

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ESTUDIO DEL EFECTO CITOTÓXICO Y PROINFLAMATORIO DE LA  
CICLOFOSFAMIDA Y EPIRRUBICINA SOBRE CÉLULAS MICROGLIA**

**POR**

**M. C. RAFAEL DE LA HOZ CAMACHO**

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMIUNOBIOLOGÍA

2024

**ESTUDIO DEL EFECTO CITOTÓXICO Y PROINFLAMATORIO DE LA  
CICLOFOSFAMIDA Y EPIRRUBICINA SOBRE CÉLULAS MICROGLIA**

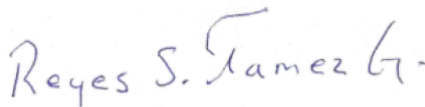
Comité de Tesis



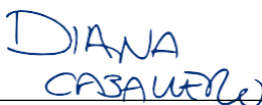
Dra. Ana Carolina Martínez Torres  
PRESIDENTE



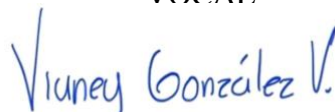
Dr. Cristina Rodríguez Padilla  
SECRETARIO



Dr. Reyes S. Tamez Guerra  
VOCAL



Dra. Diana E. Caballero Hernández  
VOCAL



Dra. Vianey González Villasana  
VOCAL



Dra. Katiushka Arévalo Niño  
SUBDIRECTORA DE POSGRADO

**ESTUDIO DEL EFECTO CITOTÓXICO Y PROINFLAMATORIO DE LA  
CICLOFOSFAMIDA Y EPIRRUBICINA SOBRE CÉLULAS MICROGLIA**

**DIRECCIÓN DE TESIS**



---

Dra. Ana Carolina Martínez Torres  
DIRECTOR

**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.

## **Financiamiento**

**Este trabajo fue parcialmente financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica, PAICYT.**

## **AGRADECIMIENTO**

**Al CONAHCYT, por su apoyo económico para solventar mi investigación y mi manutención durante todo el proyecto.**

**Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad Autónoma de Nuevo León por su apoyo en infraestructura para concluir nuestra investigación.**

**COMITÉ DE TESIS**

**\*\***

**DEMÁS PERSONAS QUE PARTICIPARON DE ALGUNA FORMA**

**\*\***

## **DEDICATORIA**



## ÍNDICE

RESUMEN .....	15
ABSTRACT .....	16
1. INTRODUCCIÓN .....	17
2. ANTECEDENTES .....	19
2.1 El cáncer .....	19
2.2 Cáncer de mama .....	20
2.3 Clasificación molecular del cáncer de mama.....	21
2.4 Tratamientos del cáncer de mama.....	23
2.5 Epirrubicina .....	24
2.6 Ciclofosfamida.....	27
2.7 Las quimioterapias y su correlación con el sistema inmune.....	29
2.8 Comunicación cruzada entre sistema inmune central y microglía.....	32
2.9 Interacción entre sistema inmune periférico y el Sistema Nervioso Central (SCN) .....	33
2.10 Neuroinflamación .....	34
2.10 Neurodegeneración y Patologías asociadas .....	36
2.11 Deterioro cognitivo asociado a la quimioterapia .....	37
3. JUSTIFICACIÓN .....	40
4. HIPÓTESIS .....	41
5. OBJETIVO GENERAL.....	42
5.1 Objetivos específicos .....	42
6. MATERIAL Y MÉTODOS .....	43
6.1 Líneas celulares y su mantenimiento. ....	43
6.1.1 Cultivo de células .....	43
6.1.2 Condiciones de tratamiento .....	43
6.1.3 Evaluación de viabilidad celular.....	43
6.1.4 Análisis de muerte celular .....	44
6.1.5 Evaluación de $\gamma$ -H2AX, p53 y p16.....	44
6.1.6 Análisis del ciclo celular.....	45
6.1.7 Análisis de degradación del ADN .....	45
6.1.8 Análisis de pérdida de potencial de membrana mitocondrial .....	45
6.1.9 Análisis de producción de ROS y su rol en la muerte celular .....	46
6.1.10 Análisis de activación de caspasas y su rol en la muerte celular.....	46
6.1.11 Evaluación de la producción de óxido nítrico .....	46

6.1.12 Evaluación de la liberación de citocinas.....	47
6.1.13 Evaluación de Iba-1.....	47
6.1.14 Evaluación de la autofagia.....	48
6.2 Análisis Estadístico.....	48
7. Resultados.....	49
7.1 Las células de microglía son cinco veces más sensibles a la quimioterapia que las células de cáncer de mama.....	49
7.2 EPI y CTX inducen daño en el ADN y arresto del ciclo celular. ....	51
7.3 EPI y CTX inducen la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la producción de ROS.....	54
7.4 EPI y CTX inducen autofagia.....	55
7.5 EPI y CTX inducen la activación de caspasas.....	56
7.6 La baja concentración de EPI induce daño en el ADN y detención del ciclo celular. ....	57
7.7 EPI induce la activación de la microglía.....	58
8. Discusión .....	61
9. Conclusiones.....	67
REFERENCIAS.....	68

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Subtipos moleculares de cáncer de mama. (Tomado y modificado de INCAN 2014).....	22
Tabla 2. Esquema terapéutico para cáncer de mama. (Tomado de INCAN, 2014).....	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Epidemiología del cáncer de mama entre hombres y mujeres de más de 20 años en el territorio nacional.....	21
Figura 2. Subtipos de cáncer y sus marcadores .....	23
Figura 3. Mecanismo de muerte de la epirrubicina descrito para células HeLa .....	25
Figura 4. Cardiotoxicidad mediada por antraciclinas .....	26
Figura 5. Metabolismo de la ciclofosfamida.....	27
Figura 6. Mecanismo de acción de la ciclofosfamida.....	28
Figura 7. Mecanismo de inmunomodulación dependiente de dosis de la ciclofosfamida....	30
Figura 8. Efecto de la disminución de la función y número de Linfocitos Treg y modulación de otras células del sistema inmune a dosis bajas.....	31
Figura 9. Regulación paracrina y autocrina de la BBB durante la homeostasis y la inflamación. ....	35
Figura 10. Citotoxicidad inducida por EPI y CTX en células SIM-A9 y 4T1.....	51
Figura 11. Daño en el ADN y detención del ciclo celular.....	53
Figura 12. Alteraciones mitocondriales y producción de ROS.....	55
Figura 13. Formación de autofagosomas y muerte celular.....	56
Figura 14. Activación y papel de las caspasas en la muerte celular. ....	57
Figura 15. Daño en el ADN y detención del ciclo celular inducido por bajas concentraciones de EPI y CTX.....	58
Figura 16. Producción de NO, liberación de citoquinas y expresión de Iba-1 después del tratamiento con SIM-A9 con EPI.....	60

