

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ESTUDIO DEL EFECTO DEL IMMUNEPOTENT CRP SOBRE CÉLULAS DE  
SISTEMA INMUNE PERIFÉRICO Y MICROGLÍA ANTE UN ESTÍMULO CON  
QUIMIOTERAPIAS Y LPS**

**Por**

**Q.F.B. Carlos Daniel Lemus Medina**

**Como requisito para obtener el grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN  
EN INMUNOBIOLOGÍA**

**2023**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ESTUDIO DEL EFECTO DEL IMMUNEPOTENT CRP SOBRE CÉLULAS DE  
SISTEMA INMUNE PERIFÉRICO Y MICROGLÍA ANTE UN ESTÍMULO CON  
QUIMIOTERAPIAS Y LPS**

**Por**

**Q.F.B. Carlos Daniel Lemus Medina**

**Como requisito para obtener el grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN  
EN INMUNOBIOLOGÍA**

**2023**

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL IMMUNEPOTENT CRP SOBRE CÉLULAS DE SISTEMA INMUNE PERIFÉRICO Y MICROGLÍA ANTE UN ESTÍMULO CON QUIMIOTERAPIAS Y LPS**

Comité de Tesis



---

Dra. Ana Carolina Martínez Torres

Director de Tesis



---

Dra. María Cristina Rodríguez Padilla

Secretario



---

Dr. Moisés Armides Franco Molina

Vocal



---

Dr. José Manuel Vázquez Guillen

Vocal

DIANA  
CABALLERO

---

Dra. Diana E. Caballero Hernández

Vocal



---

Dra. Katiushka Arevalo Niño

Subdirectora de Posgrado



SUBDIRECCIÓN  
DE POSGRADO

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL IMMUNEPOTENT CRP SOBRE CÉLULAS DE  
SISTEMA INMUNE PERIFÉRICO Y MICROGLÍA ANTE UN ESTÍMULO CON  
QUIMIOTERAPIAS Y LPS**

Dirección de Tesis



---

Dra. Ana Carolina Martínez Torres

Director de Tesis



---

Dr. Román Vidal Tamayo Ramírez

Director Externo

DERECHOS RESERVADOS© PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.



*Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León y al Laboratorio de Inmunología y Virología por brindarme el apoyo económico y la infraestructura para realizar este proyecto*

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios, nuestro padre misericordioso que me a mostrado el camino que debo seguir y me a mostrado amor, cariño y comprensión en los momentos más difíciles de mi vida. Quien ha visto mi más débil ser y aun así me ayuda a ser decidido en mis sueños y metas.

A la Dra. Ana Carolina Martínez Torres, quien a sido una luz en mi camino de la ciencia, le tengo una gran gratitud por aceptarme aun cuando yo dudaba de mí mismo. Siempre admirare su convicción por conocer todo aquello que se desconoce y espero que algún día poder adquirir esa habilidad. Le estoy eternamente agradecido por acogerme y aconsejarme en los momentos que más necesitaba.

A Roberto, por apoyarme sin condición alguna, admiro tu forma de ver aquellas cosas que pocos ven, además, admiro tu sinceridad y el apoyo que me diste cuando lo necesite no solo como compañero sino como uno de mis mejores amigos. Son muchas cosas por agradecerte que no podría mencionarlas en un texto, nunca cambies tu nobleza esa parte es la que te hace ver como una luz incandescente en la más penetrante neblina.

A Ana Luisa, quien es una gran científica y amiga, gracias por apoyarme en los momentos que me sentía más perdido, nunca olvidare las enseñanzas que me diste y sobre todo nunca olvidare que por ti esta tesis no podría haber sido como es. Nunca olvides que eres una mujer formidable como pocas hay, con grandes metas y con la mayor dedicación a la ciencia que pude haber observado en alguien. Para mí, eres un pilar en mi vida y no tengo como agradecerte todo aquello que me has ofrecido, jamás dejes de perseguir tus sueños porque en ti veo nuestro siguiente premio Nobel.

A Rodo y Andrea, de ustedes e aprendido a divertirme con las cosas simples de la vida, a conocer un mundo con ojos de verdadero ser. También puedo admitir que en ustedes pude conocer el cómo es una verdadera relación de noviazgo y amigo, admiro muchísimo el cómo se aman y como demuestran de una manera tan natural ese amor que se tienen.

A Rafael, quien fue mi primer mentor y con quien llegué a apasionarme de la neurociencia y la inmunología, no pude tener a un mejor mentor que, aunque no estuvo conmigo siempre, fue quien me enseñó el grandioso mundo que el SNC. También a María, Quien considero una buena amiga para mí de ti aprendí a reírme sin parar, gracias por abrirme tu amistad no sabés cuanto admiro la forma en que te esfuerzas por cumplir tus metas y la forma que tienes de hacer nuevos amigos

siempre te tendré ese enorme cariño que te eh dicho que tengo por ti. A Misael, quien me ha mostrado una verdadera amistad y con quien siempre estaré agradecido. A Kenny, quien me dedico momentos de su valioso tiempo para enseñarme todo lo que el conocía y sabia con una tranquilidad como el solo sabe. A Helen, quien me enseñó una amistad sincera y de quien aprendí lo valioso que es investigar, llegara a ser una gran investigadora.

También agradecer a mis profesores, quien sin su guia no podría haberme motivado de tal manera de querer seguir estudiando y superándome. También quiero agradecer a mis compañeros de la maestría, Alondra, Adrián, Gerardo y Blanca con ustedes pase buenos momentos y muy divertidos se los agradezco.

De manera especial a Ale Guerrero, quien me alentó a elegir una maestría con quien compartí gran parte de mi primer casi primer año de la maestría, a toda su familia quien me apoyo y recibió además de escucharme y alentarme a cumplir mis sueños, siempre tendrán un lugar un mi pensamiento y corazón. Les agradezco todo y espero en Dios se cumplan todas sus metas y sueños.

A Octavio González, quien es un padre para mi quiero agradecerle todo el cariño que me a demostrado, todas las enseñanzas que me ha dado y sobre todo toda la protección que me dio durante toda mi carrera. Siempre tendrá un lugar muy apreciado en mi corazón.

A Angela, mi hermana que me ha procurado y a enseñado a que los demás también necesitan ser escuchados, admiro mucho la forma en que das sin esperar nada a cambio.

A la familia Lemus, para mí son una parte esencial de mis días, les doy las gracias por estar ahí y recordarme que tuve un padre. Dentro de este agradecimiento, esta mi abuelo Asunción Lemus quien siempre creyó en mi y en todo lo que era y valía.

A Ma. Teresa Medina, mi madre que con todo su cariño y dulzura llena mi vida de alegría, a ti madre mía no tengo palabras para dedicarte llenaría una tesis completa para decirte de todo lo que estoy agradecido, eres mi ejemplo para seguir y no debo recordarte lo mucho que te amo y que sin ti no seria quien soy. Eres mi amiga y madre, gracias por apoyar mis sueños tu ya tienes el cielo ganado por tu gran labor de madre que haces te amo infinitamente.

*No hay mayor Orgullo que tenerte como madre esta tesis está hecha gracias a ti Teresa*

*Medina.*

*Gracias por siempre estar ahí cuidándome y protegiéndome padre Octavio González.*

*Todo lo que hago es pensando en ti Angela Lemus mi hermanita quien siempre cuidare.*

Si puedes manchar una enfermedad, puedes envenenarla. Si la puedes envenenar, la  
puedes erradicar del cuerpo”

Paul Ehrlich, *premio nobel 1908*

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Sistema inmune .....	3
2.2 Inflamación. ....	4
2.3 Inflamación ocasionada por quimioterapias.....	7
2.4 Barrera hematoencefálica.....	8
2.5 Glía y su interacción con la barrera hematoencefálica.....	9
2.7 Interacción entre sistema inmune periférico y el Sistema Nervioso Central (SCN) .....	10
2.6 Neuroinflamación.....	11
2.7 Neurodegeneración y Patologías asociadas .....	13
2.8 Terapias utilizadas para enfermedades neurodegenerativas .....	14
2.8.1 Compuestos Inmunomoduladores .....	14
2.8.1.1 Sintéticos.....	14
2.8.1.2 Extractos Naturales .....	15
2.8.2 ICRP .....	15
3. JUSTIFICACIÓN .....	17
4. HIPÓTESIS GENERAL .....	18
5. OBJETIVO GENERAL .....	19
5.1 Objetivos específicos .....	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
6.1 Cultivo Celular .....	20
6.2 IMMUNEPOTENT CRP .....	20

6.3 Lipopolisacáridos .....	21
6.4 Agentes Quimioterapéuticos .....	21
6.5 Animales .....	21
6.5.1 Extracción de células de bazo .....	22
6.5.2 Sangre periférica .....	22
6.5.3 Extracción de células de médula ósea.....	23
6.6 Evaluación de la muerte celular por ensayo de exclusión con Azul de tripano .....	23
6.7 Análisis por citometría de flujo.....	24
6.7.1 Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	25
6.7.2 Evaluación de la producción de óxido nítrico.....	26
6.8 Análisis en la implicación de ROS y caspasas en el mecanismo de protección inducido por epirrubicina, doxorubicina, metotrexato y LPS en combinación con ICRP .....	27
6.9 Análisis estadístico.....	28
7. RESULTADOS.....	30
7.1 El LPS, epirrubicina, doxorubicina y metotrexato tienen un efecto citotóxico sobre células de médula ósea, bazo, PBMCs y leucocitos.....	30
7.2 El tratamiento con LPS, epirrubicina, doxorubicina y metotrexato tiene un efecto citotóxico dependiente de la concentración en células de SIM-A9. ....	31
7.3 El tratamiento con LPS, epirrubicina, doxorubicina y metotrexato inducen un aumento en la producción de ROS sobre células de médula ósea, bazo, leucocitos, y células SIMA-9. ....	33
7.4 El LPS, epirrubicina, doxorubicina y metotrexato inducen una elevación significativa de la producción de NOS en células de médula ósea, bazo, leucocitos y SIM-A9. ....	36
7.5 El antioxidante NAC disminuye la producción de ROS inducida por epirrubicina, doxorubicina, metotrexato y LPS en células de médula ósea, bazo y SIM-A9. ....	39

7.6 El pretratamiento con QVD-Oph inhibe la muerte de células de médula ósea, bazo y SIM-A9 ante un estímulo con epirubicina, doxorubicina, metotrexato y LPS. ....	41
7.7 El ICRP reduce la presencia de ROS en células de médula ósea y bazo ante un estímulo con LPS y CC <sub>50</sub> de epirubicina, doxorubicina y metotrexato.....	42
7.8 El ICRP reduce la presencia de ROS en células de SIM-A9 ante un estímulo con LPS y CC <sub>50</sub> en SIM-A9 de epirubicina, doxorubicina y metotrexato.....	46
7.9 El ICRP disminuye la producción de NO en células de SIM-A9 ante un estímulo con LPS y diferentes dosis de Epirubicina, doxorubicina y metotrexato.....	48
7.10 El ICRP disminuyó el porcentaje de muerte celular sobre células de Médula Ósea y Bazo ante un estímulo con LPS y CC <sub>50</sub> de epirubicina, doxorubicina y metotrexato. ....	49
7.11 El ICRP disminuye el porcentaje de muerte en células de SIM-A9 ante un daño con LPS y quimioterapias. ....	51
8. DISCUSIÓN .....	53
9. CONCLUSIONES .....	59
10. PERSPECTIVAS .....	60
11. BIBLIOGRAFÍA.....	61

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones citotóxicas de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato en SIM-A9 .....	33
--	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura n.º	Título	Página
1	Cambios disruptivos y no disruptivos en la barrera hematoencefálica. (Aramvash et al., 2017)	9
2	Regulación paracrina y autocrina de la BBB durante la homeostasis y la inflamación (Lécuyer et al., 2016).	12
3	Efecto citotóxico de LPS, epirrubicina, doxorubicina y metotrexato en células de bazo, médula ósea, PBMCs y leucocitos durante 24 h.	31
4	Efecto citotóxico del LPS, epirrubicina, doxorubicina y metotrexato en células SIM-A9.	33
5	Efecto del tratamiento con LPS, epirrubicina, doxorubicina y metotrexato sobre la producción de ROS de células de médula ósea, bazo y leucocitos.	34
6	Efecto tratamiento con LPS, epirrubicina, doxorubicina y metotrexato sobre la producción de ROS de células SIM-A9.	35
7	Efecto de LPS, epirrubicina, doxorubicina y metotrexato sobre la producción de NO en células de médula ósea, bazo y leucocitos.	37
8	Efecto de concentraciones subletales y CC <sub>20</sub> de epirrubicina, doxorubicina, metotrexato y curva de tiempo de LPS sobre la producción de NO en células SIM-A9.	39
9	Inhibición con NAC de la producción de ROS del tratamiento de LPS y la CC <sub>50</sub> de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato sobre células de médula ósea y bazo, además de SIM-A9, respectivamente.	40
10	Inhibición de la muerte en células de médula ósea, bazo y células de SIM-A9 ante un estímulo con LPS y CC <sub>50</sub> de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato.	42

11	Efecto del ICRP y NAC en la producción de ROS inducido por el tratamiento con LPS y epirubicina, doxorubicina y metotrexato sobre células de Médula Ósea.	44
12	Efecto del ICRP y NAC en la producción de ROS del tratamiento de LPS y la CC <sub>50</sub> de epirubicina, doxorubicina y metotrexato sobre células de bazo.	46
13	Efecto del ICRP y NAC en la producción de ROS del tratamiento de LPS y la CC <sub>50</sub> en SIM-A9 de epirubicina, doxorubicina y metotrexato sobre células de SIM-A9.	47
14	Efecto del ICRP en la producción de NO del tratamiento de LPS, además CC <sub>20</sub> y SL de epirubicina, doxorubicina y metotrexato sobre SIM-A9.	49
15	Efecto protector del ICRP sobre células de médula ósea, bazo, PBMCs y leucocitos ante un estímulo con LPS y CC <sub>50</sub> de epirubicina, doxorubicina y metotrexato.	51
16	Efecto del ICRP sobre SIM-A9 ante un estímulo con LPS, epirubicina, doxorubicina y metotrexato.	52

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

IMMUNEPOTENT CRP (unidades sobre mililitro)	ICRP (U/mL)
Especies Reactivas de Oxígeno	ROS
Óxido Nítrico	NO
Extracto Dializable de Leucocitos Bovinos	bDLE
Epírrubicina (micromolar)	EPI ( $\mu\text{M}$ )
Doxorrubicina (micromolar)	DOX ( $\mu\text{M}$ )
Metotrexato (nanomolar)	MTX (nM)
Lipopolisacárido (microgramos sobre mililitro)	LPS ( $\mu\text{g/mL}$ )
Buffer de fosfatos salinos	PBS
Células Mononucleares de Sangre Periférica	PBMCs
Dulbecco's Eagle's modificado	DMEM-F12
4-Amino-5-Metilamino-2,7-Difluorofluorescein diacetato	DAF-FM
Diacetato 2,7-diclorodihidrofluoresceína	H <sub>2</sub> DCFDA
5-Fluorouracilo	5-FU
Células Natural Killer	NK
Patrones Asociados a Daño	DAMP
Patrones Asociados a Patógeno	PAMP
Receptores de Reconocimiento de Patrones	PRR
Receptores tipo Toll	TLR
Sistema Nervioso Central	SNC
Blood Barrier Brain (barrera hematoencefálica)	BBB
Suero Fetal Bovino	SFB
ácido etilendiaminotetraacético	EDTA
ácido Egtazico	EGTA
Células Polimorfonucleares	PMNC
N-acetilcisteína (micromolar)	NAC ( $\mu\text{M}$ )
Inhibidor de caspasas de amplio espectro (micromolar)	QVD-Oph ( $\mu\text{M}$ )
Células de microglía murina inmortalizada	SIM-A9

## RESUMEN

La respuesta inflamatoria es una reacción del sistema inmune que puede originarse por eventos patológicos, la interacción con agentes infecciosos y agentes químicos. Además, se relaciona con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (NOS) y citocinas proinflamatorias. Nuestros resultados de citometría muestran el aumento de ROS y NO al tratar células de médula ósea, bazo y leucocitos directamente con  $CC_{50}$  de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato, además, de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS. La interacción entre el cerebro y las moléculas asociadas a la inflamación provoca la activación de la glía, como se reporta en el deterioro cognitivo inducido por quimioterapia o en casos de inflamación generalizada. Nuestros resultados de citometría muestran que una  $CC_{50}$  de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato, además, de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS inducen una elevación de ROS y NO en células de microglía murina SIM-A9. El IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) ha demostrado modular la sobreproducción de NO y ROS inducidas por LPS en macrófagos peritoneales murinos y células mononucleares de sangre periférica. Por otro lado, en un modelo murino tratado con 5-FU se reportó un aumento de células de médula ósea y la reducción en la producción de ROS y superóxido por el ICRP. Sin embargo, hasta ahora no se ha estudiado si el ICRP es capaz de proteger del daño causado por agentes quimioterapéuticos sobre células del sistema inmune glial, precisamente en células de microglía.

Es por ello que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto protector del ICRP sobre células de microglía ante un estímulo de inflamación sistémica y daño inducida por LPS y quimioterapias. Nuestros resultados del porcentaje de muerte por azul de tripano muestran que el ICRP protege de la citotoxicidad inducida por  $CC_{50}$  de epirrubicina, doxorubicina, metotrexato y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS a células de médula ósea, bazo y SIM-A9, además se observa en los análisis por citometría una reducción de la producción de ROS y NO en células SIM-A9. Ante los resultados obtenidos se propone al ICRP como un inmunomodulador capaz de disminuir la muerte en células del sistema inmune periférico y microglía, reduciendo la producción de ROS asociado a la inflamación y daño.

## ABSTRACT

The inflammatory response is an immune system reaction that can originate from pathological events, or after the interaction with infectious microorganisms, and chemical agents. In addition, it is related to the production of reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (NOS), and proinflammatory cytokines. Our cytometry results show increased ROS and NO when treating bone marrow, spleen, and leukocyte cells directly with  $CC_{50}$  of epirubicin, doxorubicin, and methotrexate, in addition, to 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of LPS. The interaction between the brain and inflammation-associated molecules causes activation of glia, as reported in chemotherapy-induced cognitive impairment or cases of generalized inflammation. Our cytometry results show that a  $CC_{50}$  of epirubicin, doxorubicin, and methotrexate, also 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS induces an elevation of ROS and NO in murine SIM-A9 microglia cells.

IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) has been shown to modulate LPS-induced NO and ROS overproduction in murine peritoneal macrophages and peripheral blood mononuclear cells. On the other hand, in a murine model treated with 5-FU, an increase in bone marrow cells and a reduction in ROS and superoxide production by ICRP were reported. However, until now it has not been studied whether ICRP can protect from the damage caused by chemotherapeutic agents on cells of the glial immune system, precisely on microglia cells. That is why this work aimed to evaluate the protective effect of ICRP on microglial cells against a stimulus of systemic inflammation induced by LPS and chemotherapies. Our results show that ICRP protects bone marrow, spleen, and SIM-A9 cells at cytotoxic doses ( $CC_{50}$ ) of epirubicin, doxorubicin, methotrexate and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of LPS. In addition, ICRP reduces ROS and NO production in SIM-A9 cells. Given the results obtained, ICRP is proposed as an immunomodulator capable of decreasing the death of healthy microglia and immune cells by reducing the production of ROS associated with inflammation.

# 1. INTRODUCCIÓN

La inflamación es la respuesta que tiene el organismo de protegernos contra patógenos, daño o moléculas tóxicas. La respuesta inflamatoria comienza con la identificación del agente causal de daño por los distintos receptores de inflamación conduciendo a una señalización río abajo que produce la traslocación de factores de transcripción y la expresión genética de las moléculas asociadas a la inflamación, como citocinas, óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno (ROS); estas moléculas modulan el proceso inflamatorio hasta su resolución (Kindt et al., 2007). La inflamación sistémica puede ser aguda, que aparece de forma rápida y dura unos pocos minutos a unos días, o crónica, caracterizada por ser más insidiosa, de larga duración (Kumar, 2018)

En modelos de inflamación inducidos con LPS se ha reportado una sobreproducción de citocinas proinflamatorias y ROS que pueden recorrer el torrente sanguíneo e interactuar con los distintos tejidos y órganos del cuerpo, como el cerebro (Janelsins et al., 2005). Por otro lado, se ha observado que el tratamiento con doxorrubicina y metotrexato produce neuroinflamación, reportando un deterioro cognitivo inducido por la elevación de especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO) e interleucina 6 (IL-6) (Allen et al., 2019; Keeney et al., 2018). Se ha demostrado una relación muy estrecha entre la inflamación ocasionada en sistema inmune periférico y la neuroinflamación. La neuroinflamación es caracterizada por la activación de células de la glía, la cual está compuesta por células residentes de tejido como microglía, astrocitos y oligodendrocitos, al interactuar con moléculas asociadas a la inflamación estas células liberan citocinas proinflamatorias, quimiocinas y ROS (Kempuraj et al., 2005). La interacción entre el sistema inmune periférico y la microglía se ha descrito en algunas enfermedades neurodegenerativas, y aunque el mecanismo no se ha descifrado completamente, se cree que las ROS, NOS, las citocinas y las quimiocinas juegan un papel central al reclutar y activar las células inmunes (Kempuraj et al., 2005.; Lucas et al., 2006a; Ren et al., 2019).

La interacción de la microglía y las moléculas liberadas por las células inmunes periféricas hace que el SNC pierda homeostasis, lo que ocasiona una activación por parte de las células residentes de tejido cerebral pertenecientes al sistema inmune provocando alteraciones cognitivas (Ren et al., 2019). Se ha reportado que la activación en células de

la glía produce óxido nítrico, molécula implicada en muerte de células mesenquimales y neurotoxicidad (Liy et al., 2021).

Una manera en la que se ha reportado una disminución en los niveles de moléculas asociadas a la inflamación es mediante el uso de inmunomoduladores, tal es el caso del IMMUNEPOTENT CRP (ICRP), un extracto dializable de leucocitos obtenido de bazo desintegrado de bovino, que es capaz de modificar la respuesta inmune en modelos murinos y macrófagos peritoneales murino y humanos, mediante un efecto antioxidante y antiinflamatorio (Franco-Molina et al., 2004, 2005b). Por otro lado, el ICRP ha demostrado modular la producción de citocinas, y proteger a las células de medula ósea tratadas con 5-FU (Coronado-Cerda et al., 2016)Click or tap here to enter text.. Debido a lo anterior, en esta tesis se abordó la idea de que el ICRP puede ser utilizado como un agente neuro protector, inmunomodulador e antioxidante para células del sistema inmune periférico y microglía, apoyando a la terapia de enfermedades asociadas a la neuroinflamación.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Sistema inmune**

El sistema inmune es un conjunto de células, sustancias químicas y procesos que funcionan de manera conjunta para dar protección, de agentes infecciosos y no infecciosos, a los distintos órganos del organismo (Marshall et al., 2018). Este sistema tiene como objetivo principal eliminar patógenos, células dañadas y sustancias tóxicas, para ello las células del sistema inmune innato y adaptativo trabajan de manera conjunta para dar una resolución a la pérdida de la homeostasis (Bennett et al., 2018a). Las células que componen a este sistema inmune son diferenciadas y llegan a término de la maduración en Médula Ósea culminando en células polimorfonucleadas (neutrófilo, basófilo y eosinófilo) y mononucleadas (linfocitos y monocitos) (Kindt et al., 2007). El proceso de maduración y diferenciación inicia con la célula madre pluripotencial hematopoyética localizada en la médula ósea. Esta célula pluripotencial se puede diferenciar en dos diferentes tipos de células las cuales son progenitoras mieloides o linfoides, las cuales por etapas de maduración y diferenciación dan lugar a las células polimorfonucleadas y mononucleadas (Chaplin, 2010). El linaje linfóide está compuesto por los linfocitos B, T y NK los cuales se han asociado al sistema inmune adaptativo reconociendo agentes infecciosos y no infecciosos, produciendo inmunoglobulinas y creando memoria de procesos patológicos e interacción con microorganismos (Kindt et al., 2007). El linaje granulocítico comprende a los neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos, macrófagos y mastocitos, los cuales al ser activados ante un estímulo de daño o interacción con agentes infecciosos o químicos producen elevadas cantidades de ROS y óxido nítrico (NO) (Chaplin, 2010).

