas at the Universidad Nacional Autónoma de México. G.I.V.C. is a scholarship holder of the CONACyT-México (308052) in the Graduate Program in Biological Science, UNAM.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Hou, L.C.; Veeravagu, A.; Hsu, A.R.; Tse, V.C. Recurrent glioblastoma multiforme: A review of natural history and management options. *Neurosurg. Focus* **2006**, *20*, E5. [[CrossRef](#)]
- Chamberlain, M.C. Treatment options for glioblastoma. *Neurosurg. Focus* **2006**, *20*, E19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Stupp, R.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M.J.; Belanger, K.; Brandes, A.A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 987–996. [[CrossRef](#)]
- Stupp, R.; Hegi, M.E.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Taphoorn, M.J.; Janzer, R.C.; Ludwin, S.K.; Allgeier, A.; Fisher, B.; Belanger, K.; et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* **2009**, *10*, 459–466. [[CrossRef](#)]
- Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)]
- Fouad, Y.A.; Aanei, C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am. J. Cancer Res.* **2017**, *7*, 1016–1036. [[PubMed](#)]
- Torrisi, F.; Vicario, N.; Spitale, F.M.; Cammarata, F.P.; Minafra, L.; Salvatorelli, L.; Russo, G.; Cuttone, G.; Valable, S.; Gulino, R.; et al. The Role of Hypoxia and SRC Tyrosine Kinase in Glioblastoma Invasiveness and Radioresistance. *Cancers* **2020**, *12*, 2860. [[CrossRef](#)]
- Dymova, M.A.; Kuligina, E.V.; Richter, V.A. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Glioblastoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Strickland, M.; Stoll, E.A. Metabolic Reprogramming in Glioma. *Front. Cell Dev. Biol.* **2017**, *5*, 43. [[CrossRef](#)]
- Hjelmeland, A.B.; Lathia, J.D.; Sathornsumetee, S.; Rich, J.N. Twisted tango: Brain tumor neurovascular interactions. *Nat. Neurosci.* **2011**, *14*, 1375–1381. [[CrossRef](#)]
- Vander Heiden, M.G.; Cantley, L.C.; Thompson, C.B. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **2009**, *324*, 1029–1033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Waziri, A. Glioblastoma-derived mechanisms of systemic immunosuppression. *Neurosurg. Clin. N. Am.* **2010**, *21*, 31–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Perng, P.; Lim, M. Immunosuppressive Mechanisms of Malignant Gliomas: Parallels at Non-CNS Sites. *Front. Oncol.* **2015**, *5*, 153. [[CrossRef](#)]
- Broekman, M.L.; Maas, S.L.N.; Abels, E.R.; Mempel, T.R.; Krichevsky, A.M.; Breakefield, X.O. Multidimensional communication in the microenvirons of glioblastoma. *Nat. Rev. Neurol.* **2018**, *14*, 482–495. [[CrossRef](#)]
- Giering, A.; Pszczolkowska, D.; Walentynowicz, K.A.; Rajan, W.D.; Kaminska, B. Immune microenvironment of gliomas. *Lab. Investig.* **2017**, *97*, 498–518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Vander Heiden, M.G.; Locasale, J.W.; Swanson, K.D.; Sharfi, H.; Heffron, G.J.; Amador-Noguez, D.; Christofk, H.R.; Wagner, G.; Rabinowitz, J.D.; Asara, J.M.; et al. Evidence for an alternative glycolytic pathway in rapidly proliferating cells. *Science* **2010**, *329*, 1492–1499. [[CrossRef](#)]
- Saga, I.; Shibao, S.; Okubo, J.; Osuka, S.; Kobayashi, Y.; Yamada, S.; Fujita, S.; Urakami, K.; Kusuhara, M.; Yoshida, K.; et al. Integrated analysis identifies different metabolic signatures for tumor-initiating cells in a murine glioblastoma model. *Neuro. Oncol.* **2014**, *16*, 1048–1056. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wainwright, D.A.; Balyasnikova, I.V.; Chang, A.L.; Ahmed, A.U.; Moon, K.S.; Auffinger, B.; Tobias, A.L.; Han, Y.; Lesniak, M.S. IDO expression in brain tumors increases the recruitment of regulatory T cells and negatively impacts survival. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 6110–6121. [[CrossRef](#)]

19. Rahimi Koshkaki, H.; Minasi, S.; Ugolini, A.; Trevisi, G.; Napoletano, C.; Zizzari, I.G.; Gessi, M.; Giangaspero, F.; Mangiola, A.; Nuti, M.; et al. Immunohistochemical Characterization of Immune Infiltrate in Tumor Microenvironment of Glioblastoma. *J. Pers. Med.* **2020**, *10*, 112. [[CrossRef](#)]