## **LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS. Evitar incluir las convencionales.**

↓ $\Psi$ mit. Pérdida del potencial de membrana mitocondrial  
ATP. Trifosfato de adenosina  
A $\beta$ . Beta amiloide  
BBB. Barrera hematoencefálica  
CC<sub>20</sub>. Concentración citotóxica de 20  
CC<sub>50</sub>. Concentración citotóxica de 50  
CDK. Cinasas dependientes de ciclina  
CE. Células endoteliales especializadas  
COVID-19. Enfermedad por coronavirus de 2019  
CRCI. Deterioro cognitivo relacionado con la quimioterapia  
CRT. Calreticulina  
CSL. Concentraciones sub letales  
CTX. Ciclofosfamida  
DAMPS. Patrones moleculares asociados al daño  
DCFDA. Diacetato de 2',7'-diclorofluorescina  
deterioro cognitivo relacionado con la quimioterapia. Deterioro cognitivo relacionado con la quimioterapia  
DGE. Dirección General de Epidemiología  
DIOC6. Yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina  
DOX. Doxorubicina  
EA. Enfermedad de Alzheimer  
EM. Esclerosis múltiple  
EP. Enfermedad de Parkinson  
EPI. Epirubicina  
GM-CSF. Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos  
GSH. Glutación intracelular  
GSHPx. Peroxidasa de glutación  
HMGB1. Grupo de alta movilidad liberación de caja 1  
HSP. Proteína de choque térmico  
Iba-1. Molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1  
I-CRP. IMMUNEPOTENT–CRP  
IFN. Interferón tipo 1  
IL-6. Interleucina-6  
MCR. Muerte celular regulada  
MTX. Metotrexato  
NAC. N-acetil-cisteína  
NO. Óxido nítrico  
NPC. Células neurales progenitoras  
NVU. Unidad neurovascular, Unidad neurovascular  
PI. Yoduro de propidio  
PS. Fosfatidilserina  
RE. Receptor de estrógenos  
ROS. Especies reactivas de oxígeno  
RP. Receptor de progesterona

SARS-CoV-2. Síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2  
SNC. Sistema nervioso central  
SNpc. Pars compacta  
SP-1. Spautina-1  
TNF. Factor de necrosis tumoral  
TNF- $\alpha$ . Factor de necrosis tumoral alfa  
 $\gamma$ -H2AX. Fosforilación de H2AX

## RESUMEN

El deterioro cognitivo relacionado con la quimioterapia (CRCI, por sus siglas en inglés), también llamado “chemobrain”, disminuye la calidad de vida del paciente con cáncer. Se ha descrito que los pacientes con cáncer de mama son los mayormente afectados, sin embargo, el mecanismo que conduce al CRCI no se ha dilucidado por completo. Investigaciones recientes proponen a la microglía como el principal arquitecto de CRCI, ya que, al entrar en contacto con quimioterapias se induce un estado reactivo en las células, promoviendo neuroinflamación. El objetivo de esta investigación fue evaluar los efectos de dos fármacos comúnmente utilizados contra el cáncer de mama, la ciclofosfamida (CTX) y la epirubicina (EPI), en la línea celular de microglía SIM-A9, utilizando la línea celular 4T1 (cáncer de mama murino triple negativo). Nuestros resultados muestran que la CTX y la EPI inducen citotoxicidad sobre células de microglía, siendo 5 y 2 veces más citotóxicos para este modelo que para las células 4T1 de cáncer de mama, respectivamente. Ambas quimioterapias inducen daño en el ADN y la detención del ciclo celular en células de microglía y cáncer de mama. Además, el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) disminuye a medida que aumenta la muerte celular, y ambas quimioterapias inducen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en SIM-A9 y 4T1. Además, la activación de caspasas aumenta con los tratamientos y su bloqueo farmacológico inhibe la muerte celular inducida por CTX y EPI. Finalmente, bajas concentraciones de CTX y EPI inducen  $\gamma$ -H2AX, y EPI induce la liberación de citocinas, la producción de NO y la sobreexpresión de Iba-1. Este trabajo abre pie al estudio del efecto inmunomoduladores como posibles agentes con potencial contra el CRCI.

## ABSTRACT

Chemotherapy-related cognitive impairment (CRCI), also known as "chemobrain," decreases the quality of life of cancer patients. It has been described that breast cancer patients are mostly affected; however, the mechanism leading to CRCI has not been fully elucidated. Recent research suggests microglia as the main architect of CRCI, as exposure to chemotherapy induces a reactive state in cells, promoting neuroinflammation. The aim of this research was to evaluate the effects of two commonly used drugs against breast cancer, cyclophosphamide (CTX) and epirubicin (EPI), on the SIM-A9 microglial cell line, using the 4T1 cell line (triple-negative murine breast cancer). Our results show that CTX and EPI induce cytotoxicity in microglial cells, being 5 and 2 times more cytotoxic for this model than for 4T1 breast cancer cells, respectively. Both chemotherapies induce DNA damage and cell cycle arrest in microglial and breast cancer cells. Furthermore, mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) decreases as cell death increases, and both chemotherapies induce the production of reactive oxygen species (ROS) in SIM-A9 and 4T1 cells. In addition, caspase activation increases with treatments, and pharmacological blockade inhibits CTX- and EPI-induced cell death. Finally, low concentrations of CTX and EPI induce  $\gamma$ -H2AX, and EPI induces cytokine release, NO production, and Iba-1 overexpression. This work paves the way for the study of immunomodulatory effects as potential agents against CRCI.



## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte entre las mujeres de todo el mundo (American Cancer Society 2017). Los tratamientos incluyen principalmente cirugía, radioterapia y quimioterapia. Dos agentes quimioterapéuticos comúnmente utilizados son las antraciclinas y los agentes alquilantes, como la epirubicina (EPI) y la ciclofosfamida (CTX) (Wu and Waxman 2015; Feng et al. 2016). La mayoría de las quimioterapias inducen la muerte celular regulada (MCR), un mecanismo por el cual la célula activa su propia maquinaria para autodestruirse (Galluzzi et al. 2018). Ambas quimioterapias, EPI y CTX, tienen mecanismos de acción similares que incluyen daños en el ADN (Taymaz-Nikerel et al. 2018), arresto del ciclo celular (Xiong et al. 2016), alteraciones mitocondriales y estrés oxidativo (Prasad et al. 2010), en diferentes líneas celulares tumorales y algunas líneas celulares no neoplásicas (Standish et al. 2008). Aunque las quimioterapias son efectivas contra las neoplasias, también inducen efectos secundarios, al atacar tejido no blanco de manera indiscriminada, induciendo náuseas, alopecia (Uchida et al. 2018), hepatotoxicidad y cardiotoxicidad (Wu et al. 2016b), disminuyendo directamente la calidad de vida del paciente. Las células del sistema inmune son frecuentemente dañadas por los tratamientos contra el cáncer (Verma et al. 2016), ya sea en todo el cuerpo o en órganos específicos, como el hígado, los pulmones y recientemente descrito, el cerebro (Matsos et al. 2017).

En este sentido, los estudios muestran que alrededor del 23% de los pacientes sobrevivientes al cáncer de mama, tratados con quimioterapia presentan deterioro cognitivo (Cerulla et al. 2019). Se sabe que el deterioro cognitivo inducido por quimioterapia (CRCI, por sus siglas en inglés) aparece tras el tratamiento quimioterapéutico de tumores no relacionados con el sistema nervioso central (SNC), y estudios recientes proponen a la microglía como principal artífice del CRCI (Gibson and Monje 2019). Las células de la microglía son macrófagos residentes de tejido, que desempeñan funciones vitales en el sistema nervioso central (SNC), como el mantenimiento de la homeostasis, la liberación de factores neurotróficos y la protección contra patógenos. Debido a su naturaleza de macrófagos, las células de la microglía producen citocinas y regulan la neuroinflamación, que se ha asociado a diferentes neuropatologías, como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y el deterioro cognitivo (McLeary et al. 2019). Estudios han

demostrado una disminución de la densidad de la materia blanca en pacientes después de la quimioterapia, lo que ha llevado a aumentar la investigación sobre la muerte celular en las células del sistema nervioso central (Matsos et al. 2017). Se sabe también, que en presencia de agentes quimioterapéuticos, las células de microglia pueden entrar en un estado reactivo, capaz de promover inflamación dentro de SNC y a su vez inducir citotoxicidad (Marques et al. 2020). Aún existe una laguna en el conocimiento sobre la susceptibilidad de las células del sistema nervioso central a las quimioterapias dirigidas a los tumores que no son del SNC.

El uso de agentes inmunomoduladores ha adquirido mucha importancia sobre SNC, principalmente para lograr modular la desregulación causada por quimioterapias (Gibson and Monje 2021). El IMMUNEPOTENT–CRP (I-CRP) es un extracto dializable de leucocitos de bazo bovino que induce un aumento de citotoxicidad de agentes quimioterapéuticos (Santana-Krímskaya et al. 2020), modula a células del sistema inmune activadas (Moisés A. Franco-Molina 2011), e induce un efecto mieloprotector (Coronado-Cerda et al. 2016) y la formación de autofagosomas en diversas líneas celulares (Reyes-Ruiz et al. 2021).

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto protector e inmunomodulador del I-CRP en el daño inducido por quimioterapias para proporcionar pruebas que apoyen el uso de agentes inmunomoduladores en el tratamiento para pacientes con cáncer.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 El cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizado por el crecimiento descontrolado de células anormales, sobrepasando sus límites habituales e invadiendo otros tejidos u órganos. Muchas de estas lesiones pueden ser causadas por factores exógenos o endógenos (National Cancer Institute 2020). El cáncer se puede originar en cualquier tejido, comenzando cuando las células crecen descontroladamente sobrepasando en número a las células sanas, lo cual dificulta el correcto funcionamiento del organismo (American Cancer Society 2017).

La carcinogénesis se presenta en distintas etapas, comienza con un daño a nivel del ADN, al que se le conoce como iniciación. Posteriormente las células que contienen el daño dan forma a una expansión clonal selectiva con el mismo daño que mantiene la célula original, con alteraciones genéticas y los protooncogenes que dan lugar a oncogenes, en esta etapa los genes supresores de tumores no funcionan de manera adecuada. La conversión maligna genera un fenotipo agresivo, con alta proliferación celular, supervivencia celular, resultando en esta etapa una mayor resistencia a la quimioterapia. Posteriormente, se presenta una característica más agresiva: la metástasis, durante la cual las células malignas encuentran la salida a otros tejidos para invadirlos y por último, generar un proceso cancerígeno generalizado.

Actualmente se manejan diferentes alternativas para el tratamiento de cáncer, una de las primeras opciones que surgieron fueron las quimioterapias, agentes químicos que tratan de eliminar las células que se comportan de manera aberrante. Estos interfieren en acciones metabólicas fundamentales para la supervivencia de la célula, sin embargo, en muchas ocasiones la citotoxicidad de estos agentes es muy alta y dañan a tejidos en los que estos agentes llegan de manera inespecífica e interfieren con su funcionamiento. Esa es una de las razones por la cual es urgente desarrollar mejores tratamientos, que no solo sean más eficaces contra el cáncer si no que de igual manera sean menos dañinos contra tejidos no blanco.