La interacción de patrones moleculares asociados a daño (DAMP), patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o sustancias tóxicas, con los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) provocan una activación del sistema inmune. Los PRR son componentes importantes del sistema inmunológico innato, las principales funciones de los PRR son estimular la fagocitosis y mediar la inflamación al detectar varios patógenos y moléculas de las células dañadas, como resultado, los PRR activan las vías de señalización inflamatoria para inducir la inmunidad innata (Roh & Sohn, 2018).

## 2.2 Inflamación.

La inflamación es una respuesta protectora en la que participan las células del huésped, los vasos sanguíneos, proteínas y otros mediadores que tratan de eliminar la causa inicial de la lesión celular, además de las células y los tejidos necróticos causados por la agresión inicial e iniciar el proceso de reparación. Aunque la inflamación ayuda a eliminar las infecciones y otros estímulos nocivos e inicia la reparación, la reacción inflamatoria y el consiguiente proceso reparativo puede causar por sí mismo un importante daño (Kumar, 2018). El proceso inicial de la inflamación implica una reacción inflamatoria donde las células y moléculas relacionadas en la defensa del huésped (leucocitos y proteínas plasmáticas), que normalmente circulan por la sangre, tiene el objetivo de localizar el foco de infección o daño tisular. El reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógeno (PAMP) o patrones moleculares asociados a daño (DAMP) provoca la fagocitosis por parte de las células del sistema inmune del agente causal y la producción de moléculas asociadas a la inflamación con la finalidad de destruir de una manera eficiente al agente patológico o de daño (Kindt et al., 2007). El punto final de la inflamación suele ser un resultado favorable, pero la inflamación a veces también se prolonga, lo que conduce a diversas enfermedades o agrava un proceso patológico ya existente (Krishnamoorthy & Honn, 2006). Durante el inicio de la inflamación se movilizan las células con el fin de llegar al sitio de lesión o daño, estas células son parte del sistema inmunitario el cual puede ser innato o adaptativo (Kindt et al., 2007).

La respuesta inflamatoria involucra una red altamente coordinada de una variedad de células que incluyen a los macrófagos, monocitos, mastocitos y neutrófilos, estas median las respuestas locales al daño tisular y la infección (Kumar, 2018). En los sitios de lesión tisular, las células epiteliales y endoteliales dañadas liberan factores que desencadenan la cascada inflamatoria, junto con quimiocinas y factores de crecimiento, que atraen neutrófilos, como primeras células, seguidas de monocitos, los cuales pueden diferenciarse a macrófagos y células dendríticas, linfocitos Natural Killer, mastocitos, células dendríticas, linfocitos T y B (Kindt et al., 2007). Los neutrófilos son mediadores clave de la respuesta inflamatoria y programan las células presentadoras de antígenos para activar las células T y liberar factores localizados para atraer monocitos y células dendríticas, por otro lado los macrófagos son componentes importantes del sistema de

fagocitos mononucleares y son fundamentales para el inicio, el mantenimiento y la resolución de la inflamación, durante la inflamación, los macrófagos presentan antígenos, experimentan fagocitosis y modulan la respuesta inmune al producir citocinas y factores de crecimiento (Kindt et al., 2007). Los mastocitos, que residen en matrices de tejido conectivo y en superficies epiteliales, son células efectoras que inician respuestas inflamatorias. Los mastocitos activos liberan una variedad de mediadores inflamatorios, que incluyen citocinas, quimiocinas, histamina, proteasas, prostaglandinas, leucotrienos y proteoglicanos (Chen et al., 2018; Kindt et al., 2007).

Los mecanismos con los cuales se activan las células del sistema inmunitario son distintos, pero se tiene comunicación entre ellas produciendo en primera instancia inflamación y luego reparación (Abul K Abbas, 2015). La exposición a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y patrones moleculares asociados a daño (DAMP) conducen a la activación de células del linaje mieloide, principalmente los monocitos que se polarizan a macrófagos, lo que resulta en la expresión de genes proinflamatorios, provocando la producción de ROS, NO, citocinas y quimiocinas. Estos procesos celulares están mediados por diversas vías de señalización intracelular y transcripción nuclear, especialmente: NF- $\kappa$ B y AP-1, las cuales controlan citocinas proinflamatorias, ROS y NO  
[Click or tap here to enter text.](#)(Takeuchi & Akira, 2010).

## 2.2 Inflamación aguda

Dado que los leucocitos pueden secretar sustancias con potencial lesivo, como enzimas y especies reactivas de oxígeno (ROS), son una importante causa de lesión en las células y tejidos normales en diversas circunstancias. Las lesiones tisulares dependientes de los leucocitos son la base de muchas enfermedades agudas y crónicas, los leucocitos secretan gran variedad de citocinas que estimulan la inflamación y tienen importantes efectos sistémicos (Kumar, 2018). La inflamación aguda aparece de forma rápida y dura poco, en general de unos pocos minutos a unos días, se caracteriza por la exudación de proteínas plasmáticas y líquido, y por la acumulación predominantemente de leucocitos. La inflamación aguda tiene como componentes fundamentales los cambios vasculares, caracterizados por la vasodilatación y aumento en la permeabilidad provocando la activación de las células endoteliales aumentando la adhesión de los leucocitos y su

migración a través de la pared vascular; otro componente de la inflamación aguda es el acontecimiento celular representado por la migración de leucocitos, su acumulación en el foco de la lesión y la activación de los leucocitos permitiendo eliminar el agente lesivo. En este tipo de procesos se ha observado un aumento significativo de óxido nítrico, esta molécula tiene una función importante como segundo mensajero en la respuesta inflamatoria (Kumar, 2018; Sharma et al., 2007).

Si se promueve el estímulo para la inflamación aguda pasa a ser una inflamación crónica caracterizada por ser más insidiosa, de larga duración con presencia de linfocitos y macrófagos con proliferación vascular y fibrosis asociadas (Kumar, 2018). El síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) es una respuesta de defensa exagerada del cuerpo a un factor de estrés nocivo para localizar y luego eliminar el endógeno o exógeno, implica la liberación de proteínas de fase aguda, que son mediadores directos de alteraciones autocrina, endocrina, hematológica e inmunológica generalizada. Aunque el propósito es defensivo, la tormenta de citocinas puede causar una cascada inflamatoria masiva aguda que conduce a una disfunción reversible o irreversible de los órganos terminales e incluso la muerte (Chakraborty Rebanta K. & Burns Bracken ., 2022).

Uno de los modelos ampliamente utilizados para evaluar el proceso de inflamación sistémica es la utilización del Lipopolisacárido (LPS), componente esencial de la membrana externa celular de las bacterias gram negativas, por lo cual se considera un elemento de virulencia (Mayer et al., 1985). El LPS tiene la capacidad de activar a las células del sistema inmune al interactuar con el receptor celular tipo toll 4 (TLR), produciendo señalizaciones que culminan en la translocación de factores de transcripción y producción de ROS, NO y citocinas proinflamatorias. Se reportó que el tratamiento en ratones de la cepa C57BL/6 con una dosis de 0.1 mg/ 10 g vía intraperitoneal incrementaba la producción de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL10 a las 2 horas de tratamiento, por otro lado, se observó que el LPS incrementa los niveles de estrés oxidativo y a las 24 horas incrementa la tasa de productos de la peroxidación de lípidos (Seemann et al., 2017). Otro estudio demostró que el LPS ocasiona un proceso de neuroinflamación al tratar a ratones de la cepa C57BL/6 con una dosis de 5 $\mu$ g/ 5 $\mu$ L directamente a cerebelo, los resultados exhiben un aumento significativo en la producción de citocinas como MCP-1 y MCP-1 $\alpha$ . Además, se reportó una reactividad de las células de la glía, expresión de marcadores como Iba-1 y

CD86 después de 7 días del tratamiento (Hong et al., 2020). Los efectos del LPS son ampliamente conocidos y reproducibles para modelos de inflamación y neuroinflamación, por lo cual se considera una molécula control para este tipo de procesos patológicos (Seemann et al., 2017).

### 2.3 Inflamación ocasionada por quimioterapias

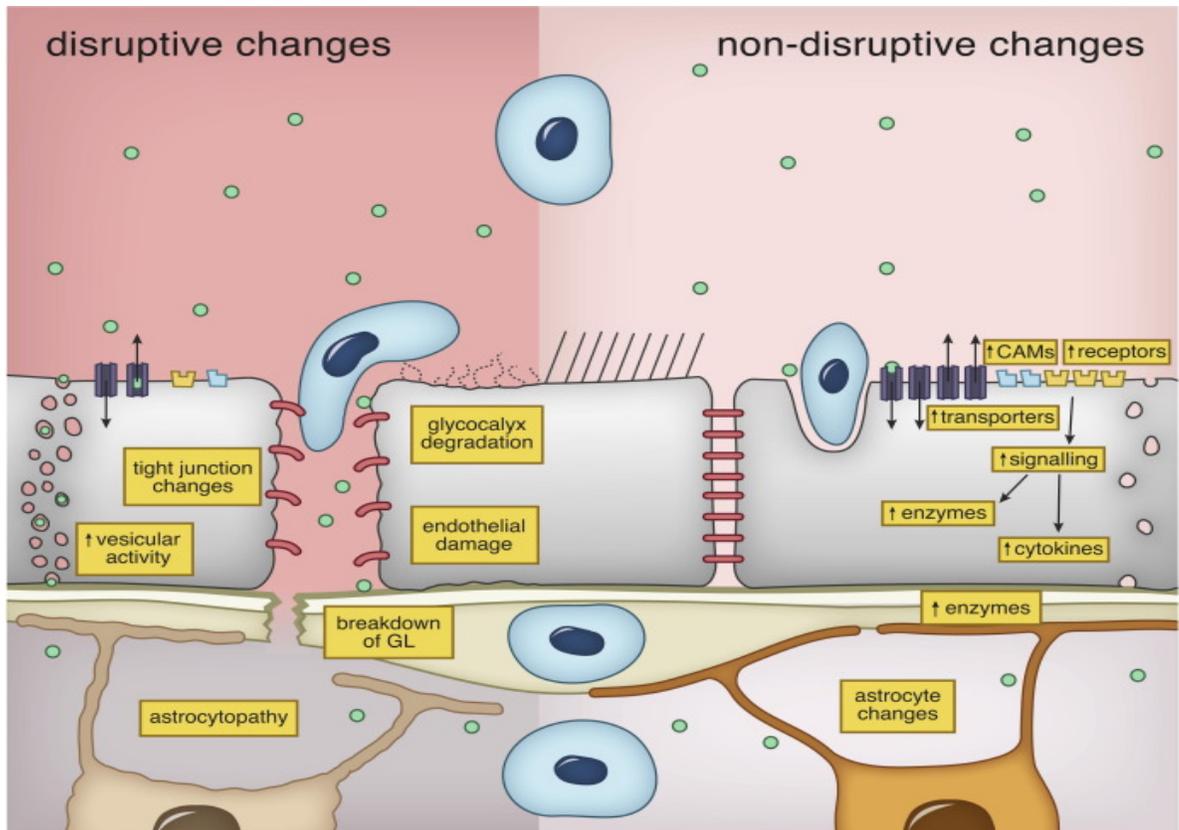
La inflamación ocasionada durante el proceso del cáncer juega un papel importante para el microambiente tumoral, por lo tanto, la visión actual de los procesos inflamatorios durante el proceso del cáncer puede relacionarse a una función antitumoral de la inmunidad que ejerce la inmunovigilancia y la escultura inmunológica de la heterogeneidad tumoral. Al mismo tiempo, la inflamación protumoral promueve al cáncer a bloquear la inmunidad antitumoral, modelando el microambiente tumoral hacia un estado más tolerante al tumor y ejerciendo señales y funciones directas que promueven el tumor en las células epiteliales y cancerosas (Greten & Grivennikov, 2019).

Una de las terapias ampliamente utilizadas contra el cáncer son las quimioterapias, que ayudan a combatir a las células cancerosas, pero tienen repercusiones a nivel sistémico ya que este tipo de terapia no distingue entre células cancerosas y sanas, lo cual ocasiona un daño a otros tejidos provocando una elevación en citocinas proinflamatorias y ROS (Pusztai et al., 2004). Jeriel TR Keeney y colaboradores demostraron que el tratamiento con Doxorrubicina provoca una elevación en el estrés oxidativo a nivel sistémico, lo que ocasiona una elevación de ROS ocasionando una oxidación de la Apolipoproteína AI (ApoA-I) promoviendo así una elevación plasmática de TNF- $\alpha$ , ya que se ha demostrado que ApoA-I suprime al TNF- $\alpha$  (Keeney et al., 2018). Se tiene el conocimiento que la administración de agentes quimioterapéuticos como la Doxorrubicina y el metotrexato provocan la liberación de moléculas proinflamatorias que pueden llegar a elevar el estado inflamatorio y repercutir a diversos órganos, uno de los cuales es el sistema nervioso central. Erin M. Gibson y colaboradores reportaron los efectos del metotrexato en la neurogénesis, ya que observaron que el tratamiento induce una reactividad a un estado MI en la microglía condicionando un estado de neurotoxicidad, esto provocado por las moléculas proinflamatorias a nivel sistémico (Gibson et al., 2019a). Por otro lado, Barret D. Allen y colaboradores reportaron que la elevación de TNF- $\alpha$  sistémico provoca su

interacción con la barrera hematoencefálica y la reactividad a un estado M1 de la microglía, y promoviendo un estado neuro inflamatorio y conduciendo a un deterioro cognitivo inducido por quimioterapia (Allen et al., 2019).

#### 2.4 Barrera hematoencefálica

La barrera hematoencefálica (Blood Barrier-brain o BBB) es el límite crítico entre el sistema nervioso central (SNC) y la periferia, su función es proteger el SNC de la exposición a sustancias potencialmente dañinas en la circulación sistémica, histológicamente, la BBB es una unidad especializada de múltiples capas compuesta por un glucocálix continuo grueso, células endoteliales no fenestradas con actividad vesicular reducida y unidas por uniones estrechas, dos membranas basales (membrana basal vascular y glía limitante) y patas terminales astrocíticas (Mccaffrey & Davis, 2012). A nivel molecular, hay ectoenzimas, receptores y transportadores en varias de estas capas que regulan o invierten el tráfico a través de la barrera hematoencefálica, juntos estos componentes permiten un entorno estable del SNC, este microambiente es único por su composición iónica singular, grupo de neurotransmisores especializados, baja exposición a toxinas sistémicas, tráfico reducido de células y moléculas inflamatorias, esto cuando se mantiene la homeostasis entre especies reactivas y antiinflamatorias. La permeabilidad en el tráfico de sustancias a través de la barrera hematoencefálica puede ser disruptivo o no disruptivo, lo que refleja la presencia o ausencia de una interrupción física de la BBB, el cambio disruptivo se acompaña de cambios a nivel histológico, como daño de las células endoteliales o cambios en las uniones estrechas, mientras que el cambio no disruptivo ocurre a nivel molecular. En la inflamación sistémica pueden producirse cambios de la barrera hematoencefálica tanto disruptivos como no disruptivos, y ambos tienen consecuencias importantes (Aramvash et al., 2017).



**Figura 1. Cambios disruptivos y no disruptivos en la barrera hematoencefálica.** (Aramvash et al., 2017)

## 2.5 Glía y su interacción con la barrera hematoencefálica

En condiciones homeostáticas, el sistema nervioso central se considera ampliamente como un sitio inmunológicamente privilegiado y su entorno está bien controlado y equilibrado debido a la presencia de la unidad neurovascular (NVU), que comprende células endoteliales especializadas (CE), pericitos, membranas basales y glía de soporte, como astrocitos y microglía, la NVU actúa como barrera hematoencefálica y restringe la entrada de leucocitos periféricos y el movimiento de factores solubles hacia el SNC. Las células de la glía componen entre el 33 al 66 % de la masa cerebral total, se conocen cuatro subgrupos que componen la glía, estas son microglía, astrocitos, oligodendrocitos y progenitores NG2-glía (Lécuyer et al., 2016). La microglía son las células inmunocompetentes y fagocíticas del sistema nervioso que no se originan en el tejido ectodérmico como todas las demás células gliales, sino de progenitores del saco vitelino

que solo pueblan el cerebro durante el desarrollo del SNC es por ello que expresan muchos marcadores celulares comunes con macrófagos / monocitos periféricos, la microglía cubre un gran volumen del parénquima cerebral con dominios individuales no superpuestos que detectan constantemente el entorno a través de movimientos rápidos de sus finos filopodios, que reaccionan a cualquier tipo de agresión, esta agresión puede ser por moléculas asociadas a la inflamación que pueden difundirse a través de la membrana hematoencefálica (Kettenmann et al., 2011; S. U. Kim & de Vellis, 2005).

Los astrocitos representan la fracción más abundante de tipos de células gliales en el cerebro adulto, los progenitores de astrocitos migran para llegar a su área cerebral, las funciones más importantes de los astrocitos abarcan el mantenimiento de la homeostasis del agua y los iones, participan en la sinapsis tripartita, así como en el mantenimiento de la barrera hematoencefálica (Kimelberg, 2010; Kimelberg & Nedergaard, 2010). Los astrocitos maduros expresan algunos genes enriquecidos en células progenitoras, lo que sugiere que pueden retener el potencial proliferativo, teniendo en cuenta la heterogeneidad de la población celular, por ello se debe tener en consideración a este tipo de células en neuropatías (Siracusa et al., 2019).

## 2.7 Interacción entre sistema inmune periférico y el Sistema Nervioso Central (SCN)

El *crosstalk* entre el sistema inmune periférico y la microglía se ha descrito en la esclerosis lateral amiotrófica y en un conjunto de condiciones para neurodegeneración, y aunque el mecanismo no se ha descifrado completamente, se cree que las ROS, las citocinas y las quimiocinas juegan un papel central al reclutar y activar las células inmunes. La interacción de la microglía y las moléculas liberadas por las células inmunes periféricas hace que el SNC pierda homeostasis, lo que ocasiona una activación por parte de las células residentes de tejido cerebral del sistema inmune provocando alteraciones cognitivas (Ren et al., 2019). Se reconoce que hay una existencia de la comunicación bidireccional entre el cerebro y el sistema inmunológico periférico a través de la barrera hematoencefálica que es un sincitio estrictamente regulado de células endoteliales con bajas propiedades de transporte transcelular y paracelular que rodean los vasos cerebrales y protegen el delicado microambiente neuronal de sustancias neurotóxicas. El transporte endotelial esta estrictamente regulado a través de interacciones con astrocitos, pericitos,

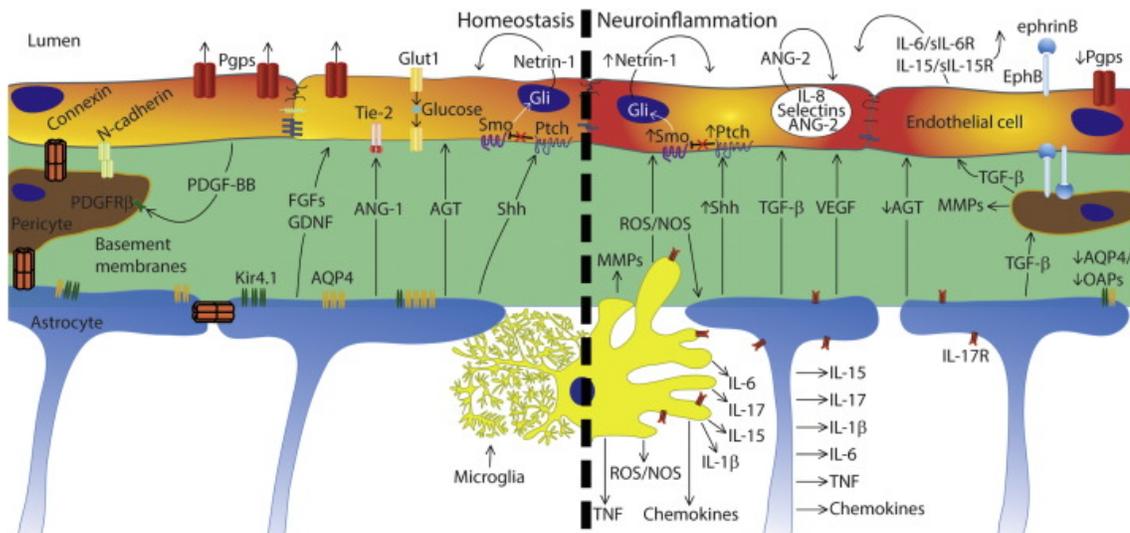
microglía y la membrana basal, que juntos forman una unidad neurovascular que constituye la barrera hematoencefálica (Haruwaka et al., 2019). Cuando existe una infección o inflamación periférica aumenta la permeabilidad de la barrera hematoencefálica estos datos son reportados en modelos de neuroinflamación animal de la enfermedad de Alzheimer (Takeda et al., 2013), también se han observado en el deterioro cognitivo inducido por quimioterapia en pacientes con cáncer de mama postratamiento (van der Willik et al., 2018).

El sistema inmune periférico tiene un fuerte efecto en el cerebro, como lo demuestra la alta incidencia de delirio y fuerte aumento del riesgo de desarrollar demencia, enfermedad del Alzheimer, enfermedad de Parkinson, deterioro cognitivo, entre otras, después de infecciones sistémicas (Cunningham, 2013; Perry, 2004). Además, se ha observado deterioro cognitivo inducido por quimioterapia después del tratamiento con quimioterápicos (Briones & Woods, 2014). El cerebro tiene células inmunes como microglía, macrófagos y células dendríticas que, en respuesta a estímulos inflamatorios, pueden producir citocinas y prostaglandinas que pueden estimular los receptores neuronales y no neuronales, este también monitorea las respuestas inmunes periféricas mediante la estimulación de nervios aferentes, las vías humorales, el intercambio de citocinas a través de la barrera hematoencefálica y la activación del receptor de IL-1 en los macrófagos perivasculares y las células endoteliales de las vénulas cerebrales (Bennett et al., 2018).

## 2.6 Neuroinflamación

La neuroinflamación es un mecanismo de defensa inherente del huésped para proteger y restaurar la estructura y función normal del cerebro contra infecciones y lesiones, en las enfermedades neurodegenerativas, la inflamación inicialmente elimina la infección para controlar la gravedad y la progresión de la enfermedad favoreciendo la recuperación de las neuronas lesionadas, sin embargo, esta inflamación puede ser perjudicial ya que induce y/o agrava la neurodegeneración en el sistema nervioso central (Kielian, 2016; Lucas et al., 2006b). Las células gliales activadas liberan varias citocinas proinflamatorias, quimiocinas y especies reactivas de oxígeno (ROS) que median los mecanismos de enfermedades neurodegenerativas inducidas por neuroinflamación (Kempuraj et al., n.d.). La evidencia reciente respalda que los procesos neuro inflamatorios que involucran

células inmunes, células gliales y células neuronales son cruciales y fundamentales para comprender el origen o patogénesis de una enfermedad, también es un hecho que la inflamación periférica juega un papel importante en la neuroinflamación aumentando las respuestas inflamatorias del cerebro a través de varios mecanismos.



**Figura 2. Regulación paracrina y autocrina de la BBB durante la homeostasis y la inflamación** (Lécuyer et al., 2016).

A primera vista, el cáncer y la neurodegeneración parecen encontrarse en extremos opuestos del espectro del mecanismo de la enfermedad, ya que el cáncer implica una resistencia anormal mientras que la neurodegeneración implica una susceptibilidad anormal a la muerte celular. La mayoría de los agentes quimioterapéuticos inducen muerte celular regulada, un mecanismo por el que la célula activa su propia maquinaria para autodestruirse. Las quimioterapias dañan a las células inmunitarias, de manera indirecta, al aumentar la producción de citocinas y ROS, lo que puede activar a las células inmunitarias periféricas, residentes de tejido del hígado y cerebro (Kegel et al., 2015). El sistema nervioso central está protegido por la barrera hematoencefálica, sin embargo, algunas quimioterapias aumentan la producción de TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 y ROS que pueden atravesar la BBB e interactuar directamente con el cerebro, provocando apoptosis, necroptosis, activación de células microgliales, astrocitos y oligodendrocitos ocasionando un aumento de la neurotoxicidad y neuroinflamación que se dirige a una neurodegeneración y senescencia celular (Dingezweni, 2020; Monje & Dietrich, 2012).