20. Badawy, A.A. Tryptophan availability for kynurenine pathway metabolism across the life span: Control mechanisms and focus on aging, exercise, diet and nutritional supplements. *Neuropharmacology* **2017**, *112*, 248–263. [[CrossRef](#)]
21. Gonzalez Esquivel, D.; Ramirez-Ortega, D.; Pineda, B.; Castro, N.; Rios, C.; Perez de la Cruz, V. Kynurenine pathway metabolites and enzymes involved in redox reactions. *Neuropharmacology* **2017**, *112*, 331–345. [[CrossRef](#)]
22. Kesarwani, P.; Kant, S.; Prabhu, A.; Chinnaiyan, P. The interplay between metabolic remodeling and immune regulation in glioblastoma. *Neuro. Oncol.* **2017**, *19*, 1308–1315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ahlstedt, J.; Konradsson, E.; Ceberg, C.; Redebrandt, H.N. Increased effect of two-fraction radiotherapy in conjunction with IDO1 inhibition in experimental glioblastoma. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0233617. [[CrossRef](#)]
24. Hanihara, M.; Kawataki, T.; Oh-Oka, K.; Mitsuka, K.; Nakao, A.; Kinouchi, H. Synergistic antitumor effect with indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition and temozolomide in a murine glioma model. *J. Neurosurg.* **2016**, *124*, 1594–1601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Wainwright, D.A.; Chang, A.L.; Dey, M.; Balyasnikova, I.V.; Kim, C.K.; Tobias, A.; Cheng, Y.; Kim, J.W.; Qiao, J.; Zhang, L.; et al. Durable therapeutic efficacy utilizing combinatorial blockade against IDO, CTLA-4, and PD-L1 in mice with brain tumors. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 5290–5301. [[CrossRef](#)]
26. Zadori, D.; Veres, G.; Szalardy, L.; Klivenyi, P.; Fulop, F.; Toldi, J.; Vecsei, L. Inhibitors of the kynurenine pathway as neurotherapeutics: A patent review (2012–2015). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2016**, *26*, 815–832. [[CrossRef](#)]
27. Miyazaki, T.; Moritake, K.; Yamada, K.; Hara, N.; Osago, H.; Shibata, T.; Akiyama, Y.; Tsuchiya, M. Indoleamine 2,3-dioxygenase as a new target for malignant glioma therapy. Laboratory investigation. *J. Neurosurg.* **2009**, *111*, 230–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Li, M.; Bolduc, A.R.; Hoda, M.N.; Gamble, D.N.; Dolisca, S.B.; Bolduc, A.K.; Hoang, K.; Ashley, C.; McCall, D.; Rojiani, A.M.; et al. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway controls complement-dependent enhancement of chemo-radiation therapy against murine glioblastoma. *J. Immunother. Cancer* **2014**, *2*, 21. [[CrossRef](#)]
29. Kudo, T.; Prentzell, M.T.; Mohapatra, S.R.; Sahm, F.; Zhao, Z.; Grummt, I.; Wick, W.; Opitz, C.A.; Platten, M.; Green, E.W. Constitutive Expression of the Immunosuppressive Tryptophan Dioxygenase TDO2 in Glioblastoma Is Driven by the Transcription Factor C/EBPbeta. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Mohapatra, S.R.; Sadik, A.; Tykocinski, L.O.; Dietze, J.; Poschet, G.; Heiland, I.; Opitz, C.A. Hypoxia Inducible Factor 1alpha Inhibits the Expression of Immunosuppressive Tryptophan-2,3-Dioxygenase in Glioblastoma. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2762. [[CrossRef](#)]
31. Mezrich, J.D.; Fechner, J.H.; Zhang, X.; Johnson, B.P.; Burlingham, W.J.; Bradfield, C.A. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 3190–3198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Sordillo, P.P.; Sordillo, L.A.; Helson, L. The Kynurenine Pathway: A Primary Resistance Mechanism in Patients with Glioblastoma. *Anticancer Res.* **2017**, *37*, 2159–2171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Fallarino, F.; Grohmann, U.; Vacca, C.; Bianchi, R.; Orabona, C.; Spreca, A.; Fioretti, M.C.; Puccetti, P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.* **2002**, *9*, 1069–1077. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Frumento, G.; Rotondo, R.; Tonetti, M.; Damonte, G.; Benatti, U.; Ferrara, G.B. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Exp. Med.* **2002**, *196*, 459–468. [[CrossRef](#)]
35. Terness, P.; Bauer, T.M.; Rose, L.; Dufter, C.; Watzlik, A.; Simon, H.; Opelz, G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: Mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J. Exp. Med.* **2002**, *196*, 447–457. [[CrossRef](#)]