## 2.2 Cáncer de mama

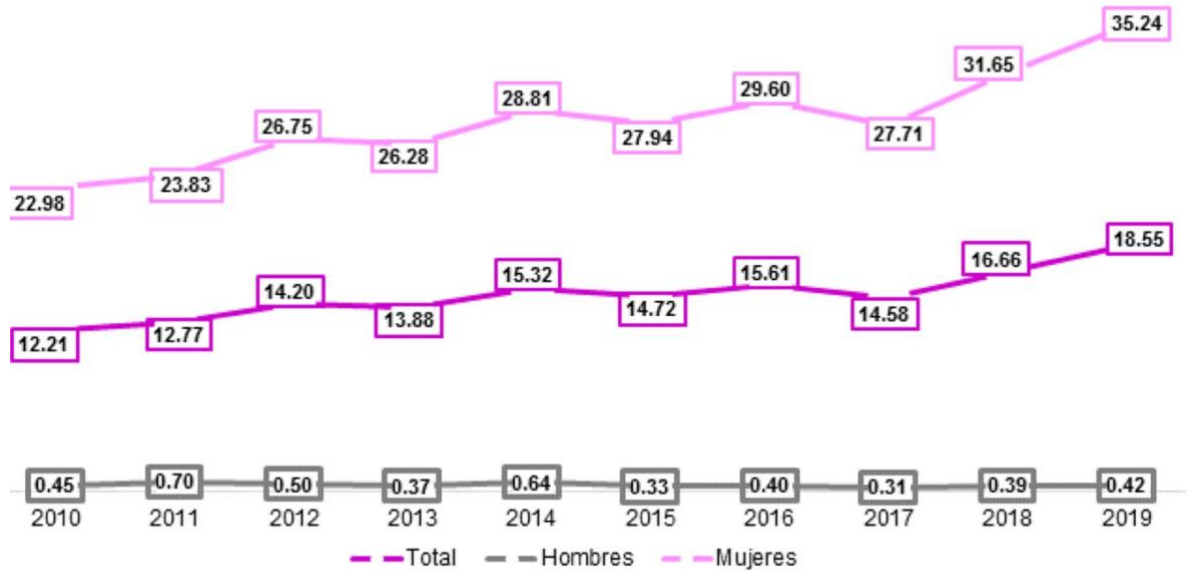
El cáncer de mama es la causa más frecuente de defunción en mujeres en México. Cada nueve minutos se detecta un nuevo caso y existen más de 60 000 mujeres de 14 años y más con este padecimiento. El Programa de Acción Cáncer de Mama de la Secretaría de Salud indicó que el rango de edad predominante de las mujeres con esta neoplasia se amplió a partir de 2006, pasando de 45 a 60 años, al de mujeres de 14 años y más. Asimismo, se ha convertido en la principal causa de decesos por procesos tumorales, superando al carcinoma cérvico uterino a partir de dicho año hasta la fecha (INEGI 2021).

El comportamiento del cáncer de mama en un periodo tan corto lo ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública, ya que puede afectar a un importante rango de la población femenina en edad productiva (20 a 59 años). La tasa de incidencia de cáncer de mama en México es de 74.18.55 sobre 100 mil de 20 años o más habitantes según la Dirección General de Epidemiología (DGE).

## 2.3 Clasificación molecular del cáncer de mama

### Incidencia de cáncer de mama en la población de 20 años y más por sexo 2010 a 2019

(Por cada 100 mil personas de 20 años y más de cada sexo)



Nota: Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), código C50. Excluye casos con edad no especificada.

Fuentes: SALUD, Dirección General de Epidemiología (DGE). (2021). Anuarios de Morbilidad 1984-2019. CONAPO (2018). Proyecciones de la Población de México y de las Entidades Federativas, 2016-2050.

Figura 1. Epidemiología del cáncer de mama entre hombres y mujeres de más de 20 años en el territorio nacional (INEGI 2021).

Dentro de las clasificaciones que existen para cáncer de mama, una de las más útiles es la clasificación molecular, la cual consiste en analizar la presencia o ausencia de receptores particulares que predicen la posible respuesta hacia algún tipo de terapia. Según la clasificación molecular, el cáncer de mama se divide en cuatro subtipos, dentro del que está el luminal A, luminal B, basal y el triple negativo.

La clasificación está dada por el receptor de estrógenos (RE), por el receptor de progesterona (RP), y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.

Subtipo	%	Aproximación inmunohistoquímica
<b>Basal</b>	15-20	RE <sup>-</sup> , RPr, HER-2 <sup>-</sup> Expresión Ki67 alta EGFR <sup>+</sup> CK5-6 CK14 y 17
<b>HER-2 +</b>	10-15	RE <sup>-</sup> , RPr, HER-2 <sup>+</sup>
<b>Luminal A</b>	40	RE <sup>+</sup> , RPr <sup>+</sup> , HER-2 <sup>-</sup> Ki67 < 14%
<b>Luminal B</b>	20	RE <sup>-/+</sup> , RPr <sup>+</sup> , HER-2 <sup>-/+</sup> Ki67 > 14%

Tabla 1. Subtipos moleculares de cáncer de mama. (Tomado y modificado de INCAN 2014).

El subtipo Luminal A es el más común (67% de los tumores) y está caracterizado por una alta expresión de genes relacionados con los receptores hormonales y una baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular. Por otro lado, el subtipo Luminal B muestra niveles más bajos de receptores de estrógeno y niveles elevados de genes relacionados con la proliferación. Ambos subtipos tienen un pronóstico favorable, aunque el Luminal B tiende a tener un pronóstico ligeramente peor debido a diferencias en la respuesta al tratamiento, ya que muestra una menor expresión de receptores de estrógeno. Ambos subtipos se tratan con hormonoterapia. El subtipo basal/mioepitelial se identificó por su patrón de expresión inmunohistoquímica, demostrando la presencia de citoqueratinas de alto peso molecular en las células mioepiteliales. Representa entre el 2 y el 18% de todos los cánceres de mama y se conoce como triple negativo debido a su falta de expresión de receptores de estrógeno, receptores de progesterona y HER2/neu. Este subgrupo expresa genes asociados con células mioepiteliales y su inmunofenotipo se caracteriza por la presencia de CK5, CK17, c-kit (una tirosina quinasa del epitelio mamario), factores de crecimiento de hepatocitos e insulina, calponina 1, caveolina y laminina (Nair et al. 2016).