## 2.7 Neurodegeneración y Patologías asociadas

La edad, infección y la inflamación sistémica de carácter agudo o crónico son circunstancias que pueden desembocar en la activación de las células de la microglía provocando neuroinflamación y neurotoxicidad por parte de las moléculas asociadas a la inflamación. La enfermedad neurodegenerativa es la disfunción progresiva y la pérdida de neuronas en el sistema nervioso central (SNC), estas incluyen la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP) y la esclerosis múltiple (EM) (Qiuyu Yang, 2020). La enfermedad de Alzheimer (EA) es el trastorno neurodegenerativo más común en todo el mundo, y su principal manifestación clínica es la demencia progresiva (Organization, 2020). Se caracteriza por la incapacidad de formar nuevos recuerdos, lo que refleja la disfunción del sistema de memoria episódica. La EA se asocia con cambios neuropatológicos como la formación de agregados tau vistos como ovillos neurofibrilares intraneuronales y presencias de placas extracelulares beta amiloide ( $A\beta$ ). Se demostró que la microglía activada está presente en regiones del cerebro donde hay deposición  $A\beta$  y pérdida neuronal, que culmina en deterioro de la memoria (Kumar, 2018). Los datos publicados mostraron que la administración crónica de LPS produjo deterioro de la memoria espacial en ratones Sprague Dawley y ratas Fisher (Batista et al., 2019).

Otra patología asociada a la neuroinflamación es la enfermedad de Parkinson (EP), caracterizada por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta (SNpc), lo que resulta en un trastorno del movimiento (Batista et al., 2019). Los pacientes con EP familiar presentan mutaciones en genes como los que codifican  $\alpha$ -sinucleína, parkina, PINK1, DJ-1, LRRK2 y Htra2, sin embargo, los pacientes raramente muestran síntomas de la EP por estas mutaciones. Por lo anterior, se ha asociado a la inflamación con estas enfermedades, como la neuroinflamación, siendo una de las principales causas y/o agravamiento de enfermedades neurodegenerativas como EP o EA (Jeong et al., 2010).

El deterioro cognitivo inducido por quimioterapia a menudo denominado “Chemobrain” es una patología que está asociada a pacientes que han sido tratados con quimioterapias, tales como doxorubicina o epirubicina, en donde se presentan deficiencias en varios aspectos de la memoria y la función ejecutiva. Las estimaciones de la prevalencia del deterioro cognitivo relacionado con la quimioterapia son del 16% al 85%, en donde se

puede observar una elevación en el estrés oxidativo y aumento de moléculas asociadas a la inflamación lo cual provocan un estado de reactividad en la microglía ocasionando una neuroinflamación (Briones & Woods, 2014; Keeney et al., 2018).

## 2.8 Terapias utilizadas para enfermedades neurodegenerativas

La reutilización de fármacos es una tendencia creciente en el descubrimiento de fármacos, esto significa encontrar nuevas aplicaciones terapéuticas tanto para los medicamentos existentes como para los medicamentos emergentes y esto es uno de los principales enfoques para encontrar pistas de moléculas pequeñas para nuevas aplicaciones terapéuticas. Recientemente ha aumentado el interés en la reutilización de fármacos, especialmente en nuevas terapias de combinación. La ventaja es la menor necesidad de inversión en el descubrimiento y optimización de fármacos, así como en estudios de seguridad y farmacocinética, ya que los perfiles de los fármacos reutilizados ya están establecidos (Durães et al., 2018). Con la creciente necesidad de tratamiento para enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington, Esclerosis múltiple y esclerosis lateral amiotrófica se ha propuesto probar la combinación de los medicamentos existentes y buscar nuevas moléculas con propiedades inmunomoduladores y antioxidantes (Yahfoufi et al., 2018).

### 2.8.1 Compuestos Inmunomoduladores

#### 2.8.1.1 Sintéticos

Es importante el uso de inmunomoduladores de la inflamación para reducir de manera significativa el progreso de la enfermedad. El uso de antiinflamatorios y antioxidantes de carácter farmacológico son de las drogas más usadas en la actualidad para combatir la progresión de enfermedades crónicas, donde se observa una elevada actividad por parte de las células inmunitarias por la exposición de DAMPs, ocasionando una producción de moléculas asociadas a la inflamación que provocan un desequilibrio en la homeostasis del paciente. Los glucocorticoides son sustancias lipofílicas de bajo peso molecular que pueden atravesar fácilmente las membranas celulares y unirse al receptor de glucocorticoides en el citosol, uno de los efectos que tienen los glucocorticoides es inhibir la vía de NF- $\kappa$ B mediante la interacción directa o indirecta con este factor de transcripción, ocasionan la supresión de la producción de citocinas proinflamatorias y prevención e inhibición de la activación de células T y monocitos/macrófagos, también estas drogas

activan la producción de citocinas antiinflamatorias y reguladoras, tal como la IL-10 (Strehl et al., 2019). Los hallazgos reportados muestran claramente que el conocimiento sobre el mecanismo de acción de los glucocorticoides como agentes inmunomoduladores es todavía insuficiente (Strehl et al., 2019).

#### 2.8.1.2 Extractos Naturales

Otro inmunomodulador que se ha reportado que regula la inmunidad son los polifenoles que interfieren con la regulación de las células inmunitarias, la síntesis de citocinas proinflamatorias y la expresión génica. Estos compuestos inactivan el NF- $\kappa$ B y modulan las rutas de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPk) y los ácidos araquidónicos, inhiben fosfatidilinositol 3-quinasa/ proteínas quinasa B (PI3K/Akt), inhibidor de kappa quinasa/ quinasa amino-terminales c-Jun (IKK/JNK), suprimen la expresión del receptor tipo toll (TLR) y genes proinflamatorios. El efecto antioxidante de los polifenoles radica en que inhiben ciertas enzimas involucradas en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como la xantina oxidasa y la NADPH oxidasa (NOX) mientras que regulan positivamente otras enzimas antioxidantes endógenas como superóxidos dismutasa (SOD), catalasa y glutatión (GSH) peroxidasa (Px). Además, inhiben la fosfolipasa A2 (PLA2), la ciclooxigenasa (COX) y la lipoxigenasa (LOX), lo que conduce a la reducción en la producción de prostaglandinas (PG) y leucotrienos (LT) y al antagonismo de la inflamación. Los efectos de estos compuestos biológicamente activos en el sistema inmunológico están asociados con beneficios para la salud extendidos para diferentes enfermedades inflamatorias crónicas (Yahfoufi et al., 2018).

#### 2.8.2 ICRP

La actual problemática de inflamación sistémica ya sea aguda o crónica, que conlleva a la formación de enfermedades neurodegenerativas manifiesta la inquietante búsqueda de nuevos neuro inmunomoduladores. Diversos estudios han demostrado que el IMMUNEPOTENT CRP (ICRP), un extracto dializable de leucocitos obtenido de bazo desintegrado de bovino, es clínicamente capaz de modificar la respuesta inmune en un amplio espectro de enfermedades, mediante su efecto antioxidante y antiinflamatorio afectando la vía de señalización de I $\kappa$ B y los factores de transcripción como NF- $\kappa$ B modulando el proceso de la inflamación. Estudios reportan que el ICRP modula la producción NO y citocinas proinflamatorias en macrófagos murinos peritoneales tratados

con LPS y en células mononucleares de sangre periférica humanas tratadas con LPS, por medio de la regulación y modulación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y NRF2 (Franco-Molina et al., 2005; Moisés A. Franco-Molina, 2011). Teniendo estos reportes sobre el efecto inmunomodulador del ICRP se propone que este puede tener el mismo efecto sobre células de la microglía y astrocitos activados con LPS, sabiendo que son células inmunitarias residentes de tejido presentes en neuroinflamación en enfermedades como Parkinson y Alzheimer.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La inflamación sistémica provocada por eventos patológicos o interacción con agentes quimioterapéuticos produce una sobreproducción de moléculas asociadas a la inflamación como ROS y NOS que pueden interactuar con células de la microglía al atravesar la barrera hematoencefálica ocasionando daño, neurotoxicidad y neuroinflamación. Investigaciones afirman que del 17% al 75% de pacientes sobrevivientes de cáncer de mama presentan un cuadro clínico de deterioro cognitivo inducido por quimioterapia al ser tratados con Doxorubicina. Además, se ha observado que pacientes con Leucemia linfoblástica aguda tratados con metotrexato produce una activación de la microglía y disminución de la neurogénesis y produce daño neuronal. En este sentido, reportes afirman que agentes quimioterapéuticos como doxorubicina, epirubicina y metotrexato activan al sistema inmune produciendo una elevación del estrés oxidativo, producción de citocinas proinflamatorias, ROS y NOS, las cuales llegan a inducir un estado de neurotoxicidad, disminución de la neuro plasticidad y neurogénesis, además de neuroinflamación y daño. Dado que existe una comunicación entre el sistema inmune periférico y la microglía mediante la liberación de citocinas y ROS, además de modificación de la barrera hematoencefálica, se ha propuesto el estudio de agentes inmunomoduladores que puedan regular el proceso inflamatorio y además proteger a células inmunitarias. En ese sentido, el IMMUNEPOTENT CRP, un extracto de leucocitos dializable obtenido de bazo de bovino, ha demostrado poseer un efecto protector e inmunomodulador, modulando la producción de óxido nítrico (NO), ROS y citocinas proinflamatorias en macrófagos murinos peritoneales y en células mononucleares de sangre periférica humanas tratadas con LPS. Bajo esta perspectiva, en este proyecto se propone evaluar el efecto protector del IMMUNEPOTENT CRP sobre células de sistema inmune periférico y células de microglía tratadas con quimioterapias y LPS a fin de proponer nuevas terapias que puedan resolver el proceso neuroinflamatorio y el daño que ocasiona la sobreproducción de moléculas asociadas a la inflamación y la microglía reactiva.

#### **4. HIPÓTESIS GENERAL**

El IMMUNEPOTENT-CRP induce un efecto protector sobre células del sistema inmune y células de microglía ante un estímulo de daño inducido con quimioterapias y LPS.

## **5. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto protector del ICRP sobre células del sistema inmune y células de microglía ante un estímulo de daño inducido por quimioterapia y LPS.

### **5.1 Objetivos específicos**

- Determinar el efecto citotóxico inducido con quimioterapia y LPS sobre células del sistema inmune periférico y microglía.
- Evaluar el efecto protector del ICRP sobre células del sistema inmune periférico y células de microglía tratadas con quimioterapia y LPS.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Cultivo Celular**

La línea celular de microglía primaria SIM-A9, se obtuvo del banco de línea celular del Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV) de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Las células se trataron bajo los lineamientos de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA. USA), cultivadas en medio GIBCO™ Dulbecco's Eagle's modificado (DMEM-F12) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% previamente inactivado a 56°C durante 30 min, 2 mmol/L de l-glutamina y antibiótico al 1% de penicilina-estreptomicina (GIBCO by Life Technologies, Gran Island, NY, USA), evitando la contaminación de los cultivos celulares y medios. Las células se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmosfera controlada de humedad y 5% de CO<sub>2</sub> en frascos para cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> (CORNING®).

Para realizar el mantenimiento, después de retirar el medio DMEM, se realizó un lavado del frasco de cultivo con las células, utilizando un buffer de fosfatos salinos (PBS) a un pH de 7.2, posteriormente se adicionó una solución salina amortiguada con fosfato que contiene 1mM de EDTA, 1mM de EGTA y solución de glucosa 1 mg/mL como solución de despegue. La suspensión celular recuperada se centrifugó por 10 min a 1350 rpm, se realizó un conteo celular en una cámara de Neubauer mediante tinción con azul tripán (solución 0.4% SIGMA ALDRICH®) observándolas en un microscopio óptico (Zeiss Primo Star) y ajustando las células para el desarrollo del experimento correspondiente.

### **6.2 IMMUNEPOTENT CRP**

El IMMUNEPOTENT CRP® (ICRP) es elaborado y distribuido por el Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV) de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) de la Universidad Autónoma de Nuevo León. El ICRP es una mezcla de péptidos de bajo peso molecular de 10-13 kDa obtenidas de la diálisis de bazo desintegradas con agua y liofilizadas obteniendo 15 X 10<sup>8</sup> leucocitos equivalentes a una unidad de ICRP. El extracto fue disuelto en medio suplementado DMEM-F12 para una concentración de 4 U/mL y almacenado a 4°C hasta su utilización.

### **6.3 Lipopolisacáridos**

El lipopolisacárido (LPS) es un componente característico de la pared celular de las bacterias Gram-negativas. Una molécula de LPS típica tiene lípido A (un fosfolípido basado en glucosamina), un oligosacárido de núcleo relativamente corto y un polisacárido distal (antígeno O).

El producto adquirido en Sigma Aldrich es extraído de *Escherichia coli* serotipo O111:B4. La cepa fuente es de una colección privada. Este serotipo de LPS se ha utilizado para estimular las células del sistema inmune e inducir el óxido nítrico sintasa (NOS) en hepatocitos humanos (Sigma-aldrich, n.d.).

### **6.4 Agentes Quimioterapéuticos**

El producto doxorubicina obtenido de la farmacéutica Accord en donde cada vial contiene 50mg/ 25 mL de compuesto activo. Este compuesto se almacenó entre 2°C a 8°C y se conservó el vial en el embalaje exterior para protegerlo de la luz.

El hidrocloreuro de epirrubicina (farmorubicina) fue obtenido de la farmacéutica Pfizer® como clorhidrato de Epirrubicina en donde cada vial contiene 50 mg del compuesto activo. Este compuesto debe ser almacenado de 2°C a 8°C y conservado en su embalaje exterior protegido de la luz exterior.

El metotrexato (Fesaxate®) obtenido de la farmacéutica Fresenius Kabi contiene 50 mg de metotrexato como molécula bioactiva diluida en el vehículo de 2 mL. El Fesaxate® debe de almacenarse a una temperatura de 2°C a 8°C y conservarse en su embalaje exterior protegido de la luz exterior.

### **6.5 Animales**

Para el proyecto se utilizaron aproximadamente 120 ratones machos y hembras de 8-12 semanas de edad de la cepa BALB/c los cuales serán proporcionados por el bioterio del Laboratorio de Inmunología y Virología de la UANL donde también se alojarán. Se mantuvieron en jaulas microventiladas con acceso a agua y alimento ad libitum con un ciclo luz/oscuridad de 12 h, a una temperatura ambiental controlada de 22 °C y humedad relativa de 45%. Se enriqueció su ambiente con tubos de cartón para la creación de nidos y recreación del murino.

Todos los procedimientos de trabajo con los animales cumplen con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y han sido sometidos para su revisión por el Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas (CEIBA) UANL, con número de registro CEIBA-2021-016.

### **6.5.1 Extracción de células de bazo**

Se realizó la eutanasia de ratones de 8 a 10 semanas de nacidos con 200 mg/Kg (dosis letal) de pentobarbital (ARANDA®) en condiciones saludables para extraer el bazo. Se localizó el bazo en la parte alta de la cavidad abdominal en forma ovoide y alargada, triangular en secciones transversales, próximo al diafragma, se cortó el tejido conectivo teniendo precaución de no dañar el órgano, y se extrajo el bazo conservándolo en un tubo con RPMI 1640. (SCIENTIFIC, Thermo Fisher, s.f.)

Para obtener las células del bazo, se realizó una perfusión del órgano con jeringa. Posteriormente se centrifugaron las células a 500 G durante 10 min a 15°C desechando el sobrenadante, por último, se resuspendió el sedimento celular en RPMI 1640 ajustando la concentración celular a  $4 \times 10^5$  células/ 100µL para utilización en el experimento correspondiente. (SCIENTIFIC, Thermo Fisher, s.f.)

### **6.5.2 Sangre periférica**

Para extraer una muestra de 1 mL de sangre periférica de ratón por punción cardiaca se realizó la eutanasia con 200 mg/Kg mL (Dosis letal) de pentobarbital (ARANDA®) de ratones de la cepa BALB/c de 8 a 10 semanas de nacidos en tubos de EDTA, para la separación de células por gradiente de densidad en tubos cónicos conteniendo un volumen de polymorphprep™ a temperatura ambiente, en una proporción 1:1. Una vez realizada la dilución, se centrifuga por 30 min a 400 G en una centrifuga plana sin freno. Se visualizó la formación de capas celulares, de las cual se tomó la población correspondiente a PBMC y PMNC. Finalmente, las células se contaron con cámara de Neubauer y se mantienen en medio de cultivo RPMI 10% (GIBCO) ajustando la concentración celular a  $1 \times 10^5$  célula/ 100 µL para utilización en el experimento correspondiente.

### **6.5.3 Extracción de células de médula ósea**

Para obtener la médula ósea se realizó la eutanasia con 200 mg/Kg mL (dosis letal) de pentobarbital (ARANDA®) de ratones de 8 a 10 semanas de nacidos en condiciones saludables para extraer médula ósea. Se localizaron las extremidades traseras de los ratones de donde se aislaron los fémures, se cortó el musculo y tejido fibroso del hueso, y se realizó una sepsis con etanol al 70% (SCIENTIFIC, ThermoFisher SCIENTIFIC).

Para obtener células de medula ósea una vez que se ha retirado del fémur, se filtró y perfundió con jeringa de insulina tres veces utilizando medio RPMI (GIBCO) y se centrifugó a 500 G a temperatura ambiente durante 10 min, el sedimento se resuspendió a la concentración requerida en medio RMPI (GIBCO) para hacer un conteo celular en cámara de Neubauer (SCIENTIFIC, ThermoFisher SCIENTIFIC).

### **6.6 Evaluación de la muerte celular por ensayo de exclusión con Azul de tripano**

Para determinar el porcentaje de muerte celular en la concentración citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>) sobre células de médula ósea, bazo, PBMCs y leucocitos de las quimioterapias de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato, se planteó utilizar el ensayo de exclusión con azul de tripano. El compuesto Azul de tripano es un colorante que tiñe de color azul a la célula, cuando se pierde la integridad de la membrana plasmática.

Para este ensayo, cultivos de células de médula ósea, bazo, PBMCs y leucocitos de ratones BALB/c se sembraron a una concentración  $2 \times 10^5$  células/ 100µL, empleando placas de 96 pozos de fondo plano (CORNING®). Se adicionaron 5 µM de epirrubicina, 20 µM de doxorubicina y 5 mM de metotrexato, además, de 100 µg/ mL de LPS y su combinación con el ICRP (0.25 U/mL) ajustando las concentraciones a un volumen final de 100 µL/pozo, y se incubó durante 24 h. Al término del periodo de incubación, se recuperaron las células de médula ósea, bazo, PBMCs y leucocitos en microtubo de 1.5 mL (eppendorf) y se centrifugaron a 400 G durante 10 min. El sedimento se resuspendió en 100 mL de PBS y se tomaron 20 mL de las células en suspensión. Se adicionaron 20 mL del reactivo azul de tripano en una relación de 1:1 V/V (Solución 4%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se colocó en cámara de Neubauer donde se contabilizó el número de células vivas (sin teñir) y muertas (teñidas de color azul) localizadas en los cuadrantes

superiores e inferiores. Al término del conteo se realizó el cálculo del porcentaje de muerte celular mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de muerte celular (\%)} = \frac{\text{número de células muertas}}{\text{números de células totales}} \times 100$$

Ecuación 1.- Fórmula para cuantificación del porcentaje de muerte celular.

Para el ensayo con cultivo de microglía, se sembraron células SIM-A9 a una concentración de  $5 \times 10^3$  células/ 100  $\mu\text{L}$ , empleando placas de 96 pozos de fondo plano (CORNING®) se incubaron durante una noche para su adhesión bajo una atmósfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$ , a  $37^\circ\text{C}$ . Se adicionaron epirrubicina (  $\text{CC}_{50}$  de 0.06 mM,  $\text{CC}_{20}$  de 0.01 mM y subletal de 0.003 mM), doxorubicina ( $\text{CC}_{50}$  de 1 mM,  $\text{CC}_{20}$  de 0.25 mM y subletal de 0.05 mM), metotrexato ( $\text{CC}_{50}$  de 0.08 mM,  $\text{CC}_{20}$  de 0.005 mM y subletal de 0.0001 mM) y LPS (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y su combinación con el ICRP (0.25 U/ mL) ajustando las concentraciones a un volumen final de 100  $\mu\text{L}/\text{pozo}$ , y se incubó durante 24 h. Al término del periodo de incubación, se recuperaron las células SIM-A9 en microtubo de 1.5 mL (eppendorf) y se centrifugaron a 400 G durante 10 min. El sedimento se resuspendió en 100 mL de PBS y se tomaron 20 mL de las células en suspensión. Se adicionaron 20 mL del reactivo azul de tripano en una relación de 1:1 V/V (Solución 4%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se colocó en cámara de Neubauer donde se contabilizó el número de células vivas (sin teñir) y muertas (teñidas de color azul) localizadas en los cuadrantes superiores e inferiores. Al término del conteo se realizó el cálculo del porcentaje de muerte celular mediante la fórmula de la ecuación 1

### **6.7 Análisis por citometría de flujo**

La citometría de flujo es una tecnología biofísica que utiliza luz láser para el recuento y clasificación de células de acuerdo con sus características morfológicas o presencia de marcadores de superficie e intracelulares (McKinnon, 2019).

En esta técnica las células se mantienen suspendidas en un fluido y atraviesan un tubo sobre el que incide un rayo de luz láser, la luz transmitida y dispersada por el pasaje de las células a través del tubo se detecta, y las sustancias químicas fluorescentes que se

encuentran dentro o adheridas a la célula son excitadas hasta emitir luz a una longitud de onda mayor que la de la fuente de excitación, la fluorescencia también es recogida por los detectores; permitiendo inferir tamaño, complejidad y características físicas y químicas de las células individualmente.

Para alcanzar los objetivos propuestos en este estudio, se utilizaron los siguientes marcadores de fluorescencia:

- Diacetato 2,7-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA) (Análisis de estrés oxidativo). Canal FL1.
- 4-Amino-5-Methylamino-2,7-Difluorofluorescein diacetate (DAF-FM) (Análisis de estrés oxidativo). Canal FL 1.

Los cuáles serán descritos ampliamente más adelante en esta sección. Para cada uno de los análisis fueron consideradas 10,000 células por muestra.

### **6.7.1 Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Para evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno de células SIM-A9, médula ósea, bazo y leucocitos ante un estímulo con 100 µg/ mL de LPS y CC<sub>50</sub> de doxorubicina, epirubicina y metotrexato, se realizó un ensayo basado en la disociación de grupos acetato por parte de las esterasas intracelulares y la oxidación del diacetato 2,7-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA), el cual es un método colorimétrico que permite calcular las especies reactivas de oxígeno (ROS), en particular medir el peróxido de hidrogeno, en un cultivo. Esta técnica se basa en que las células que producen especies reactivas de oxígeno (ROS) por medio de algún estímulo extracelular tienen la capacidad de disociar grupos acetato por medio de las esterasas intracelulares y oxidar el H<sub>2</sub>DCFDA (Invitrogen™) convirtiendo al compuesto en 2,7-diclorofluoresceína (DCF) que es altamente fluorescente.

Para este ensayo, los cultivos de células de médula ósea, bazo y leucocitos se sembraron a una concentración de 2 x10<sup>5</sup> células/ 100 µL, empleando placas de 96 pozos de fondo plano (CORNING®). Se adicionó LPS (100 µg/ mL), epirubicina (5 µM), doxorubicina (20 µM) y metotrexato (5 mM) y la combinación con ICRP (0.25 µg/ mL), ajustando las

concentraciones a un volumen final de 100  $\mu\text{L}$ / pozo, se incubaron durante 24 h en una atmósfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$ , a  $37^\circ\text{C}$ . Al término de la incubación, se recuperaron las células y se agregaron 0.02 mM de DCFDA con PBS por muestra, y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 min. Posterior del periodo de incubación, se lavó y centrifugó a 400 G durante 10 min y finalmente se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de PBS por muestra para resuspender el precipitado, se determinó la cantidad de ROS producido por las células SIM-A9 mediante citometría de flujo mediante el citómetro Accuri C6 (BD bioscience).

La línea celular de SIM-A9 se sembraron a una concentración de  $3.5 \times 10^4$  células/ 100  $\mu\text{L}$ , empleando placas de 24 pozos de fondo plano (CORNING®), se incubaron durante una noche para su adhesión bajo una atmósfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$ , a  $37^\circ\text{C}$ . Se adicionó LPS (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), epirubicina (1  $\mu\text{M}$ ), doxorubicina (1  $\mu\text{M}$ ) y metotrexato (80 nM) y la combinación con ICRP (0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), ajustando las concentraciones a un volumen final de 200  $\mu\text{L}/\text{pozo}$ , se incubaron durante 2, 6 y 24 h. Al término de la incubación, se recuperaron las células y se agregaron 0.02 mM de DCFDA con PBS por muestra, y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 min. Posterior del periodo de incubación, se lavó y centrifugó a 400 G durante 10 min y finalmente se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de PBS por muestra para resuspender el precipitado, se determinó la cantidad de ROS producido por las células SIM-A9 mediante citometría de flujo mediante el citómetro Accuri C6 (BD bioscience).