36. Belladonna, M.L.; Puccetti, P.; Orabona, C.; Fallarino, F.; Vacca, C.; Volpi, C.; Gizzi, S.; Pallotta, M.T.; Fioretti, M.C.; Grohmann, U. Immunosuppression via tryptophan catabolism: The role of kynurenine pathway enzymes. *Transplantation* **2007**, *84*, S17–S20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Smith, J.R.; Jamie, J.F.; Guillemin, G.J. Kynurenine-3-monooxygenase: A review of structure, mechanism, and inhibitors. *Drug Discov. Today* **2016**, *21*, 315–324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Boros, F.A.; Vecsei, L. Immunomodulatory Effects of Genetic Alterations Affecting the Kynurenine Pathway. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2570. [[CrossRef](#)]
39. Minhas, P.S.; Liu, L.; Moon, P.K.; Joshi, A.U.; Dove, C.; Mhatre, S.; Contrepolis, K.; Wang, Q.; Lee, B.A.; Coronado, M.; et al. Macrophage de novo NAD(+) synthesis specifies immune function in aging and inflammation. *Nat. Immunol.* **2019**, *20*, 50–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Jones, S.P.; Franco, N.F.; Varney, B.; Sundaram, G.; Brown, D.A.; de Bie, J.; Lim, C.K.; Guillemin, G.J.; Brew, B.J. Expression of the Kynurenine Pathway in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Implications for Inflammatory and Neurodegenerative Disease. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0131389. [[CrossRef](#)]
41. Alberati-Giani, D.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Kohler, C.; Cesura, A.M. Regulation of the kynurenine metabolic pathway by interferon-gamma in murine cloned macrophages and microglial cells. *J. Neurochem.* **1996**, *66*, 996–1004. [[CrossRef](#)]
42. Castellano-Gonzalez, G.; Jacobs, K.R.; Don, E.; Cole, N.J.; Adams, S.; Lim, C.K.; Lovejoy, D.B.; Guillemin, G.J. Kynurenine 3-Monooxygenase Activity in Human Primary Neurons and Effect on Cellular Bioenergetics Identifies New Neurotoxic Mechanisms. *Neurotox Res.* **2019**, *35*, 530–541. [[CrossRef](#)]

43. Adams, S.; Braidy, N.; Bessedé, A.; Brew, B.J.; Grant, R.; Teo, C.; Guillemin, G.J. The kynurenine pathway in brain tumor pathogenesis. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 5649–5657. [[CrossRef](#)]
44. Munn, D.H.; Shafizadeh, E.; Attwood, J.T.; Bondarev, I.; Pashine, A.; Mellor, A.L. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J. Exp. Med.* **1999**, *189*, 1363–1372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Ramirez Ortega, D.; Ovalle Rodriguez, P.; Pineda, B.; Gonzalez Esquivel, D.F.; Ramos Chavez, L.A.; Vazquez Cervantes, G.I.; Roldan Roldan, G.; Perez de la Cruz, G.; Diaz Ruiz, A.; Mendez Armenta, M.; et al. Kynurenine Pathway as a New Target of Cognitive Impairment Induced by Lead Toxicity During the Lactation. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 3184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275. [[CrossRef](#)]
47. Goldman, M.J.; Craft, B.; Hastie, M.; Repecka, K.; McDade, F.; Kamath, A.; Banerjee, A.; Luo, Y.; Rogers, D.; Brooks, A.N.; et al. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nat. Biotechnol.* **2020**, *38*, 675–678. [[CrossRef](#)]
48. Tang, Z.; Kang, B.; Li, C.; Chen, T.; Zhang, Z. GEPIA2: An enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W556–W560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Patil, V.; Pal, J.; Somasundaram, K. Elucidating the cancer-specific genetic alteration spectrum of glioblastoma derived cell lines from whole exome and RNA sequencing. *Oncotarget* **2015**, *6*, 43452–43471. [[CrossRef](#)]
50. Alberati-Giani, D.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Kohler, C.; Cesura, A.M. Regulation of the kynurenine pathway by IFN-gamma in murine cloned macrophages and microglial cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1996**, *398*, 171–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Riess, C.; Schneider, B.; Kehnscherper, H.; Gesche, J.; Irmscher, N.; Shokraie, F.; Classen, C.F.; Wirthgen, E.; Domanska, G.; Zimpfer, A.; et al. Activation of the Kynurenine Pathway in Human Malignancies Can Be Suppressed by the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Dinaciclib. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 55. [[CrossRef](#)]