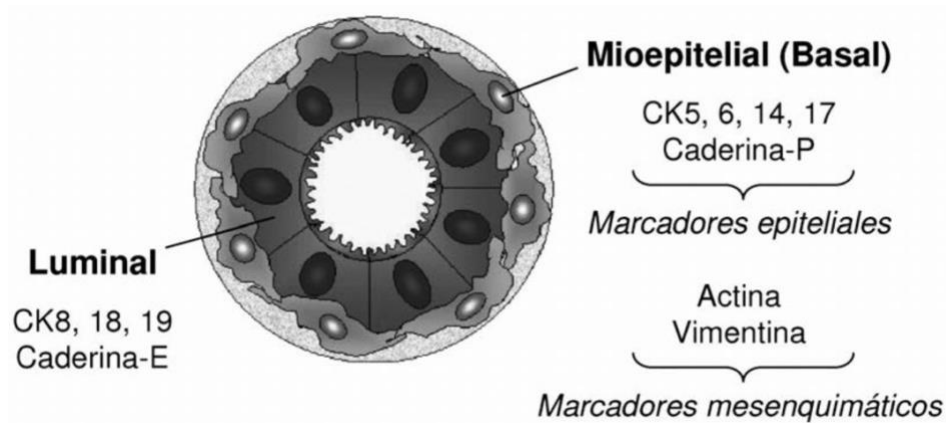


Figura 2. Subtipos de cáncer y sus marcadores. (Tomado de Imigo F, et al. 2011).

## 2.4 Tratamientos del cáncer de mama

Existen diferentes tratamientos para combatir el cáncer de mama, algunos físicos como cirugías y radioterapias, algunos otros químicos como quimioterapias y terapias hormonales, entre otras. Cada una de ellas tienen ventajas y desventajas pero conjuntan en el punto de necesitar (la mayoría de las veces) un esquema que integre terapias adyuvantes.

La cirugía oncoplástica de mama representa un enfoque conservador del tratamiento que permite la extirpación amplia del tumor sin comprometer la apariencia natural de la glándula mamaria. El principal factor limitante es la cantidad de tejido extirpado, que debe considerarse en función de la localización y el tamaño del tumor.

La quimioterapia debe ser prescrita y supervisada por un oncólogo médico en un entorno adecuado, con la asistencia de una enfermera especializada en oncología y administración de quimioterapia. Se deben proporcionar antieméticos para reducir la toxicidad gastrointestinal, así como factores estimulantes de la médula ósea para prevenir o tratar la neutropenia. Los esquemas se basan principalmente en antraciclinas debido a su beneficio en la supervivencia libre de enfermedad y en la supervivencia global en comparación con esquemas anteriores como el CMF (de acuerdo con la American Society of Clinical Oncology). En el caso de pacientes con tumores triple negativos (negativos para HER-2 neu, receptores de estrógeno y receptores de progesterona), se recomienda actualmente el uso de los mismos esquemas

mencionados anteriormente, ya que no hay evidencia hasta el momento que sugiera otros regímenes o fármacos.

Los esquemas más utilizados son los siguientes:

5- Fluoracilo, Antraciclina, Ciclofosfamida (FAC) o 5-Fluoracilo, Etopósido, Ciclofosfamida (FEC) seguido de paclitaxel semanal.
FEC seguido de docetaxel.
Antraciclina, Ciclofosfamida seguido de paclitaxel.
Tamoxifeno, Antraciclina, Ciclofosfamida.
Tamoxifeno, Ciclofosfamida.
Dosis densas de Antraciclina, Ciclofosfamida, seguido de dosis densas de paclitaxel.
Dosis densas de Antraciclina, Ciclofosfamida, seguido de paclitaxel semanal

Tabla 2. Esquema terapéutico para cáncer de mama. (Tomado de INCAN, 2014).

## 2.5 Epirrubicina

Las antraciclinas son antibióticos con actividad antitumoral. Mantienen una estructura anular tetracíclica unida a daunosamina, la cual se encuentra unida a anillos adyacentes de quinona e hidroquinona, que permiten la ganancia y pérdida de electrones. El mecanismo principal de acción de la epirrubicina es intercalarse con el DNA y afectar directamente su transcripción y replicación (Figura 4). Se une al DNA de una manera específica que evita que se una el homodominio de helicasa y la topoisomerasa II, lo que evita un correcto procesamiento del material genético y esto a ser censado por el p53 que llevará a la célula a la apoptosis por la vía intrínseca. Los mecanismos de reparación de rupturas de doble cadena de DNA sensibilizan a las células a daños, en tanto que la expresión excesiva de la reparación del DNA ligada a la transcripción puede contribuir a la resistencia.