### **6.7.2 Evaluación de la producción de óxido nítrico**

Para evaluar la producción de óxido nítrico de células de SIM-A9 ante un estímulo con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS, además, CC20 y dosis SL de doxorubicina, epirubicina y metotrexato, de igual manera, células de médula ósea, bazo y leucocitos con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS y CC20 de Doxorubicina, Epirubicina y Metotrexato. Se realizó un ensayo basado en la desacetilación por parte de las esterasas intracelulares y la reacción con el NO con 4-Amino-5-Methylamino-2,7-Difluorofluorescein diacetate (DAF-FM) formando un benzotriazol fluorescente, el cual es un método colorimétrico que permite calcular el óxido nítrico en un cultivo. Esta técnica se basa en que las células que producen óxido nítrico (NO) por medio de algún estímulo extracelular tienen la capacidad de desacetilar por medio de la esterasa intracelular y reaccionar con NO el compuesto DAF-

FM (Invitrogen™) convirtiendo al compuesto en benzotriazol fluorescente que es altamente fluorescente.

Para este ensayo, las células médula ósea, bazo y leucocitos se sembraron a una concentración de  $2 \times 10^5$  células/ 100  $\mu$ L empleando placas de 96 pozos de fondo plano (CORNING®). Se adicionó epirrubicina (2  $\mu$ M), doxorubicina (3  $\mu$ M), metotrexato (5  $\mu$ M) y LPS (100  $\mu$ g/mL), ajustando las concentraciones a un volumen final de 100  $\mu$ L/pozo, y se incubaron durante 24 h a una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Posteriormente se retiró el medio y se agregó 1.3  $\mu$ M de DAF-FM con PBS por muestra, se incubó a 37°C durante 30 min. Al término de la incubación se lavó 2 veces con 100  $\mu$ L de PBS. Por último, se resuspendió el precipitado con 100  $\mu$ L de PBS, se determinó la cantidad de NOS producido por las células de médula ósea, bazo y leucocitos mediante citometría de flujo mediante el citómetro Accuri C6 (BD bioscience).

Para las células SIM-A9 se sembraron a una concentración de  $3.5 \times 10^4$  células/ 100  $\mu$ L empleando placas de 24 pozos de fondo plano (CORNING®) y se incubaron durante una noche para su adhesión bajo una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Se adicionó epirrubicina (0.25  $\mu$ M y 0.1  $\mu$ M), doxorubicina (0.25  $\mu$ M y 0.1  $\mu$ M), metotrexato (1 nM y 0.5 nM), LPS (100  $\mu$ g/ mL) e ICRP (0.25 U/ mL) y su combinación, ajustando las concentraciones a un volumen final de 200  $\mu$ L/ pozo, y se incubaron durante 2, 6 y 24 h. Posteriormente se retiró el medio y se agregó 1.3  $\mu$ M de DAF-FM con PBS por muestra, se incubó a 37°C durante 30 min. Al término de la incubación se lavó 2 veces con 100  $\mu$ L de PBS. Por último, se resuspendió el precipitado con 100  $\mu$ L de PBS, se determinó la cantidad de NOS producido por las células de SIM-A9 mediante citometría de flujo mediante el citómetro Accuri C6 (BD bioscience).

### **6.8 Análisis en la implicación de ROS y caspasas en el mecanismo de protección inducido por epirrubicina, doxorubicina, metotrexato y LPS en combinación con ICRP**

Las células de médula ósea, bazo y leucocitos se sembraron en placa de 96 pozos de fondo plano (Corning)  $2 \times 10^5$  células/ 100  $\mu$ L, en un volumen final de 100  $\mu$ L en medio RPMI. Se adicionaron por separado los inhibidores NAC a 2.5  $\mu$ M (antioxidante) y QVD-OPH a

5 mM (inhibidor de la activación de un amplio espectro de caspasas) por 30 min. Se trataron con la  $CC_{50}$  de epirrubicina (5  $\mu$ M), doxorubicina (20  $\mu$ M), metotrexato (5 mM) y 100 mg/ mL de LPS en combinación con 0.25 U/ mL de ICRP y se incubaron durante 24 h bajo una atmósfera húmeda con 5% de  $CO_2$ , a 37°C. Al término del periodo de incubación, se recuperaron las muestras en microtubos de 1.5 mL (Eppendorf) y posteriormente las células se centrifugaron a 400 G por 10 min, transcurrido el tiempo de centrifugación, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en PBS, se tomó una muestra de 20 mL y se adicionó 20 mL del colorante azul de tripano en relación 1:1 (solución 0.4%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Finalmente, se cuantificó el porcentaje de muerte celular al contar las células vivas y muertas bajo el microscopio óptico (Zeiss Primo Star, Zeiss-Visión), utilizando la ecuación 1.

Las células SIM-A9 se sembraron en placa de 96 pozos de fondo plano (Corning)  $5 \times 10^3$  células/ 100  $\mu$ L, en un volumen final de 100  $\mu$ L en medio DMEM-F12. Se incubaron durante una noche para su adhesión bajo una atmósfera húmeda con 5% de  $CO_2$ , a 37°C. Se adicionaron por separado los inhibidores NAC a 2.5  $\mu$ M (antioxidante) y QVD-OPh a 5 mM (inhibidor de la activación de un amplio espectro de caspasas) por 30 min. Se trataron con la  $CC_{50}$  de epirrubicina (1  $\mu$ M), doxorubicina (1  $\mu$ M), metotrexato (80 nM) y 100 mg/ mL de LPS en combinación con 0.25 U/ mL de ICRP y se incubaron durante 24 h. Al término del periodo de incubación, se recuperaron las muestras en microtubos de 1.5 mL (Eppendorf) y posteriormente las células se centrifugaron a 400 G por 10 min, transcurrido el tiempo de centrifugación, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en PBS, se tomó una muestra de 20 mL y se adicionó 20 mL del colorante azul de tripano en relación 1:1 (solución 0.4%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Finalmente, se cuantificó el porcentaje de muerte celular al contar las células vivas y muertas bajo el microscopio óptico (Zeiss Primo Star, Zeiss-Visión), utilizando la ecuación 1.

## **6.9 Análisis estadístico**

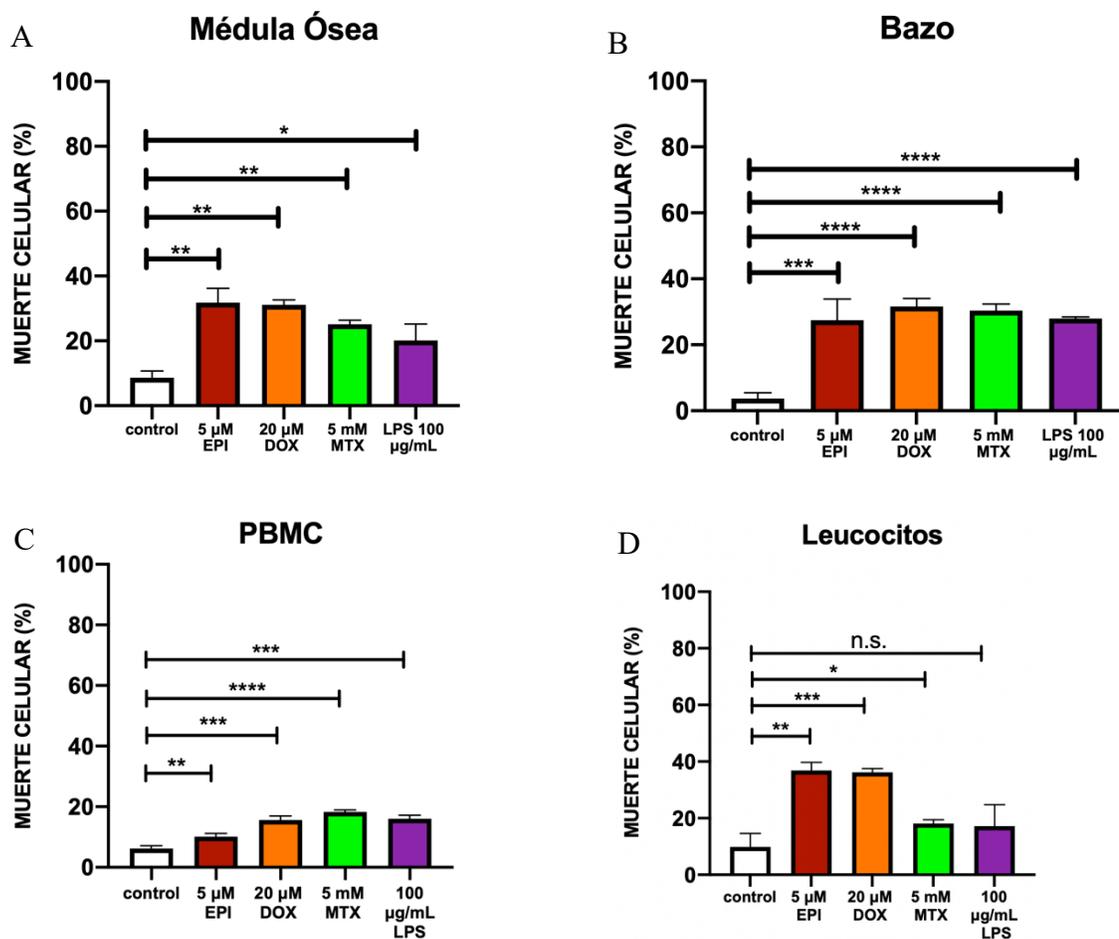
Los resultados se representan como gráficas que expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de cada variante de por lo menos tres experimentos independientes realizados por triplicado, utilizando la prueba estadística de T para muestras apareadas mediante el

software de GraphPad Prism (San Diego, CA) considerando significativos los valores de  $p$  menores a 0.05.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1 El LPS, epirubicina, doxorubicina y metotrexato tienen un efecto citotóxico sobre células de médula ósea, bazo, PBMCs y leucocitos.**

Para observar el efecto citotóxico del lipopolisacárido (LPS) y quimioterapias como epirubicina (EPI), doxorubicina (DOX) y metotrexato (MTX) sobre células de médula ósea, bazo, PBMCs y leucocitos murinos se llevó a cabo el tratamiento con epirubicina (5  $\mu$ M), doxorubicina (20  $\mu$ M), metotrexato (5 mM) y LPS (100  $\mu$ g/ mL) durante 24 h. Posteriormente, se utilizó la tinción de azul de tripano para evaluar el porcentaje de muerte celular. Se observa en la figura 3A que el tratamiento sobre células de médula ósea hay un incremento en el porcentaje de muerte en los tratamientos de epirubicina (rojo) de 30%, doxorubicina (naranja) de 30%, metotrexato (verde) de 25% y LPS (morado) de 20%, estos resultados pueden observarse en la figura 3B sobre células de bazo donde el tratamiento con epirubicina, doxorubicina, metotrexato y LPS aumentaron un 30% el porcentaje de muerte. De igual manera en la figura 3C sobre PBMCs en donde la epirubicina incremento 10%, doxorubicina 15%, metotrexato 20% y LPS 15% el porcentaje de muerte, por otro lado, en la figura 3D en leucocitos la epirubicina y doxorubicina aumentaron un 40% y metotrexato un 20% el porcentaje de muerte celular. Los resultados en la figura 3 muestran el efecto citotóxico del LPS y las quimioterapias sobre células de bazo, médula ósea, PBMC y leucocitos.



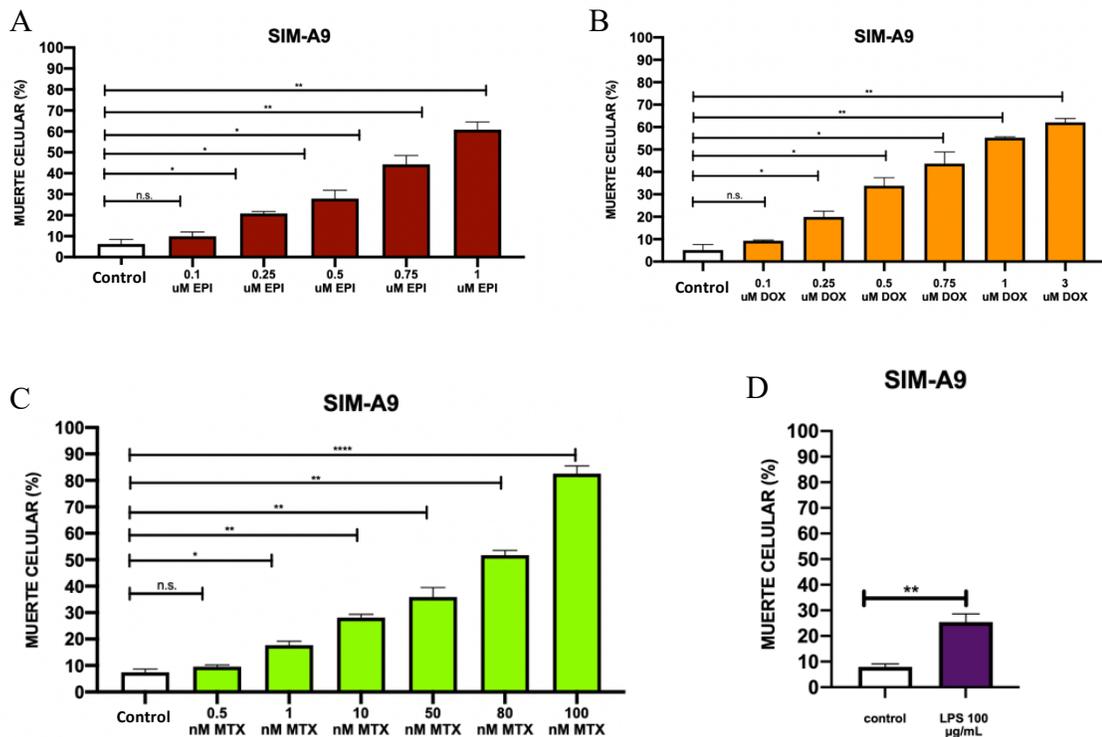
**Figura 3. Efecto citotóxico de LPS, epirrubicina, doxorubicina y metotrexato en células de bazo, médula ósea, PBMCs y leucocitos durante 24 h.**

Las células de médula ósea (A), bazo (B), PBMCs (C) y leucocitos (D) murinas fueron tratadas durante 24 h con 5  $\mu$ M epirrubicina, 20  $\mu$ M doxorubicina, 5 mM metotrexato y 100  $\mu$ g/mL Lipopolisacárido. El porcentaje de muerte celular se evaluó utilizando la tinción de azul de tripano y fue observado por microscopía. Las gráficas representan la media  $\pm$  desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado. El análisis estadístico utilizado fue t-student en donde ns (no significativo), \* ( $p < 0.05$ ), \* ( $p < 0.01$ ), \*\* ( $p < 0.001$ ), \*\* ( $p < 0.0001$ ).

## 7.2 El tratamiento con LPS, epirrubicina, doxorubicina y metotrexato tiene un efecto citotóxico dependiente de la concentración en células de SIM-A9.

La línea celular de microglía murina inmortalizada SIM-A9 son células que se encuentran en estado de transición por lo cual son utilizadas frecuentemente para estudiar los efectos de fármacos y mecanismos de acción. Para observar el efecto citotóxico sobre las células

de SIM-A9 del tratamiento a 24 h se utilizó 100  $\mu\text{g/mL}$  de LPS y diferentes concentraciones de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato. Se puede observar en la figura 4A que el tratamiento con epirrubicina muestra un aumento gradual dependiente de la concentración del tratamiento obteniendo una concentración citotóxica 50 ( $CC_{50}$ ) de 1  $\mu\text{M}$ , una concentración citotóxica 20 ( $CC_{20}$ ) de 0.25  $\mu\text{M}$  y una concentración sub-lethal (SL) de 0.1  $\mu\text{M}$ . De igual manera podemos observar que el tratamiento con doxorubicina en la figura 4B aumenta gradualmente dependiente de la concentración obteniendo las mismas concentraciones  $CC_{50}$ ,  $CC_{20}$  y SL que el tratamiento con epirrubicina. Por otro lado, el tratamiento con metotrexato en la figura 4C muestra el mismo aumento dependiente de la concentración obteniendo una  $CC_{50}$  de 80 nM,  $CC_{20}$  de 1 nM y SL de 0.5 nM. Por último, se observó el aumento en el porcentaje de muerte con nuestro control positivo de inflamación que es el LPS en la figura 4D. Los resultados muestran que incrementa el porcentaje de muerte celular en la línea celular SIM-A9 obteniendo un efecto dependiente de la concentración de nuestros tratamientos de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato, de igual manera, estos resultados permitieron determinar las concentraciones citotóxicas cincuenta ( $CC_{50}$ ), veinte ( $CC_{20}$ ) y la dosis sub-lethal (SL) en células de SIM-A9, las cuales se muestran en la tabla 1.



**Figura 4. Efecto citotóxico del LPS, epirrubicina, doxorubicina y metotrexato en células SIM-A9.**

Las células de SIM-A9 fueron tratadas durante 24 h con diferentes concentraciones de epirrubicina (A), doxorubicina (B), metotrexato (C) y 100 µg/ mL de LPS (D). El porcentaje de muerte celular se evaluó utilizando una tinción con azul de tripano y fue analizado por microscopía. Las gráficas representan la media ± desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado, El análisis estadístico utilizado fue t-student en donde ns (no significativo), \* (p <0.05), \* (p < 0.01), \*\* (p < 0.001), \*\* (p < 0.0001).

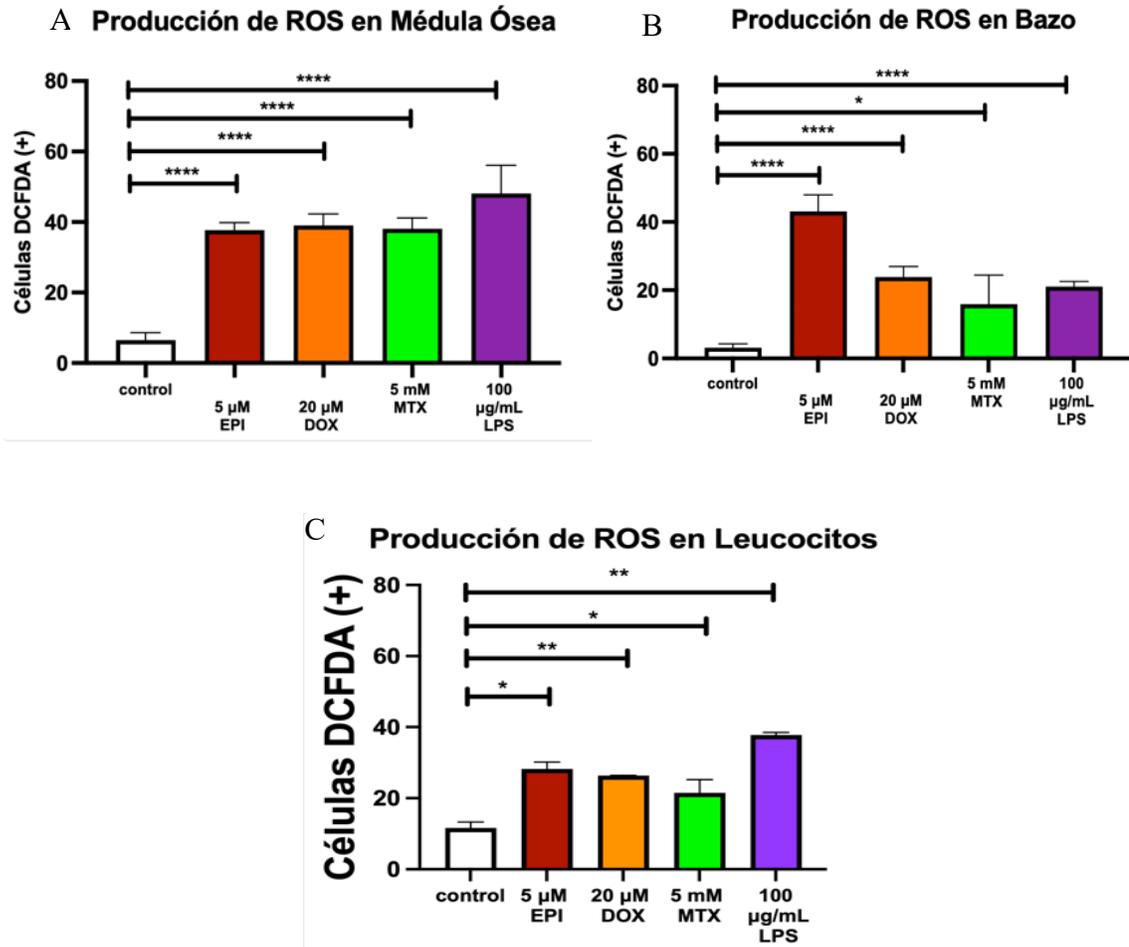
**Tabla 1. Concentraciones citotóxicas de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato en SIM-A9**

	SIM-A9		
	Epirrubicina	Doxorubicina	Metotrexato
CC <sub>1</sub>	0.1 µM	0.1 µM	0.5 nM
CC <sub>20</sub>	0.25 µM	0.25 µM	1 nM
CC <sub>50</sub>	1 µM	1 µM	80 nM

**7.3 El tratamiento con LPS, epirrubicina, doxorubicina y metotrexato inducen un aumento en la producción de ROS sobre células de médula ósea, bazo, leucocitos, y células SIMA-9.**

Para observar el efecto en la producción de ROS por las quimioterapias y LPS sobre células de médula ósea, bazo y leucocitos, se llevó a cabo el tratamiento con 100 µg/ mL de LPS, epirrubicina (5 µM), doxorubicina (20 µM) y metotrexato (80 nM) durante 24 h. Posteriormente, se evaluó la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) con la sonda H<sub>2</sub>DCFDA mediante citometría de flujo. Se puede observar en células de medula ósea en la figura 5A un incremento de células positivas a DCFDA en el tratamiento con 5 µM de epirrubicina de aproximadamente 40%, este mismo efecto se puede observar en los tratamientos de 20 µM de doxorubicina y 80 nM de metotrexato, sin embargo, se observa un aumento del 45% en el tratamiento con 100 µg/mL de LPS. Por otro lado, se muestra en la figura 5B un incremento de células de bazo positivas a DCFDA en el tratamiento con 5 µM epirrubicina del 40%, un incremento del 30% en el tratamiento con 20 µM de doxorubicina, un incremento del 20% en el tratamiento con 80 nM de metotrexato y un 25% en el tratamiento con 100 µg/mL de LPS. Por último, se observa en la figura 5C un incremento de leucocitos positivos a DCFDA en el tratamiento con 5

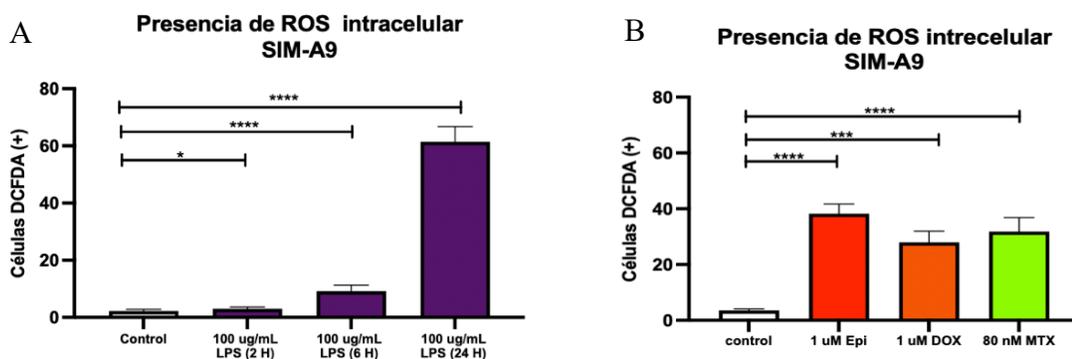
$\mu\text{M}$  de epirrubicina de aproximadamente el 30%, este porcentaje se observó de igual manera en el tratamiento con  $20 \mu\text{M}$  de doxorrubicina, además, se muestra un incremento aproximadamente del 20% con 5 mM metotrexato y un 40% con  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS. Los resultados muestran que los tratamientos inducen una elevación de células positivas a DCFDA con respecto a nuestro control sin tratamiento.



**Figura 5. Efecto del tratamiento con LPS, epirrubicina, doxorrubicina y metotrexato sobre la producción de ROS de células de médula ósea, bazo y leucocitos.**

Las células de médula ósea (A), bazo (B) y leucocitos (C) fueron tratadas durante 24 h con  $5 \mu\text{M}$  de epirrubicina,  $20 \mu\text{M}$  de doxorrubicina, 5 mM de metotrexato y  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS. La producción de Especies reactivas de oxígeno (ROS) se evaluó utilizando la sonda H2DCFDA mediante citometría de flujo. Las gráficas representan la media  $\pm$  desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado, El análisis estadístico utilizado fue t-student en donde ns (no significativo), \* ( $p < 0.05$ ), \* ( $p < 0.01$ ), \*\* ( $p < 0.001$ ), \*\*\* ( $p < 0.0001$ ).