52. Guillemin, G.J.; Kerr, S.J.; Smythe, G.A.; Smith, D.G.; Kapoor, V.; Armati, P.J.; Croitoru, J.; Brew, B.J. Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: A paradox for neuronal protection. *J. Neurochem.* **2001**, *78*, 842–853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Heredi, J.; Berko, A.M.; Jankovics, F.; Iwamori, T.; Iwamori, N.; Ono, E.; Horvath, S.; Kis, Z.; Toldi, J.; Vecsei, L.; et al. Astrocytic and neuronal localization of kynurenine aminotransferase-2 in the adult mouse brain. *Brain Struct. Funct.* **2017**, *222*, 1663–1672. [[CrossRef](#)]
54. Friedmann-Morvinski, D.; Bushong, E.A.; Ke, E.; Soda, Y.; Marumoto, T.; Singer, O.; Ellisman, M.H.; Verma, I.M. Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science* **2012**, *338*, 1080–1084. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Senga, S.S.; Grose, R.P. Hallmarks of cancer—the new testament. *Open Biol.* **2021**, *11*, 200358. [[CrossRef](#)]
56. Wang, X.; Li, S. Protein mislocalization: Mechanisms, functions and clinical applications in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1846*, 13–25. [[CrossRef](#)]
57. Lai, M.H.; Liao, C.H.; Tsai, N.M.; Chang, K.F.; Liu, C.C.; Chiu, Y.H.; Huang, K.C.; Lin, C.S. Surface Expression of Kynurenine 3-Monooxygenase Promotes Proliferation and Metastasis in Triple-Negative Breast Cancers. *Cancer Control* **2021**, *28*, 10732748211009245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Liu, C.Y.; Huang, T.T.; Chen, J.L.; Chu, P.Y.; Lee, C.H.; Lee, H.C.; Lee, Y.H.; Chang, Y.Y.; Yang, S.H.; Jiang, J.K.; et al. Significance of Kynurenine 3-Monooxygenase Expression in Colorectal Cancer. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 620361. [[CrossRef](#)]
59. Prendergast, G.C. Cancer: Why tumours eat tryptophan. *Nature* **2011**, *478*, 192–194. [[CrossRef](#)]
60. Gujar, A.D.; Le, S.; Mao, D.D.; Dadey, D.Y.; Turski, A.; Sasaki, Y.; Aum, D.; Luo, J.; Dahiya, S.; Yuan, L.; et al. An NAD<sup>+</sup>-dependent transcriptional program governs self-renewal and radiation resistance in glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E8247–E8256. [[CrossRef](#)]
61. Giorgini, F.; Huang, S.Y.; Sathyaikumar, K.V.; Notarangelo, F.M.; Thomas, M.A.; Tararina, M.; Wu, H.Q.; Schwarcz, R.; Muchowski, P.J. Targeted deletion of kynurenine 3-monooxygenase in mice: A new tool for studying kynurenine pathway metabolism in periphery and brain. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 36554–36566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Huang, T.T.; Tseng, L.M.; Chen, J.L.; Chu, P.Y.; Lee, C.H.; Huang, C.T.; Wang, W.L.; Lau, K.Y.; Tseng, M.F.; Chang, Y.Y.; et al. Kynurenine 3-monooxygenase upregulates pluripotent genes through beta-catenin and promotes triple-negative breast cancer progression. *EBio. Med.* **2020**, *54*, 102717. [[CrossRef](#)]
63. Liu, I.L.; Chung, T.F.; Huang, W.H.; Hsu, C.H.; Liu, C.C.; Chiu, Y.H.; Huang, K.C.; Liao, A.T.; Lin, C.S. Kynurenine 3-monooxygenase (KMO), and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) expression is involved in tumour proliferation and predicts poor survival in canine melanoma. *Vet. Comp. Oncol.* **2021**, *19*, 79–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Chiu, Y.H.; Lei, H.J.; Huang, K.C.; Chiang, Y.L.; Lin, C.S. Overexpression of Kynurenine 3-Monooxygenase Correlates with Cancer Malignancy and Predicts Poor Prognosis in Canine Mammary Gland Tumors. *J. Oncol.* **2019**, *2019*, 6201764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Chiarugi, A.; Dolle, C.; Felici, R.; Ziegler, M. The NAD metabolome—A key determinant of cancer cell biology. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 741–752. [[CrossRef](#)]
66. Palanichamy, K.; Thirumoorthy, K.; Kanji, S.; Gordon, N.; Singh, R.; Jacob, J.R.; Sebastian, N.; Litzenberg, K.T.; Patel, D.; Bassett, E.; et al. Methionine and Kynurenine Activate Oncogenic Kinases in Glioblastoma, and Methionine Deprivation Compromises Proliferation. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 3513–3523. [[CrossRef](#)]
67. Campesato, L.F.; Budhu, S.; Tchaicha, J.; Weng, C.H.; Gigoux, M.; Cohen, I.J.; Redmond, D.; Mangarin, L.; Pourpe, S.; Liu, C.; et al. Blockade of the AHR restricts a Treg-macrophage suppressive axis induced by L-Kynurenine. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4011. [[CrossRef](#)]