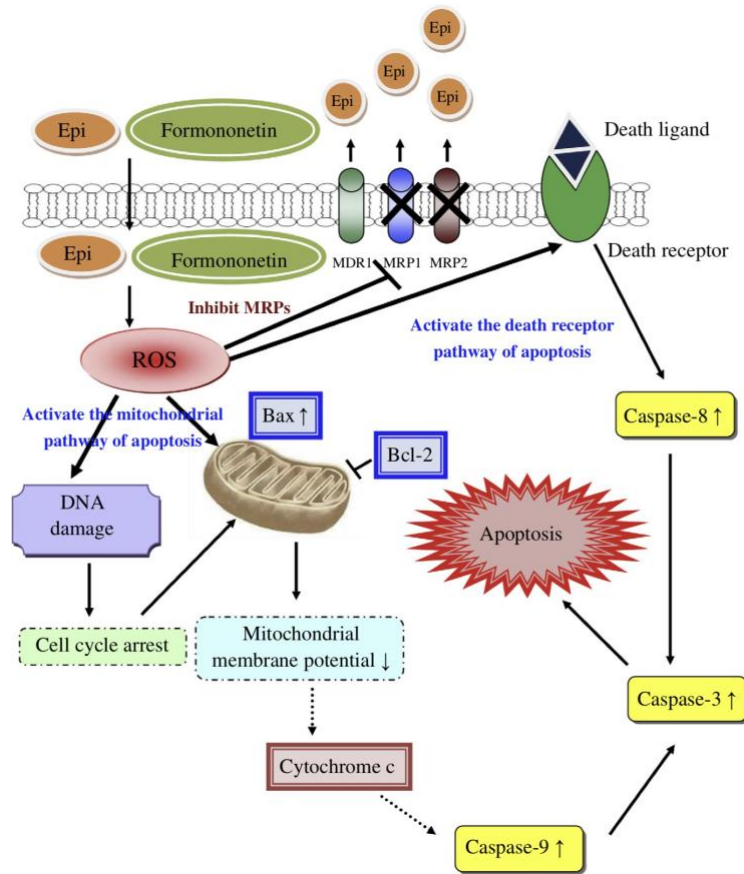


Figura 3. Mecanismo de muerte de la epirrubicina descrito para células HeLa (tomado de Yu-Li Lo, Wajen Wang, 2013).

Debido a sus grupos quinolona, las antraciclinas han probado ser capaces de inducir la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que atacan a tejidos sin discriminar entre neoplásico o sano. Estas, se expulsan de las células por miembros de la familia de transportadores MRP (Taymaz-Nikerel et al. 2018).

Se ha demostrado que la presencia de autofagosomas vuelve resistentes a las células triple negativas de cáncer de mama a las antraciclinas, ya que al inhibir los autofagosomas, se aumenta su citotoxicidad (Chittaranjan et al. 2014).

Como todas la quimioterapias, la epirrubicina produce efectos adversos para los pacientes, tal es el caso de la citotoxicidad cardiaca, esto por la acumulación de hierro intracelular en dosis mayores de 200 mg/m<sup>3</sup> de epirrubicina. Esto podría generar una

peroxidación de la cardiolipina y liberación de citocromo C de la membrana mitocondrial interna.

Se ha planteado una posible disminución en la expresión del mensajero que codifica para el receptor de  $Ca^{2+}$  - ATPasa del retículo sarcoplásmico, que resulta en una disminución de la contractibilidad del musculo cardiaco, lo que puede generar, arritmias, necrosis del tejido, infarto al miocardio, entre otras complicaciones (Figura 5).

La exposición a epirrubicina en tratamientos prolongados, genera daño en el mtDNA resultando en una alteración en la cadena de transporte de electrones por una dismunción de la actividad peroxidasa de glutatión cardiaca (GSHPx). La presencia de ROS parece ser la responsable de otros defectos en la cadena de transporte de electrones, y a la liberación del citocromno C de la mitocondria, llevando a la célula a apoptosis (Vakifahmetoglu-Norberg et al. 2017).

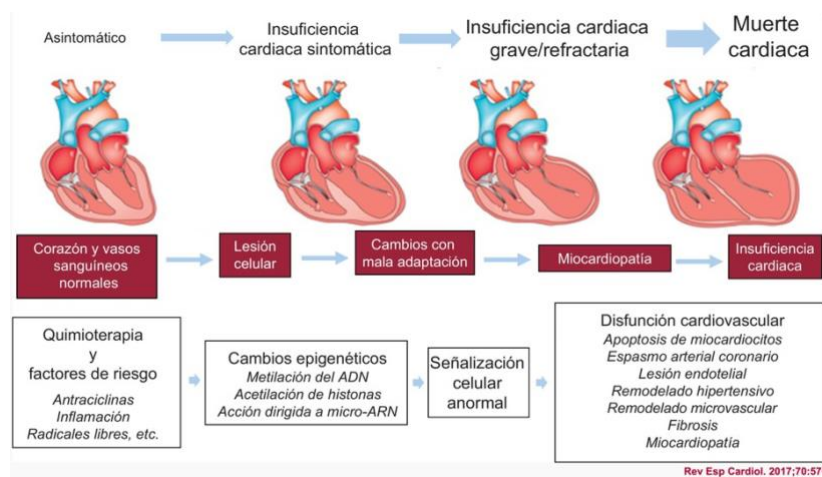


Figura 4. Cardiotoxicidad mediada por antraciclinas (Tomado de Rev. Esp. Cardiol. 2017).

Tomando en cuenta que se puede generar una mielosupresión severa dependiente de dosis y la cardiotoxicidad, es importante evaluar la posibilidad de emplear agentes adyuvantes que generen un efecto sinérgico con esta terapia para reducir su dosis (Gorini et al. 2018).

## 2.6 Ciclofosfamida

La ciclofosfamida es un agente alquilante activado por CYP2B en el hígado, lo que genera cambios conformacionales en la molécula.