Posteriormente se evaluó el efecto en la producción de ROS inducido por las quimioterapias y LPS sobre células SIM-A9. Para ello se llevó a cabo el tratamiento con LPS durante 2, 6 y 24 h y la CC<sub>50</sub> en SIM-A9 de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato durante 24 h, y se evaluó la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) con la sonda de H<sub>2</sub>DCFDA mediante citometría de flujo. Se observa en la gráfica 6A una elevación de células de SIM-A9 positivas a DCFDA dependiente del tiempo en el tratamiento con 100 µg/mL de LPS. Por otro lado, en la gráfica 6B se muestra un aumento de células de SIM-A9 positivas a DCFDA al término de las 24 h de incubación en donde se observa un incremento del 40% en el tratamiento con 1 µM de epirrubicina, un 30% con 1 µM de doxorubicina y 35% con 80 nM de metotrexato. Estos resultados muestran que el tratamiento con nuestro control con LPS aumenta la cantidad de células positivas a DCFDA con respecto al tiempo y se observa un incremento del 60% al término de las 24 h de incubación. De manera similar el tratamiento a las 24 h con quimioterapias induce una elevación de ROS pero menos a lo presentado en nuestro control positivo con LPS.

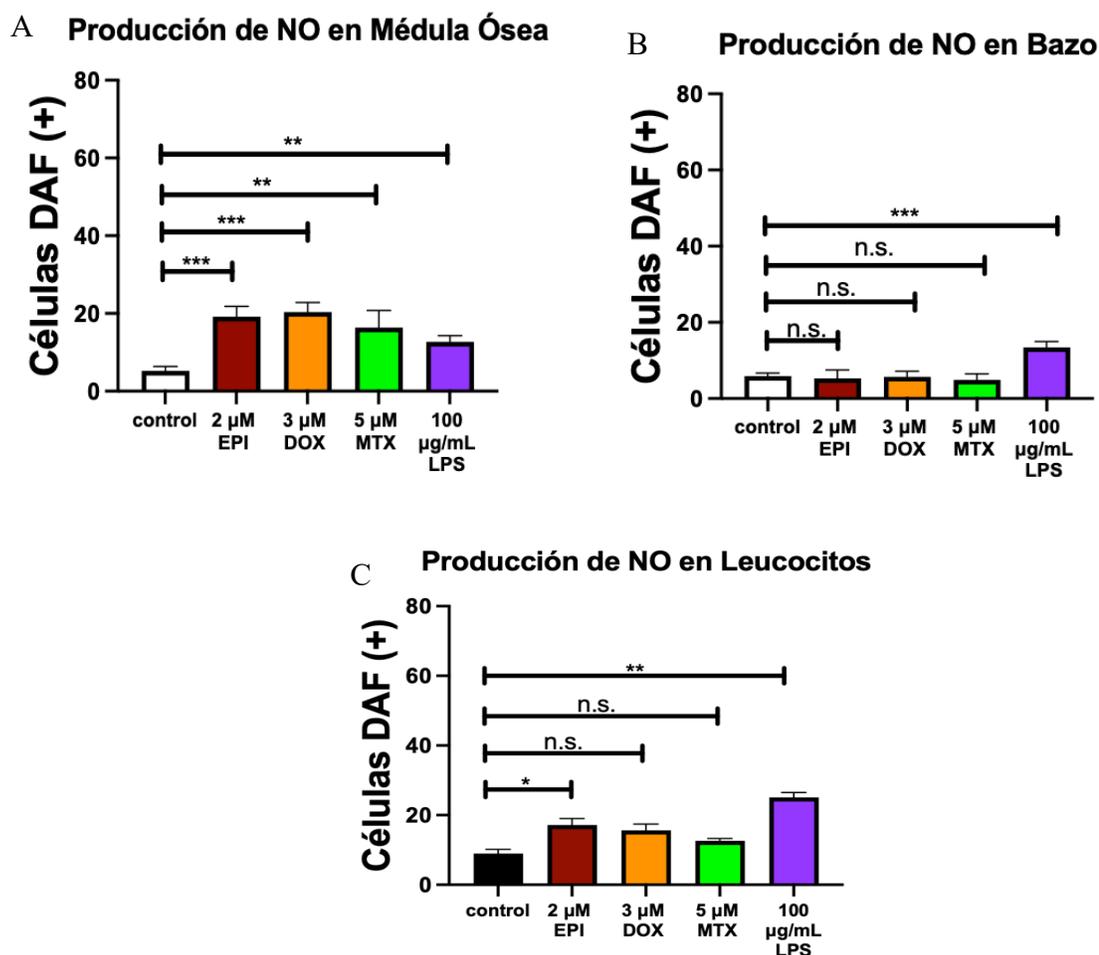


**Figura 6. Efecto tratamiento con LPS, epirrubicina, doxorubicina y metotrexato sobre la producción de ROS de células SIM-A9.**

La línea celular de microglía murina SIM-A9 fue tratada durante 2, 6 y 24 h con LPS (A), o con la CC<sub>50</sub> de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato (B) en células SIM-A9. La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se evaluó utilizando la sonda H<sub>2</sub>DCFDA mediante citometría de flujo. Las gráficas representan la media ± desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado. El análisis estadístico utilizado fue t-student en donde ns (no significativo), \* (p < 0.05), \*\* (p < 0.01), \*\*\* (p < 0.001), \*\*\*\* (p < 0.0001).

#### **7.4 El LPS, epirrubicina, doxorubicina y metotrexato inducen una elevación significativa de la producción de NOS en células de médula ósea, bazo, leucocitos y SIM-A9.**

Para observar la presencia de NO en las células de médula ósea, bazo y leucocitos se trataron con LPS (100 µg/mL), epirrubicina (2 µM), doxorubicina (3 µM) y metotrexato (5 µM). Se dejó transcurrir un tiempo de incubación 24 h y se evaluó la presencia de NO con la sonda de DAF-FM mediante citometría de Flujo. Se observa en la figura 7A una elevación de células de médula ósea en donde se muestra un incremento al 20% en el tratamiento con la CC<sub>20</sub> de epirrubicina y doxorubicina, por otro lado, el tratamiento con CC<sub>20</sub> de metotrexato se incrementó un 15%, mientras que el tratamiento con 100 µg/ mL se elevó un 10%. Por otro lado, en la figura 7B se puede observar que el tratamiento con la CC<sub>20</sub> de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato no se observó una elevación significativa de células de bazo positivas a DAF, sin embargo, el tratamiento con 100 µg/ mL de LPS elevó un 20% las células de bazo positivas de DAF. Por último, se puede observar en la figura 7C una elevación del 20% de leucocitos positivos a DAF en el tratamiento con 2 µM de Epirrubicina y un 30% en el tratamiento con 100 µg/ mL de LPS, sin embargo, no se observó una elevación significativa en los tratamientos con la CC<sub>20</sub> de doxorubicina y metotrexato.

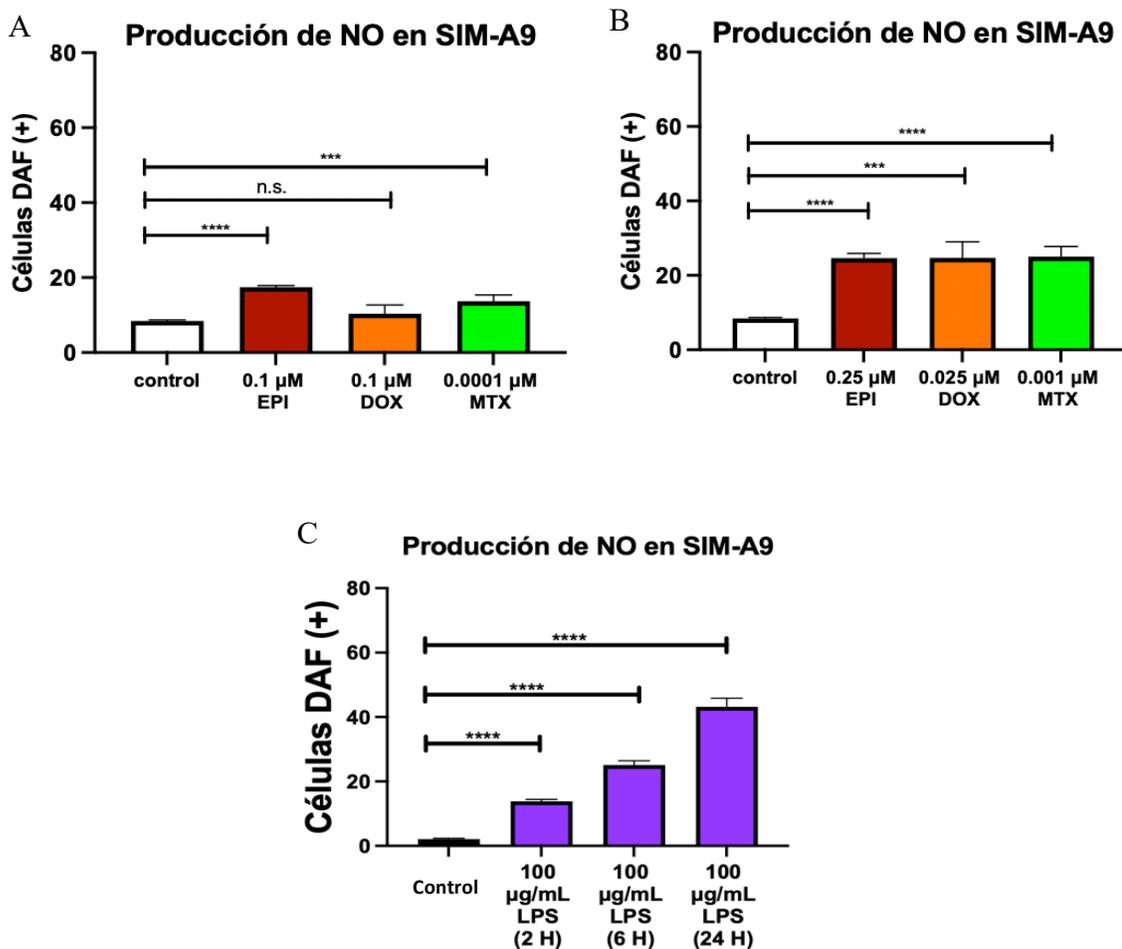


**Figura 7. Efecto de LPS, epirrubicina, doxorubicina y metotrexato sobre la producción de NO en células de médula ósea, bazo y leucocitos.**

Las células de médula ósea (A), bazo (B) y leucocitos (C) fueron tratada durante 24 h con LPS, epirrubicina, doxorubicina y metotrexato. La producción de óxido nítrico (NO) se evaluó utilizando la sonda DAF-FM y fue evaluada por citometría de flujo. Las gráficas representan la media  $\pm$  desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado. El análisis estadístico utilizado fue t-student en donde ns (no significativo), \* ( $p < 0.05$ ), \* ( $p < 0.01$ ), \*\* ( $p < 0.001$ ), \*\* ( $p < 0.0001$ ).

Estudios han reportado que la sobreproducción de Óxido Nítrico (NO) en el sistema nervioso central produce una neurotoxicidad y activación de células de la glía, como la microglía. Posteriormente, para observar la presencia de NO en las células SIMA-9 de se trataron con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS durante 2, 6 y 24 h, además con  $\text{CC}_{20}$  y dosis sub-lethal de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato durante 24 h. Se puede observar en la figura

8A una elevación de células de SIM-A9 positivas a DAF con una dosis sub-letal de epirrubicina y metotrexato de aproximadamente 20 y 15% respectivamente, sin embargo, no se observa esta elevación significativa en el tratamiento con 0.1  $\mu\text{M}$  de doxorubicina. De igual manera, se muestra en la figura 8B una elevación significativa de células de SIM-A9 positivas a DAF de aproximadamente un 30% en el tratamiento con  $\text{CC}_{20}$  de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato. Por último, se puede observar en la figura 8C una curva de tiempo de nuestro control positivo en donde se observa que la cantidad de células de SIM-A9 positivas a DAF aumenta dependiente del tiempo obteniendo un 40% de elevación a las 24 h del tratamiento con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS.



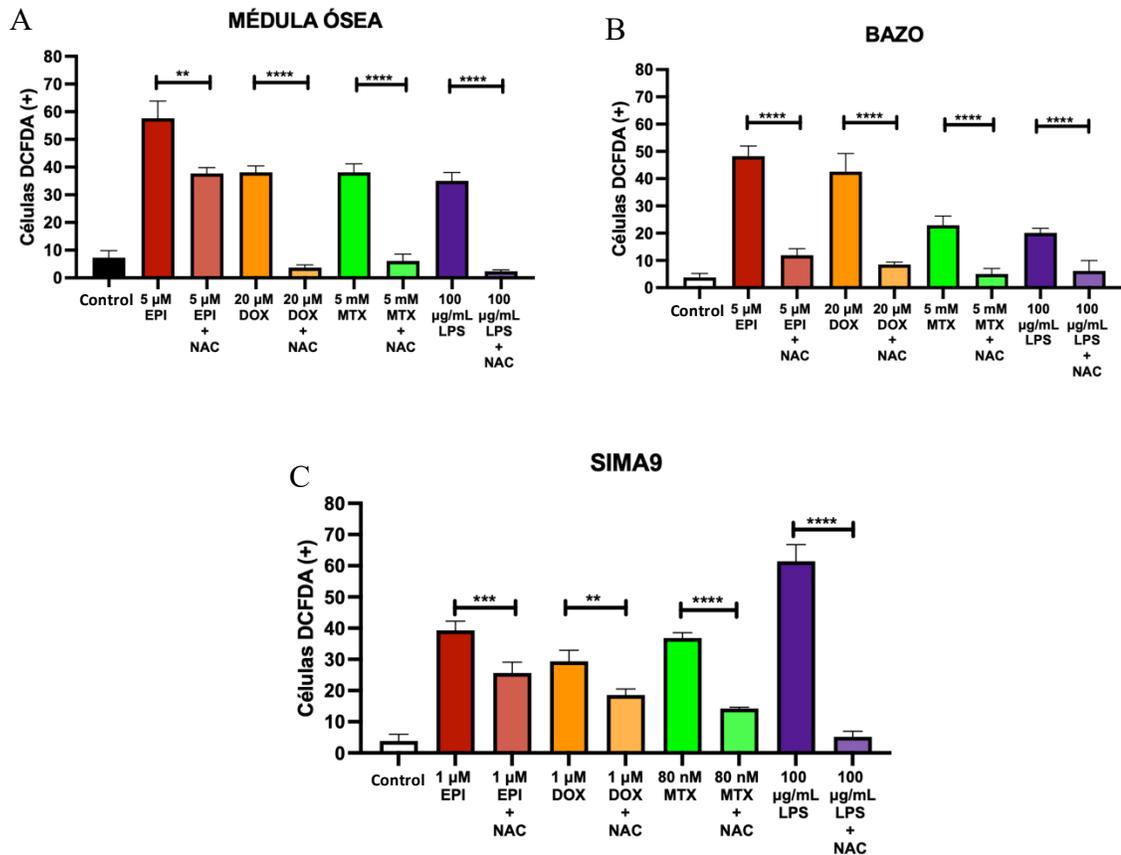
**Figura 8. Efecto de concentraciones subletales y CC<sub>20</sub> de epirrubicina, doxorubicina, metotrexato y curva de tiempo de LPS sobre la producción de NO en células SIM-A9.**

La línea celular de microglía murina SIM-A9 fue tratada durante 24 h con la concentración SL (A) y CC<sub>20</sub> (B) de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato, además, durante 2, 6 y 24 h con LPS (C). La producción de óxido nítrico (NO) se evaluó utilizando la sonda DAF-FM mediante citometría de flujo. Las gráficas representan la media  $\pm$  desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado, El análisis estadístico utilizado fue t-student en donde ns (no significativo), \* (p < 0.05), \* (p < 0.01), \*\* (p < 0.001), \*\* (p < 0.0001).

**7.5 El antioxidante NAC disminuye la producción de ROS inducida por epirrubicina, doxorubicina, metotrexato y LPS en células de médula ósea, bazo y SIM-A9.**

La N-Acetilcisteína (NAC) es una molécula que tiene como propiedad el eliminar radicales libres, mejorar la actividad de la enzima glutatión S-transferasa y glutatión, es por ellos que se considera una molécula antioxidante. Dado a que se conoce el potencial citotóxico de las ROS y sus implicaciones en la activación de vías de muerte se evaluó si el NAC podría reducir la producción de ROS sobre células de médula ósea, bazo y la línea celular SIM-A9. Para ello, primeramente, se pretrató con 2.5  $\mu$ M de NAC durante 30 min a 37°C, transcurrido el tiempo se trató con la concentración citotóxica de 100  $\mu$ g/ mL de LPS y la CC<sub>50</sub> de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato en células de médula ósea y bazo, y la CC<sub>50</sub> en SIM-A9 de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato para las células de SIM-A9, se dejó incubando durante 24 h. Al término de la incubación se recuperaron las células y se marcaron con la sonda H<sub>2</sub>DCFDA, una vez marcadas las células se analizaron mediante citometría de flujo. Se puede observar en los resultados de la gráfica de la figura 9A una disminución de células de médula ósea positivas a DCFDA de aproximadamente un 30% en los tratamientos de 100  $\mu$ g/ mL de LPS y la CC<sub>50</sub> de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato. De igual manera se observa en la figura 9B una disminución de células de Bazo positivas a DCFDA del 40% para los tratamientos de epirrubicina y doxorubicina, por otro lado, en los tratamientos con metotrexato y LPS se muestra una disminución de 10% de células de bazo positivas a DCFDA. Por último, se muestra en la figura 9C una disminución de células de SIM-A9 positivas a DCFDA en el pretratamiento con NAC sobre los tratamientos de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato de aproximadamente 15%, sin embargo, se observa una disminución del 50%

en el tratamiento con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pretratados con NAC. Los resultados muestran que el pretratamiento con NAC inhibe la producción de ROS en células de médula ósea, bazo y células de SIM-A9 en todos los tratamientos por lo cual se puede concluir que uno de los puntos de citotoxicidad de los tratamientos es mediante la elevación de los niveles de ROS.

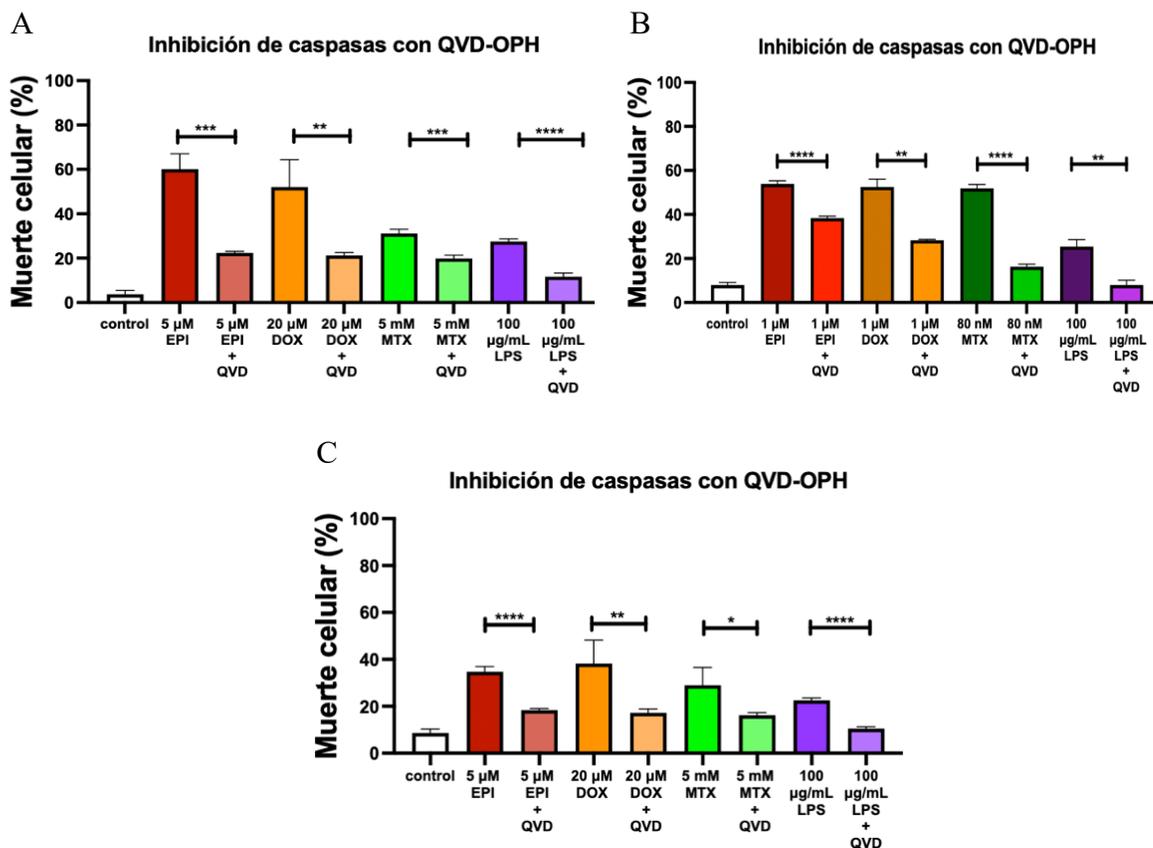


**Figura 9. Inhibición con NAC de la producción de ROS del tratamiento de LPS y la CC50 de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato sobre células de médula ósea y bazo, además de SIM-A9, respectivamente.**

Las células de médula ósea (A), bazo (B) y la línea celular de microglía murina SIM-A9 (C) fue pretratadas durante 30 min con 2.5  $\mu\text{M}$  de NAC, posteriormente se trató con LPS y la CC50 de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato, respectivamente, durante 24 h. La producción de Especies reactivas de oxígeno (ROS) se evaluó utilizando la sonda  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  mediante citometría de flujo. Las gráficas representan la media  $\pm$  desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado, El análisis estadístico utilizado fue t-student en donde ns (no significativo), \* ( $p < 0.05$ ), \* ( $p < 0.01$ ), \*\* ( $p < 0.001$ ), \*\*\* ( $p < 0.0001$ ).

## **7.6 El pretratamiento con QVD-Oph inhibe la muerte de células de médula ósea, bazo y SIM-A9 ante un estímulo con epirrubicina, doxorubicina, metotrexato y LPS.**

El inhibidor de caspasas de amplio espectro QVD es un compuesto ampliamente utilizado para inhibir a caspasas que tienen efecto en el proceso de la apoptosis. Debido a que una sobreproducción de ROS promueve la activación de caspasas se determinó evaluar si un inhibidor de amplio espectro podría inhibir el proceso de muerte en células de médula ósea, bazo y células de SIM-A9. Para ello, primeramente, se pretrataron las células con 5  $\mu$ M del inhibidor QVD-Oph durante 30 min, transcurrido el tiempo se trataron las células con la concentración citotóxica de LPS, también a las células de médula ósea y bazo con  $CC_{50}$  de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato, además se trataron con la  $CC_{50}$  en SIM-A9 de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato a las células de SIM-A9 durante 24 h. Al término de la incubación se determinó el porcentaje de muerte celular utilizando la tinción de azul de tripán mediante microscopía. En la figura 10A se puede observar una disminución del porcentaje de muerte celular en células de médula ósea pretratadas con QVD-Oph de aproximadamente un 40% esto en el tratamiento con  $CC_{50}$  de epirrubicina y doxorubicina, de igual manera, se observa una disminución de aproximadamente el 10% en los tratamientos con  $CC_{50}$  de metotrexato y 100  $\mu$ g/ mL de LPS. Por otro lado, se muestra en la Figura 10B una disminución del porcentaje de muerte celular en células de bazo pretratadas con QVD-Oph de aproximadamente un 10% en el tratamiento con epirrubicina, un 20% en el tratamiento con doxorubicina, un 30% en el tratamiento con metotrexato y un 15% en el tratamiento con LPS. Por último, se observa en la figura 10C una disminución del porcentaje de muerte en células de SIM-A9 pretratadas con QVD-Oph similar a las células de médula ósea pretratadas igualmente. Nuestros resultados muestran una disminución significativa del porcentaje de muerte celular en todos los tratamientos sobre células de médula ósea, bazo y SIM-A9, por lo cual se concluye que la muerte es dependiente de la activación de caspasas.