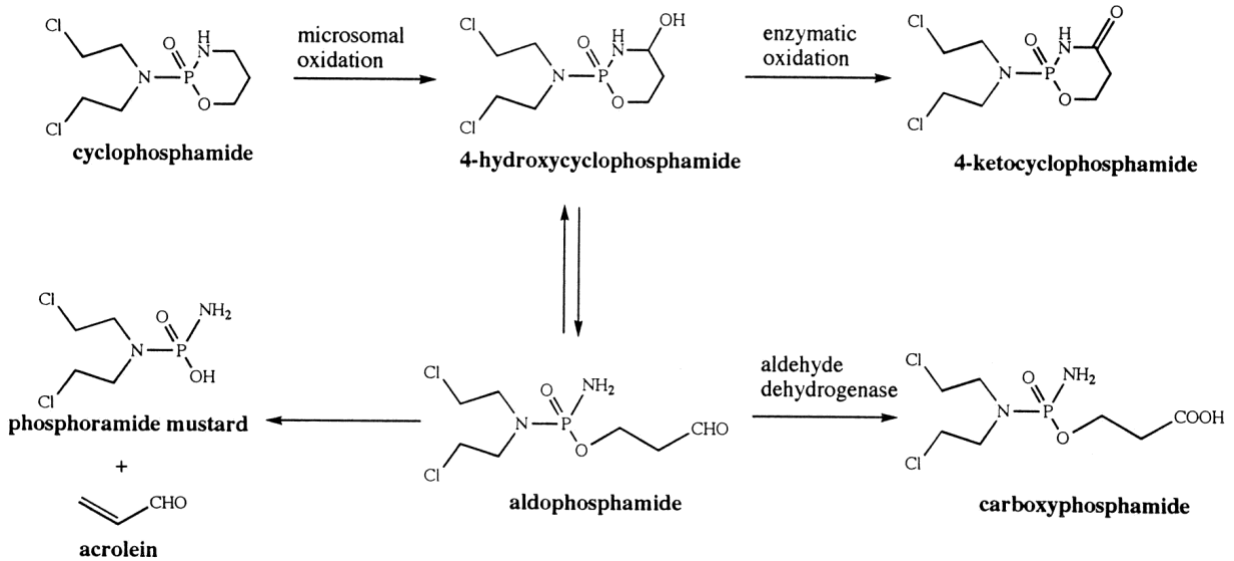


Figura 5. Metabolismo de la ciclofosfamida (Tomado de Ching Tia-Leng et al. 1997).

La hidroxyciclofosfamida y su taumtomero aldofosfamida se transportan a las células tumorales por circulación, donde la aldofosfamida se segmenta espontáneamente y genera fosfamida mostaza y acroleína. La fosfamida mostaza es el complejo activo antitumoral y al parecer la acroleína se encuentra ligada a la mayoría de los efectos secundarios de esta. La fosfamida mostaza genera enlaces covalentes por alquilación con nucleófilos. El átomo de nitrógeno 7 de la guanina es susceptible a la formación de enlaces covalentes, lo que representa un blanco particular para realizar su función. De igual manera forma enlaces con el átomo 6 de la guanina, el átomo nitrógeno 3 de la citocina, nitrógeno 1 y 3 de la adenina (Jeelani et al. 2017).

El mecanismo de muerte celular, implica el reconocimiento por p53 del DNA que se encuentra dañado, bloqueando el ciclo celular en la fase G1/S, y desencadenando la apoptosis (Figura 7).

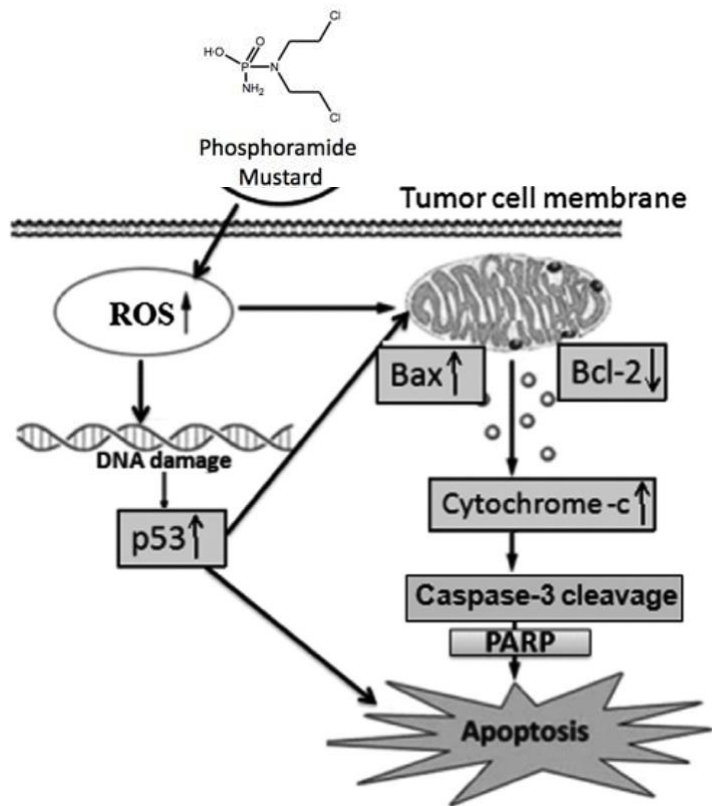


Figura 6. Mecanismo de acción de la ciclofosfamida (Tomado y modificado de Ahlmann M, Hempel G. 2016).

Dependiendo de la dosis, la ciclofosfamida afecta a los tumores por vía citotóxica directa o por aumento de la actividad inmunogénica anti-tumoral. Administrar ciclofosfamida en altas cantidades es tóxico, dado a su actividad como agente alquilante, que lleva a la inhibición de la replicación del DNA y a la apoptosis de células tumorales y de células linfoides. Este efecto citotóxico en células linfoides es observado en células en división, así como en células en reposo. Sin embargo, haciendo un lado sus acciones quimioterapéuticas potentes, la ciclofosfamida ha ganado atracción como un tratamiento inmunosupresor en muchos trasplantes alogénicos de células madre. Incluyendo a la ciclofosfamida en regímenes para trasplantes haploidénticos que son realizados para tratar malignidades hematológicas, este, puede sobrepasar el rechazo inmunogénico (Wu and Waxman 2015).

La dosis, el tiempo y la secuencia de la administración de la ciclofosfamida puede llevar a una depleción no específica de células inmunes para posteriormente ser usado como agente linfodepletante antes de administrar una terapia celular adoptiva, condicionando a los pacientes antes del trasplante de células madre así como situaciones quimioterapéuticas que puedan ayudar en neoplasias linfoproliferativas. Por otro lado, las dosis bajas de ciclofosfamida pueden tener efecto antitumorales que aumenten la respuesta inmunológica (Schiavoni et al. 2011).

La ciclofosfamida puede promover la infertilidad, debido a su capacidad de intervenir con la ovogénesis y la espermatogénesis y esta es irreversible. La cistitis hemorrágica, está dada por la fosforamida mostaza circulante en las nefronas y la incapacidad de estas de desecharla de manera correcta. Su capacidad de permear barrera hematoencefálica ha demostrado generar afecciones neurológicas como la pérdida de memoria a corto plazo, emésis poco controlable y genera un perfil de inflamación crónica cerebral (Emadi Ashkan et al. 2016).

## **2.7 Las quimioterapias y su correlación con el sistema inmune.**

Actualmente se conoce que los pacientes que se encuentran en tratamiento quimioterapéutico pueden presentar una disminución en las capacidades del sistema inmune debido a la citotoxicidad no blanco inducida por el agente químico, haciéndolo más susceptible a infecciones (Wijayahadi et al. 2007). Sin embargo, se sabe que algunos tipos de quimioterapias pueden ayudar a controlar el microambiente tumoral, como es el caso de la ciclofosfamida (Wu and Waxman 2015).