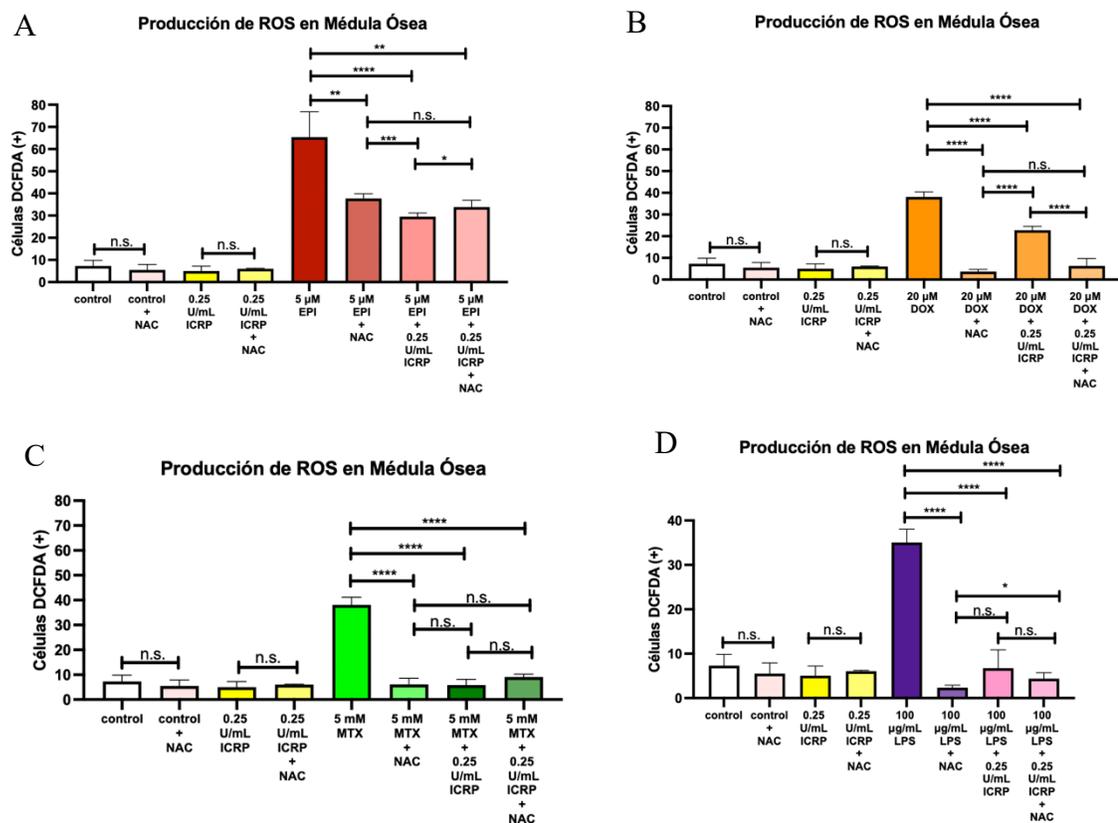
**Figura 10. Inhibición de la muerte en células de médula ósea, bazo y células de SIM-A9 ante un estímulo con LPS y CC<sub>50</sub> de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato.**

Las células de médula ósea (A), bazo (B) y células de SIM-A9 (C) fueron pretratadas con 5  $\mu$ M de QVD-Oph durante 30 min, transcurrido el tiempo se trataron durante 24 h con epirrubicina, doxorubicina, metotrexato y lipopolisacárido. El porcentaje de muerte celular se evaluó utilizando la tinción de azul de tripano mediante microscopía. Las gráficas representan la media  $\pm$  desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado, El análisis estadístico utilizado fue t-student en donde ns (no significativo), \* ( $p < 0.05$ ), \* ( $p < 0.01$ ), \*\* ( $p < 0.001$ ), \*\* ( $p < 0.0001$ ).

### **7.7 El ICRP reduce la presencia de ROS en células de médula ósea y bazo ante un estímulo con LPS y CC<sub>50</sub> de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato.**

El ICRP es un extracto de leucocitos dializable de bazo de bovino, que contiene cadenas de péptidos de bajo peso molecular. Las investigaciones que se han realizado referente a este extracto demarcan una actividad antioxidante en macrófagos peritoneales murinos, además de observarse un alza en la sobrevivencia de ratones con shock endotóxico. Para

observar el efecto antioxidante reportado del ICRP sobre células de médula ósea y bazo ante un estímulo con una concentración citotóxica de LPS y una  $CC_{50}$  de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato se cuantificó la presencia de ROS al combinar los tratamientos. Se llevó a cabo en un tiempo de 24 h en el tratamiento con LPS y  $CC_{50}$  de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato. Para cuantificar la producción de ROS se utilizó la sonda de  $H_2DCFDA$  mediante citometría de flujo. En la figura 11A se puede observar como el tratamiento con ICRP no eleva las células de médula ósea positivas a DCFDA, sin embargo, se muestra como el tratamiento con ICRP reduce aproximadamente un 30% de las células de médula ósea positivas a DCFDA que es mayor comparado con el pretratamiento de NAC en comparación con el tratamiento con 5  $\mu M$  de epirrubicina sin combinación con ICRP. Por otro lado, se muestran en la figura 11B el tratamiento con doxorubicina en combinación con ICRP y pretratamiento con NAC donde se observa como el ICRP en combinación con 20  $\mu M$  de doxorubicina disminuye el número de células de médula ósea positivas a DCFDA, sin embargo, esta disminución es menor comparada con el pretratamiento con NAC. De igual manera, se puede observar en la figura 11C el tratamiento con metotrexato en combinación con ICRP y pretratamiento con NAC, en donde se muestra como el ICRP disminuye aproximadamente un 30% de células positivas a DCFDA que comparado con el pretratamiento con NAC en combinación con 5 nM de metotrexato son muy similares las reducciones. Por último, se muestra en la figura 11D el tratamiento con LPS en combinación con ICRP y pretratamiento con NAC, donde se muestra que el ICRP disminuye las células positivas a DCFDA aproximadamente un 30%, de igual manera el pretratamiento con NAC disminuye el mismo porcentaje esto comparado con el tratamiento con 100  $\mu g/ mL$  de LPS sin combinación. Estos resultados muestran el efecto del ICRP sobre la activación de células positivas a DCFDA y se compara con un antioxidante que reduce la producción de ROS de una manera eficaz, concluyendo que el ICRP posee un efecto semejante o incluso mayor que el pretratamiento con NAC.

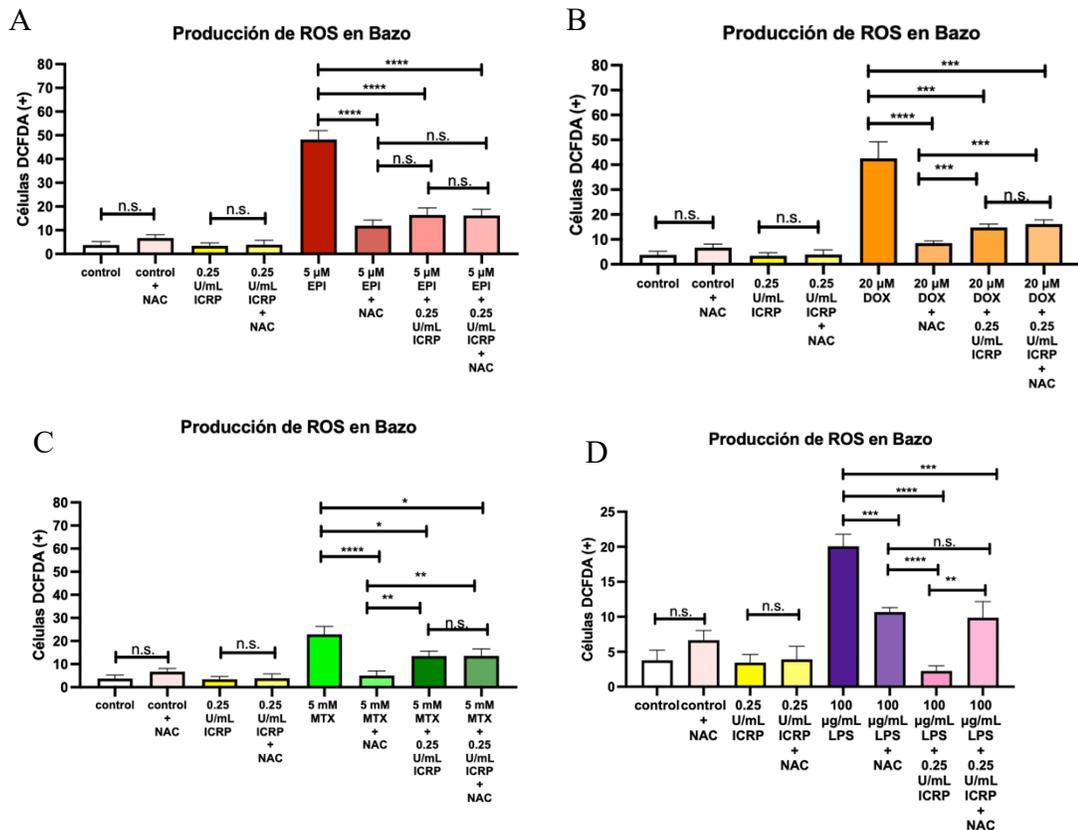


**Figura 11. Efecto del ICRP y NAC en la producción de ROS inducido por el tratamiento con LPS y epirrubicina, doxorubicina y metotrexato sobre células de Médula Ósea.**

Las células de médula ósea fueron pretratadas con 2.5 μM de NAC durante 30 min, transcurrido el tiempo se trataron durante 24 h con LPS (D) y con epirrubicina (A), doxorubicina (B) y metotrexato (C) e ICRP y su combinación. La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se evaluó utilizando la sonda H<sub>2</sub>DCFDA mediante citometría de flujo. Las gráficas representan la media ± desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado, El análisis estadístico utilizado fue t-student en donde ns (no significativo), \* (p < 0.05), \* (p < 0.01), \*\* (p < 0.001), \*\* (p < 0.0001).

Los resultados de bazo se muestran en la figura 12A una disminución de células de bazo positivas a DCFDA aproximadamente del 30% en el tratamiento con 5 μM de epirrubicina en combinación con ICRP, de manera similar se observa una disminución en el pretratamiento con NAC aproximadamente de 35%, sin embargo, no existen diferencias significativas en comparación con el tratamiento con ICRP y pretratamiento con NAC. De igual manera, se puede observar en la figura 12B el tratamiento con doxorubicina en combinación con ICRP y pretratamiento con NAC, en donde se muestra en la gráfica que

el ICRP reduce la cantidad de células de bazo positivas a DCFDA en el tratamiento con 20  $\mu\text{M}$  de doxorubicina, esto lo realiza de manera similar como el tratamiento con epirrubicina. Por otro lado, en la figura 12C se puede observar una disminución de células de bazo positivas a DCFDA con el tratamiento con ICRP en combinación con 5 nM metotrexato de aproximadamente del 10%, sin embargo, se observa que el pretratamiento con NAC en combinación con 5 nM de metotrexato disminuye aproximadamente 18% que es mayor que el tratamiento con ICRP. Por último, se observa en la figura 12D una disminución de células de bazo positivas a DCFDA tratadas con ICRP en combinación con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS aproximadamente del 15%, esta disminución es mayor que la observada en el pretratamiento con NAC en combinación con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS que fue aproximadamente del 10%. Estos resultados muestran que el tratamiento con 0.25 U/ mL de ICRP inducen un efecto semejante al pretratamiento con 2.5  $\mu\text{M}$  de NAC en combinación con la  $\text{CC}_{50}$  de epirrubicina, doxorubicina, metotrexato y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS.



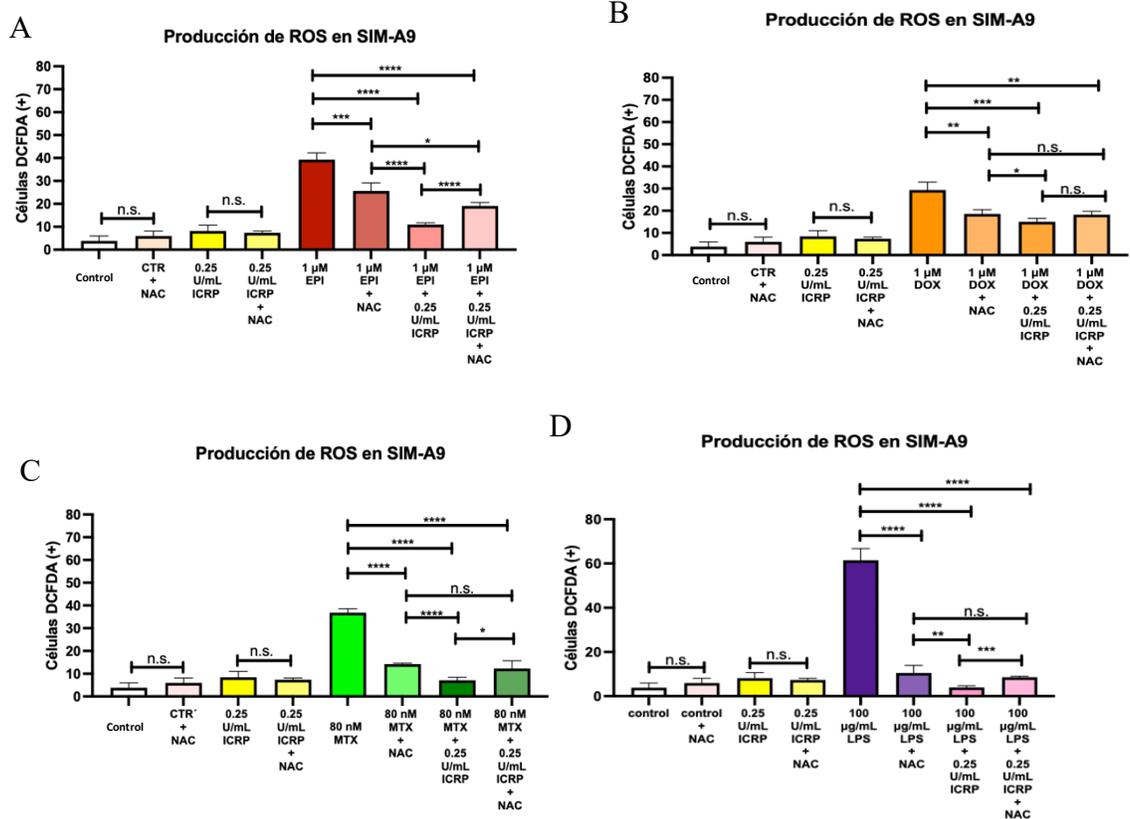
**Figura 12. Efecto del ICRP y NAC en la producción de ROS del tratamiento de LPS y la CC<sub>50</sub> de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato sobre células de bazo.**

Las células de bazo fueron pretratadas con 2.5  $\mu$ M de NAC durante 30 min, transcurrido el tiempo se trataron durante 24 h con LPS (D) y CC<sub>50</sub> de epirrubicina (A), doxorubicina (B) y metotrexato (C) e ICRP y su combinación. La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se evaluó utilizando la sonda H<sub>2</sub>DCFDA mediante citometría de flujo. Las gráficas representan la media  $\pm$  desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado, El análisis estadístico utilizado fue t-student en donde ns (no significativo), \* (p <0.05), \* (p < 0.01), \*\* (p < 0.001), \*\* (p < 0.0001).

**7.8 El ICRP reduce la presencia de ROS en células de SIM-A9 ante un estímulo con LPS y CC<sub>50</sub> en SIM-A9 de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato.**

Para observar el efecto antioxidante reportado del ICRP sobre células de SIM-A9 ante un estímulo con una concentración citotóxica de LPS y una CC<sub>50</sub> en SIM-A9 de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato se cuantificó la presencia de ROS al combinar los tratamientos. Se llevó a cabo en un tiempo de 24 horas en el tratamiento con 100  $\mu$ g/ mL de LPS y CC<sub>50</sub> de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato. Para cuantificar la producción de ROS se utilizó la sonda de H<sub>2</sub>DCFDA mediante citometría de flujo. Se puede observar en la figura 12 las gráficas de células de SIM-A9 positivas a DCFDA tratadas con 100  $\mu$ g/ mL de LPS y CC<sub>50</sub> de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato en combinación con 0.25 U/mL de ICRP y pretratadas con 2.5  $\mu$ M de NAC. Se muestra en la figura 13A una disminución de células de SIM-A9 positivas a DCFDA aproximadamente del 30% tratadas con 1  $\mu$ M de epirrubicina en combinación con ICRP, por otro lado, se puede observar una disminución menor en las células pretratadas con NAC. De igual manera, se puede observar en la figura 13B una disminución de células de SIM-A9 positivas a DCFDA de aproximadamente 15% en el tratamiento con 1  $\mu$ M de doxorubicina en combinación con ICRP, de igual manera se puede ver una disminución del 10% en el pretratamiento con NAC. Por otro lado, se observa en la figura 13C una disminución de células de SIM-A9 positivas a DCFDA aproximadamente del 35% en el tratamiento con 80 nM de metotrexato en combinación con ICRP, de igual manera se muestra una disminución de células de SIM-A9 positivas a DCFDA aproximadamente de un 25% en el pretratamiento con NAC. Por último, se puede observar en la figura 13D una disminución de células de SIM-A9 positivas a DCFDA aproximadamente de 55% en

el tratamiento con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS en combinación con ICRP, además, se muestra una reducción de células de SIM-A9 positivas a DCFDA aproximadamente del 45% en el pretratamiento con NAC. Todos los resultados muestran el efecto de una dosis protectora de ICRP al reducir la cantidad de células positivas a DCFDA que es aún mayor que el pretratamiento con 2.5  $\mu\text{M}$  de NAC.

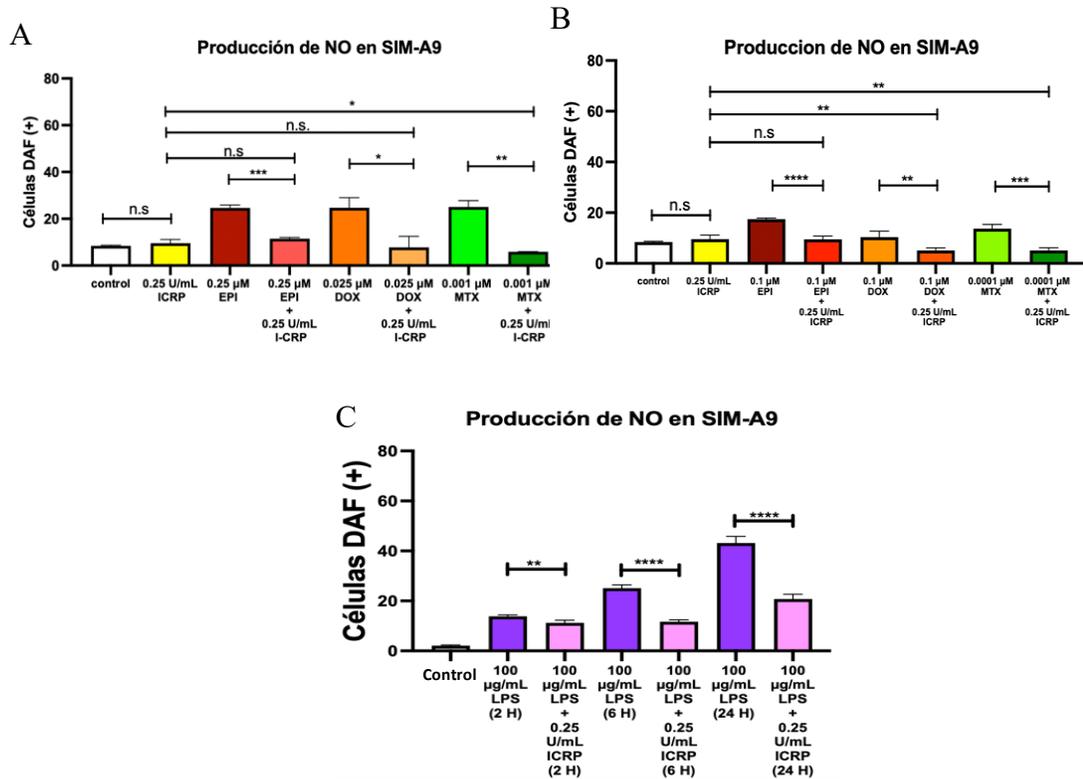


**Figura 13. Efecto del ICRP y NAC en la producción de ROS del tratamiento de LPS y la CC50 en SIM-A9 de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato sobre células de SIM-A9.**

La línea celular de SIM-A9 fueron pretratadas con 2.5  $\mu\text{M}$  de NAC durante 30 min, transcurrido el tiempo se trataron durante 24 h con LPS (D) y CC<sub>50</sub> en SIM-A9 de epirrubicina (A), doxorubicina (B) y metotrexato (C) e ICRP y su combinación. La producción de Especies reactivas de oxígeno (ROS) se evaluó utilizando la sonda H<sub>2</sub>DCFDA mediante citometría de flujo. Las gráficas representan la media  $\pm$  desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado, El análisis estadístico utilizado fue t-student en donde ns (no significativo), \* (p < 0.05), \* (p < 0.01), \*\* (p < 0.001), \*\* (p < 0.0001).

### **7.9 El ICRP disminuye la producción de NO en células de SIM-A9 ante un estímulo con LPS y diferentes dosis de Epirubicina, doxorubicina y metotrexato.**

En estudios realizados con el ICRP invitro en macrófagos peritoneales murinos y en macrófagos humanos ante un estímulo con LPS, se observó una reducción significativa en la producción de NO, la expresión de factores de transcripción como NF-kB y la fosforilación de IκB. Para continuar demostrando el efecto antioxidante del ICRP sobre células de SIM-A9 estimuladas con una concentración citotóxica de LPS y diferentes dosis de las quimioterapias seleccionadas se planteó cuantificar la presencia de óxido nítrico. Para ello, se llevó a cabo una incubación de 2, 6 y 24 h en el tratamiento con LPS y su combinación con el ICRP (A) y a 24 h en el tratamiento con dosis sub-letal (SL) (B) y CC20 (C) en SIM-A9 de epirubicina, doxorubicina y metotrexato e ICRP y su combinación. Para determinar la presencia de NO en las células de SIM-A9 se empleó la sonda de DAF-FM mediante citometría de flujo. Se puede observar en la figura 13 células de SIM-A9 positivas a DAF tratadas con CC<sub>20</sub> y SL de epirubicina, doxorubicina y metotrexato, además, 100 µg/ mL de LPS en combinación con ICRP. Se muestra en figura 14A una disminución de células positivas a DAF aproximadamente de 15% en el tratamiento con dosis SL de epirubicina (0.1 µM), este mismo efecto se vio en el tratamiento con 0.1 µM de doxorubicina y 0.5 nM de metotrexato, sin embargo, no se vio un incremento significativo en el tratamiento con ICRP sin combinación. En la figura 14B podemos observar una reducción del porcentaje de células positivas a DAF aproximadamente del 10% en el tratamiento con 0.25 µM de epirubicina en combinación con 0.25 U/ mL de ICRP, por otro lado, podemos observar una reducción de aproximadamente el 5% en el tratamiento con 0.25 µM de doxorubicina y 1 nM de metotrexato en combinación con ICRP. Por último, se observa en la figura 14C el aumento dependiente del tiempo de células de SIM-A9 positivas a DAF y la disminución de estas durante las 2, 6 y 24 h, dando una máxima reducción a las 24 horas del tratamiento con 100 µg/ mL de LPS en combinación con ICRP de aproximadamente 20 %.



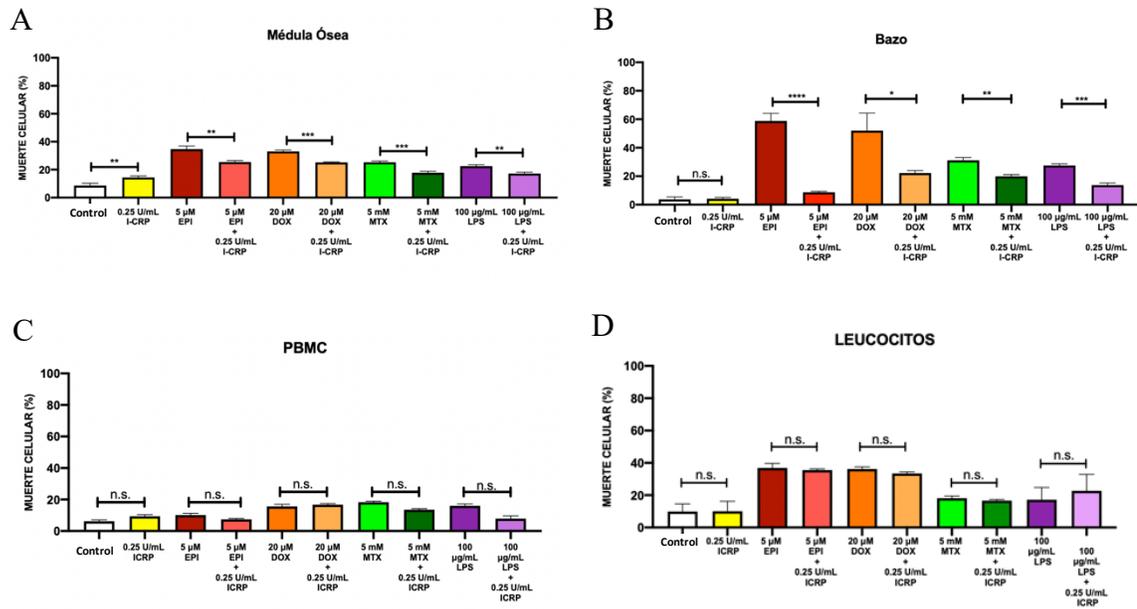
**Figura 14. Efecto del ICRP en la producción de NO del tratamiento de LPS, además CC<sub>20</sub> y SL de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato sobre SIM-A9.**

La línea celular de microglía murina SIM-A9 fue tratada durante 2, 6 y 24 h con LPS en combinación con ICRP (A), también fue tratada a 24 h con la concentración SL (B) y CC<sub>20</sub> (C) en SIM-A9 de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato e ICRP y su combinación. La producción de óxido nítrico (NOS) se evaluó utilizando la sonda DAF-FM mediante citometría de flujo. Las gráficas representan la media  $\pm$  desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado, El análisis estadístico utilizado fue t-student en donde ns (no significativo), \* ( $p < 0.05$ ), \* ( $p < 0.01$ ), \*\* ( $p < 0.001$ ), \*\* ( $p < 0.0001$ ).

### 7.10 El ICRP disminuyó el porcentaje de muerte celular sobre células de Médula Ósea y Bazo ante un estímulo con LPS y CC<sub>50</sub> de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato.

El ICRP tiene efectos antitumorales, antioxidantes e inmunomoduladores los cuales se han reportado en modelos in vitro e in vivo. Actualmente conocemos que las quimioterapias tienen efectos adversos ya que no tienen un blanco específico ocasionando

elevación de las ROS, activando vías de muerte que pueden involucrar caspasas y toxicidad. Al conocer el poder citotóxico de las quimioterapias se planteó evaluar el efecto del ICRP como candidato eficaz de protección, el cual se ha reportado en estudios in vivo en ratones de la cepa BALB-c efectos mieloprotectores con algunas quimioterapias como el 5-FU. Por tanto, se realizó el tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) células de médula ósea, bazo, PBMCs y leucocitos bajo un estímulo con una concentración citotóxica de LPS y  $CC_{50}$  de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato durante 24 h. Al término del tiempo de incubación se realizó la evaluación del porcentaje de muerte celular utilizando la tinción de azul de tripano mediante microscopia. Se muestra en la figura 15A una disminución del porcentaje de muerte celular en células de médula ósea tratadas con 5  $\mu$ M de epirrubicina en combinación con 0.25 U/ mL de ICRP de aproximadamente un 10 %, este mismo efecto se observa en el tratamiento con 20  $\mu$ M de doxorubicina, 5 mM de metotrexato y 100  $\mu$ g/ mL en combinación con ICRP. Por otro lado, se puede observar en la figura 15B una disminución del porcentaje de muerte celular en células de bazo tratadas con 5  $\mu$ M de epirrubicina en combinación con ICRP de aproximadamente 50%, además, se observa una reducción aproximadamente del 30% en el tratamiento con 20  $\mu$ M de doxorubicina en combinación con ICRP, por otro lado, se muestra una reducción del 10% en los tratamientos con 5 nM de metotrexato y 100  $\mu$ g/ mL de LPS en combinación con ICRP. Sin embargo, se puede observar en la figura 15C y 15D no haber una disminución significativa en el porcentaje de muerte celular en PBMCs y leucocitos tratadas con epirrubicina (5  $\mu$ M), doxorubicina (20  $\mu$ M), metotrexato (5 mM) y 100  $\mu$ g/ mL de LPS en combinación con una concentración protectora de 0.25 U/ mL de ICRP. Estos resultados muestran el efecto protector del ICRP en células de Médula Ósea y Bazo ante un daño con epirrubicina, doxorubicina, metotrexato y LPS.



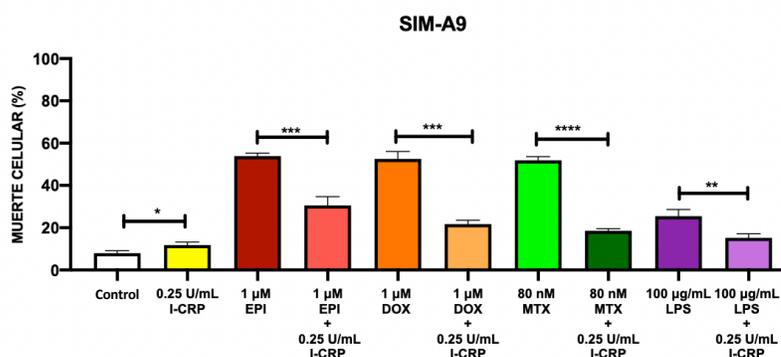
**Fig. 15. Efecto protector del ICRP sobre células de médula ósea, bazo, PBMCs y leucocitos ante un estímulo con LPS y CC<sub>50</sub> de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato.**

Las células médula ósea (A), bazo (B), PBMCs (C) y leucocitos (D) murinas fueron tratadas durante 24 h con epirrubicina (5 µM), doxorubicina (20 µM), metotrexato (5 mM), LPS (100 µg/ mL) e 0.25 U/ mL ICRP y su combinación. El porcentaje de muerte celular se evaluó utilizando una tinción con azul de tripano mediante microscopia. Las gráficas representan la media ± desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado, El análisis estadístico utilizado fue t-student en donde ns (no significativo), \* (p < 0.05), \* (p < 0.01), \*\* (p < 0.001), \*\* (p < 0.0001).

### 7.11 El ICRP disminuye el porcentaje de muerte en células de SIM-A9 ante un daño con LPS y quimioterapias.

El deterioro cognitivo inducido por quimioterapia también conocido como Chemobrain es un efecto secundario producido por la administración de quimioterapias donde se ha reportado que es inducido por una activación de microglía, lo cual produce neuroinflamación y neurotoxicidad. Otros padecimientos como el COVID generan una elevación de ROS que ocasionan daño a diversas células, una de ellas es la microglía. Dado estos problemas de salud, se plantea el uso de inmunomoduladores que protejan a la microglía para prevenir o modular su activación, tal es el caso del ICRP que se ha demostrado su actividad en la mielo-protección. Para evaluar si el ICRP puede tener un

efecto protector sobre células de SIM-A9, se trataron las células con una concentración citotóxica de LPS y la  $CC_{50}$  en SIM-A9 de epirrubicina, doxorubicina y metotrexato durante 24 h. Al finalizar el tiempo de incubación se evaluó el porcentaje de muerte utilizando la tinción con azul de tripano mediante microscopia. Se muestra en la figura 16 el porcentaje de muerte celular en células de SIM-A9, en donde se observa una reducción del porcentaje de muerte celular de aproximadamente el 30% en el tratamiento con 1  $\mu$ M de epirrubicina en combinación con 0.25 U/ mL de ICRP, este mismo efecto se observa en los tratamientos con 1  $\mu$ M de doxorubicina y 80 nM de metotrexato en combinación con ICRP. Por último, se muestra una disminución del porcentaje de muerte celular aproximadamente del 10% en el tratamiento con 100  $\mu$ g/ mL de LPS en combinación con ICRP. Los resultados muestran el efecto protector del ICRP sobre células de SIM-A9.



**Figura 16. Efecto del ICRP sobre SIM-A9 ante un estímulo con LPS, epirrubicina, doxorubicina y metotrexato.**

Las células de SIM-A9 fueron tratadas durante 24 h con epirrubicina (1  $\mu$ M), doxorubicina (1  $\mu$ M), metotrexato (80 nM), LPS (100  $\mu$ g/ mL) e ICRP (0.25 U/ mL) y su combinación. El porcentaje de muerte celular se evaluó utilizando una tinción con azul de tripano mediante microscopia. Las gráficas representan la media  $\pm$  desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado, El análisis estadístico utilizado fue t-student en donde ns (no significativo), \* ( $p < 0.05$ ), \* ( $p < 0.01$ ), \*\* ( $p < 0.001$ ), \*\* ( $p < 0.0001$ ).

## 8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los agentes quimioterapéuticos pertenecientes al grupo de antraciclinas (epirrubicina y doxorubicina), y el metotrexato exhiben un efecto citotóxico en células no tumorales (Fig. 3 y 4). En este sentido, se observó que la 5  $\mu\text{M}$  epirrubicina (EPI) y 20  $\mu\text{M}$  doxorubicina (DOX) inducen muerte en células derivadas de médula ósea y bazo, PBMCs y leucocitos murinos (Fig. 3). Previamente, se ha reportado que las antraciclinas son citotóxicas hacia células estromales derivadas de médula ósea y linfocitos (Aramvash et al., 2017; Ferraro et al., 1999). Este efecto se debe a la inhibición de la topoisomerasa II que deriva en alteraciones cromosómicas del DNA que culmina en la muerte celular, asimismo la citotoxicidad de estos compuestos también se relaciona con la inducción del estrés oxidativo en la célula (H.-S. Kim et al., 2009; Olinski et al., 1997). De manera similar, una concentración de 5 mM de metotrexato (MTX) resulta también citotóxico para estas células (fig. 3). Este compuesto puede ser utilizado con concentraciones bajas para el tratamiento de patologías inflamatorias como la artritis reumatoide o con concentraciones altas como tratamiento antitumoral (Gaies & Jebabli, 2012). Y a partir del uso de una concentración superior a 10  $\mu\text{M}$  es cuando se generan afecciones nocivas en la célula relacionado con un incremento en la producción de ROS y una depleción del glutatión (GSH) lo que en conjunto deriva en la muerte de la célula, tal como se estudió en linfocitos por Salimi et al., 2019.

Similarmente, los agentes quimioterapéuticos (EPI, DOX y MTX) tienen un efecto citotóxico dependiente de la concentración en células de SIM-A9 (fig. 4). Se ha reportado que la citotoxicidad inducida por EPI en microglía es debida a alteraciones en el DNA y afecciones mitocondriales (de la Hoz-Camacho et al., 2022). De igual forma, DOX exhibe neurotoxicidad asociado a un daño en el DNA que promueve la despolarización de la membrana mitocondrial y un aumento en la producción de ROS que activaría subsecuentemente a la vía intrínseca de apoptosis, aunque puede asociarse también con una regulación al alza en la formación de complejos pre-autofágicos (Du et al., 2021). Se ha reportado que el metotrexato activa a la microglía liberando citocinas proinflamatorias que producen un efecto adverso en otras células del SNC, además, actualmente se conoce que afecta la mielinización adaptativa en el microambiente glial, sin embargo, aún no se

tiene elucidado el mecanismo citotóxico directo que causa en células de microglía (Geraghty et al., 2019; Gibson et al., 2019b)

Por otro lado, se observó que el LPS es citotóxico en células murinas derivadas de médula ósea y bazo, y en PBMCs con una concentración de 100 µg/ mL, aunque no fue así en leucocitos (fig. 3). El LPS se utiliza como un inductor de un estado pro-inflamatorio en macrófagos, sin embargo, al incrementar su concentración, ésta afecta la viabilidad celular. Por ejemplo, Xaus et al. reportó que el LPS con 1 µg/ mL induce muerte celular en macrófagos derivados de médula ósea. Además, Nielsen et al., 2012 observó que éste mismo con 10 µg/ mL promueve una muerte celular apoptótica en diferentes poblaciones de linfocitos. Asimismo, en este trabajo se demostró que el LPS es citotóxico en células de SIM-A9 con una concentración de 100 µg/ mL (fig. 4), lo que se asemeja con lo reportado por Vairano et al., 2004 en donde con la misma concentración se observa un alto porcentaje de muerte en células de microglía de cultivo primario.

Se ha analizado que el efecto citotóxico del LPS está relacionado con la inducción del estrés oxidativo en la célula, en el cual se incrementa la producción de ROS y óxido nítrico (NO); además, se ha visto que en la línea celular de microglía murina N9 hay una activación de la caspasa 11 que culmina en la muerte celular (Eren et al., 2018). Una vez determinado que los tratamientos (EPI, DOX, MTX y LPS) inducen muerte celular, se evaluaron posteriormente las alteraciones celulares implicadas en este proceso, y uno de los eventos comúnmente asociados es la elevación en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas moléculas están implicadas en diferentes vías de señalización que regulan procesos como diferenciación, supervivencia o crecimiento celular; sin embargo, al presentar sobreproducción, estas promueven la activación de las vías asociadas a muerte celular como apoptosis o necroptosis (Villalpando-Rodríguez & Gibson, 2021).

En el presente trabajo, se observó que el tratamiento con CC<sub>50</sub> de EPI, DOX, MTX y 100 µg/ mL de LPS promueven un incremento en la producción de ROS en células de médula ósea, bazo, leucocitos y SIM-A9 (fig. 5 y 6). De inicio, la teoría más aceptada que explica el incremento en la producción de ROS por las antraciclinas (EPI y DOX) consiste en una reducción del agente quimioterapéutico a semiquinona por acción de la oxidasa NADPH

en la mitocondria (mito-NOX), lo cual desestabiliza la cadena transportadora de electrones (CTE) y ello favorece la producción del superóxido (Asensio-López et al., 2016, 2017). Por otro lado, el MTX genera un desbalance oxidativo en el que disminuye la expresión de componentes antioxidantes como superóxido dismutasa 1 (SOD1), catalasa y glutatión peroxidasa 4 (GPX4), al mismo tiempo que genera alteraciones mitocondriales ocasionando así un aumento en la producción de ROS (Pina-Jiménez et al., 2021; Xiong et al., 2020). Finalmente, el LPS promueve también el incremento de ROS cuyo mecanismo aún no a sido elucidado por completo y se plantea que este efecto se debe a la interacción del LPS con TLR-4 y río abajo activa NOX-2 mediado por el componente intracelular IRAK-1 (Maitra et al., 2009).

Previamente se mencionó que un incremento de ROS puede conducir a la muerte celular por apoptosis. Esto puede deberse a que dichas moléculas, por ejemplo, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, activan a la proteína p53 que favorece la regulación al alza de los genes que codifican para factores pro-apoptóticos como Bax y Bak (Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016). O bien, las ROS promueven una hiperpolarización de la membrana mitocondrial alterando así la estabilidad de la CTE y ocasionando la permeabilización de la membrana mitocondrial, en donde se liberan proteínas pro-apoptóticas como el citocromo C (Chung et al., 2003). En ambos escenarios sucede paulatinamente una activación de caspasas, las cuales son las responsables de efectuar la muerte apoptótica. Por lo tanto, se analizó si la muerte inducida por los tratamientos resultaba dependiente a la activación de caspasas.

Aquí, se reportó que el tratamiento con EPI, DOX, MTX y LPS inducen muerte dependiente de la activación de caspasas en células derivadas de médula ósea y bazo, y SIM-A9 (fig. 10). Se ha asociado a las antraciclinas (EPI y DOX) con la inducción de muerte celular apoptótica, ya que éstas ocasionan alteraciones mitocondriales mediante una sobrecarga de ROS y Ca<sup>2+</sup> intracelular y esto conduciría a la vía intrínseca de la apoptosis, en donde se activan las caspasas 9 y 3 (Shi et al., 2011). Similarmente, dicho efecto se exhibe también en el tratamiento con MTX (Natarajan et al., 2017). No obstante, se ha estudiado que el LPS desencadena una muerte por piroptosis mediada por la interacción con el TLR-4, en donde río abajo se activa la caspasa 11 (murino) y caspasa 4/5 (humano) (Hagar et al., 2013; Zamyatina & Heine, 2020).

Se conoce el poder que ejercen la producción de ROS en las enfermedades neurodegenerativas ya que se tienen reportes donde las ROS producen neurotoxicidad y promueven a un estado reactivo de la microglía ocasionando neuroinflamación (Simpson & Oliver, 2020). Ante esta perspectiva se determinó evaluar si una concentración protectora previamente evaluada de 0.25 U/ mL de ICRP pudiera disminuir el efecto ocasionado por las quimioterapias y LPS en la producción de ROS y NO en células de bazo, médula ósea y SIM-A9. Nuestros resultados muestran que el ICRP disminuye la producción de ROS en células de médula ósea, bazo y células de SIM-A9 ante un estímulo con LPS, EPI, DOX y MTX a 24 h. Esto podría deberse al que el ICPR tiene un efecto antioxidante como lo reportado en estudios con extractos de menta donde se demostró que disminuye la sobreproducción de ROS en células BV2 estimuladas con 100 ng/ mL de LPS, de forma dosis dependiente, debido a que la menta inhibe las ROS y la fosforilación de MARK y NF-kB (Y. J. Park et al., 2022). Este mismo efecto se observó en un reporte donde se describió que el carotenoide Astaxantina induce una disminución del estrés oxidativo en un modelo de ratas albinas tratadas con ciclos de Doxorubicina, además de disminuir los efectos del deterioro cognitivo inducido por quimioterapias, esto debido a su potencial antioxidante y antiinflamatorio (El-Agamy et al., 2018). De igual manera otro estudio con células BV2 tratadas con LPS 1 µg/ mL y diferentes concentraciones de Naloxona muestran una reducción en enzimas proinflamatorias como COX2, enzima que induce la producción de ROS (Tang et al., 2021)

El óxido nítrico (NO) es una molécula que tiene funciones como mediador fisiológico en la relajación de las células endoteliales, además de participar como segundo mensajero en procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular. Es por ello que se evaluó el efecto del ICRP sobre células de SIM-A9 tratadas con 100 µg/ mL de LPS y concentraciones SL y CC<sub>20</sub> de EPI, DOX y MTX, en donde se demostró que 0.25 U/ mL de ICRP disminuye el NO inducido por las quimioterapias (fig. 14). Este efecto pudiera ser por el efecto antioxidante previamente descrito en macrófagos peritoneales murinos y macrófagos humanos (Franco-Molina et al., 2005a; Moisés A. Franco-Molina, 2011a). Ante este efecto, estudios con extractos de canela demostraron tener un poder antioxidante

y neuroprotector al evaluar *in vitro* la disminución de la producción de NO en células BV2 estimuladas con 100 ng/ mL de LPS (Ho et al., 2013). Por otro lado, en estudios *in vivo* con ratas Wistar se demostró que el compuesto organosulfurado Trisulfuro de Dialilo (DATS) disminuyó componentes de proteínas proinflamatorias relacionadas con estrés, sintasa inducible óxido nítrico (iNOS) y ciclooxigenasa 2 (COX-2), además de reducir los efectos del deterioro cognitivo inducido por el tratamiento con ciclos de doxorubicina; esto debido a sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Leung et al., 2020). En otro estudio con ratas albinas y el tratamiento con dos inmunomoduladores, el interferón  $\beta$ -1 $\alpha$  (IFN- $\beta$ -1a) y el inhibidor de las funciones del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) se observó una disminución del estrés oxidativo, de igual manera, este efecto fue visto por Franco-Molina y colaboradores sobre ratones BALB/c al ser tratados con ICRP (Wahdan et al., 2020). También en un estudio de modelo de inflamación isquémica con ratas Sprague-Dawley tratadas con S -nitrosoglutatión se demostró que este reduce la expresión de la enzima iNOS y activación de células de microglía modulando la producción de NO y citocinas proinflamatorias (Khan et al., 2005).

Se conoce el efecto perjudicial de las quimioterapias en tejido sano produciendo una elevación de marcadores de inflamación que provocan muerte en células sanas. En esta tesis se demostró ante este panorama que el tratamiento con ICRP sobre células de médula ósea y bazo disminuye el porcentaje de muerte celular inducido por LPS y quimioterapias (fig. 15). Este efecto puede estar relacionado a que se demostró en la figura 12 y 13 una inhibición de las ROS por NAC, lo cual llevó a un resultado similar al tratamiento con 0.25 U/ mL de ICRP. Similar a esto, en un estudio con ratones de la cepa C57BL/ 6 tratados con ciclos de cisplatino y péptidos derivados del neuropéptido Y demostraron tener un efecto protector en células hematopoyéticas (M. H. Park et al., 2018). También en modelo de ratón C57BL/ 6 tratado con ciclos de ciclofosfamida y el mimético de glutatión oxidado NOV-002, un agente antitumoral único que demostró ser capaz de proteger a células madre y hematopoyéticas de médula ósea, revirtieron la capacidad inmunosupresora de células supresoras derivadas de mieloides y atenuó la reducción inducida por la ciclofosfamida en esplendorcitos a través de su capacidad de regular a la alza la expresión de superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (Diaz-Montero et al., 2012). En un modelo con células BV2 tratados con 1  $\mu$ g/ mL LPS y dosis crecientes

de naloxona se mostró una protección al daño ocasionado por el LPS atrás de la inhibición de los canales de potasio sensibles al ATP, de igual manera en modelo *in vivo* con ratones BALB/ c y la administración de naloxona se demostró una disminución del deterioro cognitivo (Tang et al., 2021). También se observó en un modelo de rata Wistar tratadas con ciclos de doxorubicina y un inhibidor de colinesterasa Donepezil una disminución del deterioro cognitivo causado por la doxorubicina además de proporcionar un efecto neuroprotector sin afectar la función antitumoral de la Doxorubicina (Ongnok et al., 2021).

Todos los resultados demuestran que la epirubicina, doxorubicina, metotrexato y LPS inducen un daño directo sobre células de médula ósea, bazo, PBMCs, leucocitos y SIM-A9. A su vez, el uso del ICRP demostró revertir los efectos causados del daño de forma similar o con mejores efectos que el agente antioxidante NAC, por lo cual se propone al ICRP como una agente con efecto protector sobre las células estudiadas.

## 9. CONCLUSIONES

En este trabajo se midieron los efectos citotóxicos de la EPI, DOX y MTX en una concentración citotóxica 50 (CC50) y de 100 µg/ mL de LPS, sobre células de médula ósea, bazo, PBMCs, leucocitos y células de microglía murina SIM-A9. Los efectos citotóxicos se observaron con un aumento significativo del porcentaje de muerte celular en las células tratadas con respecto al control sin tratamiento. Por otro lado, el pretratamiento con 5 µM de QVD-Oph muestra una disminución del porcentaje de muerte celular. Además, se observó un incremento significativo en las células positivas a DCFDA de médula ósea, bazo, leucocitos y la línea celular SIM-A9 evaluado por citometría de flujo. Sin embargo, se observó una disminución de células positivas a DCFDA cuando se pretrato con 2.5 µM de NAC. También se observó que un estímulo menor, como una CC<sub>20</sub> y SL de EPI, DOX, MTX y 100 µg/ mL de LPS, inducía una elevación significativa de células positivas a DAF de médula ósea y SIM-A9 en todos los tratamientos y en células de bazo y leucocitos solamente en el tratamiento con LPS. Nuestros resultados nos sugieren la implicación de ROS y caspasas sobre el efecto citotóxico del tratamiento con EPI, DOX, MTX y LPS.

El IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) con una concentración protectora de 0.25 U/ mL indujo una disminución del porcentaje de muerte inducido por el tratamiento de CC<sub>50</sub> de EPI, DOX, MTX y 100 µg/ mL de LPS, esta disminución es semejante a la producida por el pretratamiento con el QVD-Oph. Por lo cual, estos resultados nos hacen inferir que el ICRP pudiera prevenir la muerte celular a través de la regulación de las caspasas. Por otro lado, el tratamiento con ICRP disminuye significativamente la producción de células positivas a DCFDA de médula ósea, bazo y SIM-A9 ante un estímulo de daño con CC<sub>50</sub> de EPI, DOX, MTX y 100 µg/ mL de LPS, esta disminución fue mayor que al pretratar con NAC, por lo que se infiere que el ICRP tiene un efecto antioxidante. Finalmente, el ICRP en combinación con dosis bajas de EPI, DOX y MTX (SL y CC<sub>20</sub>) promovió una disminución en células positivas a DAF de SIM-A9. Ante estos resultados se propone al ICRP como una inmunoterapia capaz de reducir la producción de ROS, además, como un compuesto que protege a células de médula ósea, bazo y microglía del daño ocasionado por la epirubicina, doxorubicina y metrotexato.

## 10. PERSPECTIVAS

- Se propone evaluar la producción de citocinas proinflamatorias sobre células de Médula Ósea, Bazo y SIM-A9 ante un estímulo con concentraciones CC<sub>20</sub> y SL de Epirrubicina, Doxorubicina y Metotrexato, así como su combinación con el ICRP.
- Se propone evaluar marcadores de activación como Iba-1 y CD86 sobre la línea celular SIM-A9 ante un estímulo con Epirrubicina, Doxorubicina y Metotrexato, así como su combinación con el ICRP.
- Se propone evaluar si el ICRP puede modular la producción de citocinas proinflamatorias de Médula ósea y Bazo.
- Determinar si el ICRP puede modular el estado reactivo de la microglía con la técnica de Medios Condicionados en los tratamientos de Epirrubicina, Doxorubicina y Metotrexato.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Allen, B. D., Apodaca, L. A., Syage, A. R., Markarian, M., Baddour, A. A. D., Minasyan, H., Alikhani, L., Lu, C., West, B. L., Giedzinski, E., Baulch, J. E., & Acharya, M. M. (2019). Attenuation of neuroinflammation reverses Adriamycin-induced cognitive impairments. *Acta Neuropathologica Communications*, 7(1), 186. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0838-8>
- Aramvash, A., Rabbani Chadegani, A., & Lotfi, S. (2017). Evaluation of Apoptosis in Multipotent Hematopoietic Cells of Bone Marrow by Anthracycline Antibiotics. In *Shaheed Beheshti University of Medical Sciences and Health Services Iranian Journal of Pharmaceutical Research* (Vol. 16, Issue 3).
- Asensio-López, M. C., Soler, F., Pascual-Figal, D., Fernández-Belda, F., & Lax, A. (2017). Doxorubicin-induced oxidative stress: The protective effect of nicorandil on HL-1 cardiomyocytes. *PLOS ONE*, 12(2), e0172803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172803>
- Asensio-López, M. C., Soler, F., Sánchez-Más, J., Pascual-Figal, D., Fernández-Belda, F., & Lax, A. (2016). Early oxidative damage induced by doxorubicin: Source of production, protection by GKT137831 and effect on Ca<sup>2+</sup> transporters in HL-1 cardiomyocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 594, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.02.021>
- Batista, C. R. A., Gomes, G. F., Candelario-Jalil, E., Fiebich, B. L., & de Oliveira, A. C. P. (2019). Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation as a Bridge to Understand Neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2293. <https://doi.org/10.3390/ijms20092293>
- Bennett, J. M., Reeves, G., Billman, G. E., & Sturmborg, J. P. (2018a). Inflammation—Nature’s Way to Efficiently Respond to All Types of Challenges: Implications for Understanding and Managing “the Epidemic” of Chronic Diseases. *Frontiers in Medicine*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00316>
- Briones, T. L., & Woods, J. (2014). Dysregulation in myelination mediated by persistent neuroinflammation: Possible mechanisms in chemotherapy-related cognitive

- impairment. *Brain, Behavior, and Immunity*, 35, 23–32.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.07.175>
- Chakraborty Rebanta K., & Burns Bracken . (2022). *Systemic Inflammatory Response Syndrome*.
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S3–S23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204–7218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>
- Chung, Y. M., Bae, Y. S., & Lee, S. Y. (2003). Molecular ordering of ROS production, mitochondrial changes, and caspase activation during sodium salicylate-induced apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(4), 434–442.  
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01301-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01301-1)
- Coronado-Cerda, E. E., Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Prado-García, H., Rivera-Morales, L. G., Zapata-Benavides, P., Rodríguez-Salazar, M. del C., Caballero-Hernandez, D., Tamez-Guerra, R. S., & Rodríguez-Padilla, C. (2016). *In Vivo* Chemoprotective Activity of Bovine Dialyzable Leukocyte Extract in Mouse Bone Marrow Cells against Damage Induced by 5-Fluorouracil. *Journal of Immunology Research*, 2016, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2016/6942321>
- Cunningham, C. (2013). Microglia and neurodegeneration: The role of systemic inflammation. *Glia*, 61(1), 71–90. <https://doi.org/10.1002/glia.22350>
- de la Hoz-Camacho, R., Rivera-Lazarín, A. L., Vázquez-Guillen, J. M., Caballero-Hernández, D., Mendoza-Gamboa, E., Martínez-Torres, A. C., & Rodríguez-Padilla, C. (2022). CYCLOPHOSPHAMIDE AND EPIRUBICIN INDUCE HIGH APOPTOSIS IN MICROGLIA CELLS WHILE EPIRUBICIN PROVOKES DNA DAMAGE AND MICROGLIAL ACTIVATION AT SUB-LETHAL CONCENTRATIONS. *EXCLI Journal*, 21, 197–212.  
<https://doi.org/10.17179/excli2021-4160>
- Diaz-Montero, C. M., Wang, Y., Shao, L., Feng, W., Zidan, A.-A., Pazoles, C. J., Montero, A. J., & Zhou, D. (2012). The glutathione disulfide mimetic NOV-002 inhibits cyclophosphamide-induced hematopoietic and immune suppression by

- reducing oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(9), 1560–1568.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.007>
- Dingezweni, S. (2020). The blood–brain barrier. *Southern African Journal of Anaesthesia and Analgesia*, 26(6), S32–S34.  
<https://doi.org/10.36303/SAJAA.2020.26.6.S3.2533>
- Du, J., Zhang, A., Li, J., Liu, X., Wu, S., Wang, B., Wang, Y., & Jia, H. (2021). Doxorubicin-Induced Cognitive Impairment: The Mechanistic Insights. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.673340>
- Durães, F., Pinto, M., & Sousa, E. (2018). Old Drugs as New Treatments for Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceuticals*, 11(2), 44.  
<https://doi.org/10.3390/ph11020044>
- El-Agamy, S. E., Abdel-Aziz, A. K., Wahdan, S., Esmat, A., & Azab, S. S. (2018). Astaxanthin Ameliorates Doxorubicin-Induced Cognitive Impairment (Chemobrain) in Experimental Rat Model: Impact on Oxidative, Inflammatory, and Apoptotic Machineries. *Molecular Neurobiology*, 55(7), 5727–5740.  
<https://doi.org/10.1007/s12035-017-0797-7>
- Eren, E., Tufekci, K. U., Isci, K. B., Tastan, B., Genc, K., & Genc, S. (2018). Sulforaphane Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammation, Cytotoxicity, Oxidative Stress, and miR-155 Expression and Switches to Mox Phenotype through Activating Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2–Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2/Antioxidant Response Element Pathway in Murine Microglial Cells. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00036>
- Ferraro, C., Quemeneur, L., Prigent, A.-F., Taverne, C., Revillard, J.-P., & Bonnefoy-Berard, N. (1999). Anthracyclines trigger apoptosis of both G0 G1 and cycling peripheral blood lymphocytes and induce massive deletion of mature T and B cells. *Biology of the Cell*, 91(7), 557–557. [https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(99\)90273-3](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(99)90273-3)
- Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Castillo-León, L., Tamez-Guerra, R. S., & Rodríguez-Padilla, C. (2004). Bovine dialyzable leukocyte extract protects against LPS-induced, murine endotoxic shock. *International Immunopharmacology*, 4(13). <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2004.06.014>

- Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Castillo-León, L., Tamez-Guerra, R. S., & Rodríguez-Padilla, C. (2005). Bovine Dialyzable Leukocyte Extract Modulates the Nitric Oxide and Pro-Inflammatory Cytokine Production in Lipopolysaccharide-Stimulated Murine Peritoneal Macrophages *In Vitro*. *Journal of Medicinal Food*, 8(1), 20–26. <https://doi.org/10.1089/jmf.2005.8.20>
- Gaies, E., & Jebabli, N. (2012). Methotrexate Side Effects: Review Article. *Journal of Drug Metabolism & Toxicology*, 3(4). <https://doi.org/10.4172/2157-7609.1000125>
- Geraghty, A. C., Gibson, E. M., Ghanem, R. A., Greene, J. J., Ocampo, A., Goldstein, A. K., Ni, L., Yang, T., Marton, R. M., Paşca, S. P., Greenberg, M. E., Longo, F. M., & Monje, M. (2019). Loss of Adaptive Myelination Contributes to Methotrexate Chemotherapy-Related Cognitive Impairment. *Neuron*, 103(2), 250-265.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.04.032>
- Gibson, E. M., Nagaraja, S., Ocampo, A., Tam, L. T., Wood, L. S., Pallegar, P. N., Greene, J. J., Geraghty, A. C., Goldstein, A. K., Ni, L., Woo, P. J., Barres, B. A., Liddelow, S., Vogel, H., & Monje, M. (2019a). Methotrexate Chemotherapy Induces Persistent Tri-gliaal Dysregulation that Underlies Chemotherapy-Related Cognitive Impairment. *Cell*, 176(1–2), 43-55.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.049>
- Greten, F. R., & Grivennikov, S. I. (2019). Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity*, 51(1), 27–41. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.025>
- Hagar, J. A., Powell, D. A., Aachoui, Y., Ernst, R. K., & Miao, E. A. (2013). Cytoplasmic LPS Activates Caspase-11: Implications in TLR4-Independent Endotoxic Shock. *Science*, 341(6151), 1250–1253. <https://doi.org/10.1126/science.1240988>
- Haruwaka, K., Ikegami, A., Tachibana, Y., Ohno, N., Konishi, H., Hashimoto, A., Matsumoto, M., Kato, D., Ono, R., Kiyama, H., Moorhouse, A. J., Nabekura, J., & Wake, H. (2019). Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation. *Nature Communications*, 10(1), 5816. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13812-z>

- Ho, S. C., Chang, K. S., & Chang, P. W. (2013). Inhibition of neuroinflammation by cinnamon and its main components. *Food Chemistry*, *138*(4), 2275–2282. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.020>
- Hong, J., Yoon, D., Nam, Y., Seo, D., Kim, J.-H., Kim, M. S., Lee, T. Y., Kim, K. S., Ko, P.-W., Lee, H.-W., Suk, K., & Kim, S. R. (2020). Lipopolysaccharide administration for a mouse model of cerebellar ataxia with neuroinflammation. *Scientific Reports*, *10*(1), 13337. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70390-7>
- Janelins, M. C., Mastrangelo, M. A., Oddo, S., LaFerla, F. M., Federoff, H. J., & Bowers, W. J. (2005). Early correlation of microglial activation with enhanced tumor necrosis factor-alpha and monocyte chemoattractant protein-1 expression specifically within the entorhinal cortex of triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Journal of Neuroinflammation*, *2*(1), 23. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-2-23>
- Jeong, H.-K., Jou, I., & Joe, E. (2010). Systemic LPS administration induces brain inflammation but not dopaminergic neuronal death in the substantia nigra. *Experimental and Molecular Medicine*, *42*(12), 823. <https://doi.org/10.3858/emm.2010.42.12.085>
- Keeney, J. T. R., Ren, X., Warriar, G., Noel, T., Powell, D. K., Brelsfoard, J. M., Sultana, R., Saatman, K. E., St. Clair, D. K., & Butterfield, D. A. (2018). Doxorubicin-induced elevated oxidative stress and neurochemical alterations in brain and cognitive decline: protection by MESNA and insights into mechanisms of chemotherapy-induced cognitive impairment (“chemobrain”). *Oncotarget*, *9*(54), 30324–30339. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25718>
- Kegel, V., Pfeiffer, E., Burkhardt, B., Liu, J. L., Zeilinger, K., Nüssler, A. K., Seehofer, D., & Damm, G. (2015). Subtoxic Concentrations of Hepatotoxic Drugs Lead to Kupffer Cell Activation in a Human *In Vitro* Liver Model: An Approach to Study DILI. *Mediators of Inflammation*, *2015*, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2015/640631>
- Kempuraj, D., Thangavel, R., Natteru, P. A., Selvakumar, G. P., Saeed, D., Zahoor, H., Zaheer, S., Iyer, S. S., & Zaheer, A. (n.d.). *Neuroinflammation Induces Neurodegeneration*.

- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of Microglia. *Physiological Reviews*, *91*(2), 461–553.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>
- Khan, M., Sekhon, B., Giri, S., Jatana, M., Gilg, A. G., Ayasolla, K., Elango, C., Singh, A. K., & Singh, I. (2005). S-Nitrosoglutathione Reduces Inflammation and Protects Brain against Focal Cerebral Ischemia in a Rat Model of Experimental Stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *25*(2), 177–192.  
<https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600012>
- Kielian, T. (2016). Multifaceted roles of neuroinflammation: the need to consider both sides of the coin. *Journal of Neurochemistry*, *136*, 5–9.  
<https://doi.org/10.1111/jnc.13530>
- Kim, H.-S., Lee, Y.-S., & Kim, D.-K. (2009). Doxorubicin Exerts Cytotoxic Effects through Cell Cycle Arrest and Fas-Mediated Cell Death. *Pharmacology*, *84*(5), 300–309. <https://doi.org/10.1159/000245937>
- Kim, S. U., & de Vellis, J. (2005). Microglia in health and disease. *Journal of Neuroscience Research*, *81*(3), 302–313. <https://doi.org/10.1002/jnr.20562>
- Kimelberg, H. K. (2010). Functions of Mature Mammalian Astrocytes: A Current View. *The Neuroscientist*, *16*(1), 79–106. <https://doi.org/10.1177/1073858409342593>
- Kimelberg, H. K., & Nedergaard, M. (2010). Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics*, *7*(4), 338–353.  
<https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.07.006>
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., & Osborne, B. A. (2007). *Immunologia de Kuby* (McGraw-Hill, Ed.; sexta). 2007.
- Krishnamoorthy, S., & Honn, K. v. (2006). Inflammation and disease progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, *25*(3), 481–491. <https://doi.org/10.1007/s10555-006-9016-0>
- Kumar, V. (2018). *Patología Humana* (ELSEVIER, Ed.; Decima).
- Lécuyer, M.-A., Kebir, H., & Prat, A. (2016). Glial influences on BBB functions and molecular players in immune cell trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1862*(3), 472–482.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.004>

- Leung, W. S., Kuo, W. W., Ju, D. T., Wang, T. de, Shao-Tsu Chen, W., Ho, T. J., Lin, Y. M., Mahalakshmi, B., Lin, J. Y., & Huang, C. Y. (2020). Protective effects of diallyl trisulfide (DATS) against doxorubicin-induced inflammation and oxidative stress in the brain of rats. *Free Radical Biology and Medicine*, *160*, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.018>
- Liy, P. M., Puzi, N. N. A., Jose, S., & Vidyadaran, S. (2021). Nitric oxide modulation in neuroinflammation and the role of mesenchymal stem cells. *Experimental Biology and Medicine*, *246*(22), 2399–2406. <https://doi.org/10.1177/1535370221997052>
- Lucas, S.-M., Rothwell, N. J., & Gibson, R. M. (2006a). The role of inflammation in CNS injury and disease. *British Journal of Pharmacology*, *147*(S1), S232–S240. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706400>
- Maitra, U., Singh, N., Gan, L., Ringwood, L., & Li, L. (2009). IRAK-1 Contributes to Lipopolysaccharide-induced Reactive Oxygen Species Generation in Macrophages by Inducing NOX-1 Transcription and Rac1 Activation and Suppressing the Expression of Antioxidative Enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(51), 35403–35411. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.059501>
- Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., & Kim, H. L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. In *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* (Vol. 14). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>
- Mayer, H., Tharanathan, R. N., & Weckesser, J. (1985). *6 Analysis of Lipopolysaccharides of Gram-Negative Bacteria* (pp. 157–207). [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70475-6](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70475-6)
- Mccaffrey, G., & Davis, T. P. (2012). PHYSIOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY OF THE BLOOD BRAIN BARRIER: P-glycoprotein and occludin trafficking as therapeutic targets to optimize CNS drug delivery. *J Investig Med*, *60*(8). <https://doi.org/10.231/JIM.0b013e318276de79>
- Moisés A. Franco-Molina. (2011). Anti-inflammatory and antioxidant effects of IMMUNEPOTENT CRP in Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human macrophages. *African Journal of Microbiology Research*, *5*(22). <https://doi.org/10.5897/ajmr11.578>

- Monje, M., & Dietrich, J. (2012). Cognitive side effects of cancer therapy demonstrate a functional role for adult neurogenesis. *Behavioural Brain Research*, 227(2), 376–379. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.05.012>
- Natarajan, K., Abraham, P., & Kota, R. (2017). Activation of the mitochondrial apoptotic pathway contributes to methotrexate-induced small intestinal injury in rats. *Cell Biochemistry and Function*, 35(7), 378–391. <https://doi.org/10.1002/cbf.3285>
- Nielsen, J. S., Larsson, A., Ledet, T., Turina, M., Tønnesen, E., & Krog, J. (2012). Rough-Form Lipopolysaccharide Increases Apoptosis in Human CD4+ and CD8+ T Lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, 75(2), 193–202. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2011.02613.x>
- Olinski, R., Jaruga, P., Foksinski, M., Bialkowski, K., & Tujakowski, J. (1997). Epirubicin-Induced Oxidative DNA Damage and Evidence for Its Repair in Lymphocytes of Cancer Patients Who Are Undergoing Chemotherapy. *Molecular Pharmacology*, 52(5), 882–885. <https://doi.org/10.1124/mol.52.5.882>
- Ongnok, B., Khuanjing, T., Chunchai, T., Pantiya, P., Kerdphoo, S., Arunsak, B., Nawara, W., Jaiwongkam, T., Apaijai, N., Chattipakorn, N., & Chattipakorn, S. C. (2021). Donepezil Protects Against Doxorubicin-Induced Chemobrain in Rats via Attenuation of Inflammation and Oxidative Stress Without Interfering With Doxorubicin Efficacy. *Neurotherapeutics*, 18(3), 2107–2125. <https://doi.org/10.1007/s13311-021-01092-9>
- Park, M. H., Baek, B., Jin, H. K., & Bae, J. (2018). Novel peptides derived from neuropeptide Y prevent chemotherapy-induced bone marrow damage by regulating hematopoietic stem cell microenvironment. *Animal Cells and Systems*, 22(5), 281–288. <https://doi.org/10.1080/19768354.2018.1517826>
- Park, Y. J., Yang, H. J., Li, W., Oh, Y.-C., & Go, Y. (2022). Menthae Herba Attenuates Neuroinflammation by Regulating CREB/Nrf2/HO-1 Pathway in BV2 Microglial Cells. *Antioxidants*, 11(4), 649. <https://doi.org/10.3390/antiox11040649>
- Perry, V. H. (2004). The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain, Behavior, and Immunity*, 18(5), 407–413. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2004.01.004>

- Pina-Jiménez, E., Calzada, F., Bautista, E., Ordoñez-Razo, R. M., Velázquez, C., Barbosa, E., & García-Hernández, N. (2021). Incomptine A Induces Apoptosis, ROS Production and a Differential Protein Expression on Non-Hodgkin's Lymphoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10516. <https://doi.org/10.3390/ijms221910516>
- Pusztai, L., Mendoza, T. R., Reuben, J. M., Martinez, M. M., Willey, J. S., Lara, J., Syed, A., Fritsche, H. A., Bruera, E., Booser, D., Valero, V., Arun, B., Ibrahim, N., Rivera, E., Royce, M., Cleeland, C. S., & Hortobagyi, G. N. (2004). Changes in plasma levels of inflammatory cytokines in response to paclitaxel chemotherapy. *Cytokine*, 25(3), 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2003.10.004>
- Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(12), 2977–2992. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>
- Ren, X., Keeney, J. T. R., Miriyala, S., Noel, T., Powell, D. K., Chaiswing, L., Bondada, S., st. Clair, D. K., & Butterfield, D. A. (2019). The triangle of death of neurons: Oxidative damage, mitochondrial dysfunction, and loss of choline-containing biomolecules in brains of mice treated with doxorubicin. Advanced insights into mechanisms of chemotherapy induced cognitive impairment (“chemobrain”) involving TNF- $\alpha$ . *Free Radical Biology and Medicine*, 134, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.029>
- Roh, J. S., & Sohn, D. H. (2018). Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Network*, 18(4). <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e27>
- Salimi, A., Pirhadi, R., Jamali, Z., Ramazani, M., Yousefsani, B., & Pourahmad, J. (2019). Mitochondrial and lysosomal protective agents ameliorate cytotoxicity and oxidative stress induced by cyclophosphamide and methotrexate in human blood lymphocytes. *Human & Experimental Toxicology*, 38(11), 1266–1274. <https://doi.org/10.1177/0960327119871096>

- Seemann, S., Zohles, F., & Lupp, A. (2017). Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation. *Journal of Biomedical Science*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0370-8>
- Sharma, J. N., Al-Omran, A., & Parvathy, S. S. (2007). Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*, 15(6), 252–259. <https://doi.org/10.1007/s10787-007-0013-x>
- Shi, J., Abdelwahid, E., & Wei, L. (2011). Apoptosis in Anthracycline Cardiomyopathy. *Current Pediatric Reviews*, 7(4), 329–336. <https://doi.org/10.2174/157339611796892265>
- Sigma-aldrich. (n.d.). *Lipopolysaccharides from Escherichia coli O111:B4*.
- Simpson, D. S. A., & Oliver, P. L. (2020). ROS Generation in Microglia: Understanding Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease. *Antioxidants*, 9(8), 743. <https://doi.org/10.3390/antiox9080743>
- Siracusa, R., Fusco, R., & Cuzzocrea, S. (2019). Astrocytes: Role and Functions in Brain Pathologies. *Frontiers in Pharmacology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01114>
- Strehl, C., Ehlers, L., Gaber, T., & Buttgerit, F. (2019). Glucocorticoids—All-Rounders Tackling the Versatile Players of the Immune System. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01744>
- Takeda, S., Sato, N., Ikimura, K., Nishino, H., Rakugi, H., & Morishita, R. (2013). Increased blood–brain barrier vulnerability to systemic inflammation in an Alzheimer disease mouse model. *Neurobiology of Aging*, 34(8), 2064–2070. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.02.010>
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 140(6), 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Tang, Z., Shao, X., Wu, J., Chen, H., Zhang, A., Xu, F., Ping, H., Li, S., Liu, C., Li, Y., Xue, X., & Yuan, B. (2021). Naloxone Protects against Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation and Microglial Activation via Inhibiting ATP-Sensitive Potassium Channel. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2021, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2021/7731528>

- Vairano, M., Graziani, G., Tentori, L., Tringali, G., Navarra, P., & Russo, C. dello. (2004). Primary cultures of microglial cells for testing toxicity of anticancer drugs. *Toxicology Letters*, *148*(1–2), 91–94. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.12.058>
- van der Willik, K. D., Koppelmans, V., Hauptmann, M., Compter, A., Ikram, M. A., & Schagen, S. B. (2018). Inflammation markers and cognitive performance in breast cancer survivors 20 years after completion of chemotherapy: a cohort study. *Breast Cancer Research*, *20*(1), 135. <https://doi.org/10.1186/s13058-018-1062-3>
- Villalpando-Rodriguez, G. E., & Gibson, S. B. (2021). Reactive Oxygen Species (ROS) Regulates Different Types of Cell Death by Acting as a Rheostat. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2021*, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2021/9912436>
- Wahdan, S. A., El-Derany, M. O., Abdel-Maged, A. E., & Azab, S. S. (2020). Abrogating doxorubicin-induced chemobrain by immunomodulators IFN-beta 1a or infliximab: Insights to neuroimmune mechanistic hallmarks. *Neurochemistry International*, *138*, 104777. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104777>
- Xaus, J., Nica Comalada, M., Valledor, A. F., Lloberas, J., Ló Pez-Soriano, F., Argilé, J. M., Bogdan, C., & Celada, A. (n.d.). *LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF*.
- Xiong, S., Song, D., Xiang, Y., Li, Y., Zhong, Y., Li, H., Zhang, P., Zhou, W., Zeng, X., & Zhang, X. (2020). Reactive oxygen species, not Ca<sup>2+</sup>, mediates methotrexate-induced autophagy and apoptosis in spermatocyte cell line. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, *126*(2), 144–152. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13306>
- Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., & Matar, C. (2018). The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients*, *10*(11), 1618. <https://doi.org/10.3390/nu10111618>
- Zamyatina, A., & Heine, H. (2020). Lipopolysaccharide Recognition in the Crossroads of TLR4 and Caspase-4/11 Mediated Inflammatory Pathways. *Frontiers in Immunology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.585146>