Dosis bajas de ciclofosfamida son efectivas para tratar tumores en ratones inmunocompetentes pero no en ratones desnudos, indicando que el efecto de las dosis bajas de ciclofosfamida están mediadas por el sistema inmunológico, en donde dosis altas de ciclofosfamida llevan a respuestas antitumorales en ambos tipos de ratones. Dosis altas de ciclofosfamida tienen un impacto importante en el decremento de linfocitos infiltrantes de

tumor, donde dosis bajas de ciclofosfamida muestran una mayor infiltración en los tumores (Eid et al. 2016) (Figura 8).

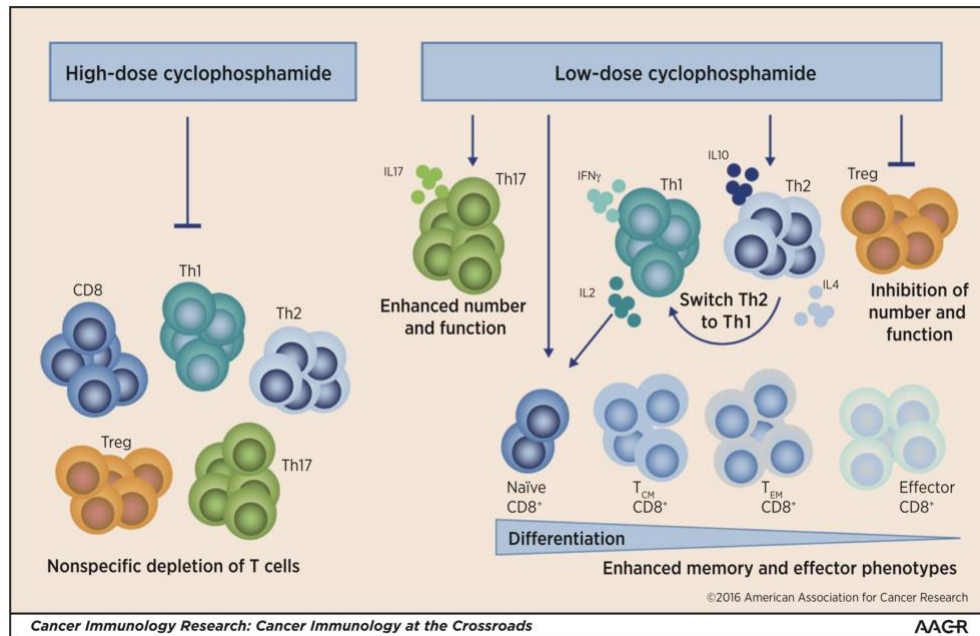


Figura 7. Mecanismo de inmunomodulación dependiente de dosis de la ciclofosfamida (Tomado de Abud Eid et al. 2016).

A dosis bajas se ha demostrado que la ciclofosfamida disminuye el número de funciones y de población de linfocitos Treg, algunos autores creen que esto es debido a la inhibición del Foxp3 o la pérdida de función de este, sin embargo, puede ser un proceso metabólico el cual este afectando directamente a la célula (Figura 9) (Abud Eid et al. 2016).

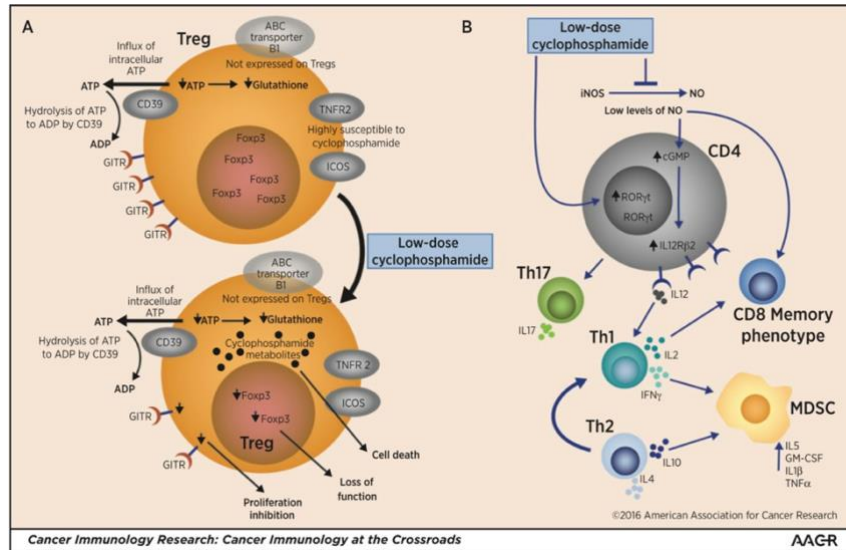


Figura 8. Efecto de la disminución de la función y número de Linfocitos Treg y modulación de otras células del sistema inmune a dosis bajas (Tomado de Abud Eid et al. 2016).

Tomando en cuenta que el efecto de las dosis bajas de ciclofosfamida reduce en cantidad considerable las funciones de los linfocitos T reguladores, se ha reportado un incremento del número de las células supresoras derivadas de mieloides en el microambiente tumoral. Se ha especulado que este fenómeno es debido al incremento de mediadores de inflamación, como GM-CSF, IL1b, IL-5, IL-10, IFN y TNF. Este efecto colabora con su acción antitumoral inmunogénica.

La epirubicina se emplea hoy en día como una alternativa al tratamiento con otras antraciclinas como la DOX, dada a su menor citotoxicidad, sin embargo, se han demostrado casos en donde el paciente presenta cardiopatías derivadas del tratamiento con EPI (Conte et al. 2000), de igual manera, se cree que este efecto podría estar potenciado por un aumento de proteínas pro-apoptóticas en diferentes tejidos del cuerpo (Peng et al. 2020), a lo que la mayoría de los autores concuerda, que si bien es una buena alternativa con menores efectos secundarios, es importante monitorear la progresión de los pacientes en tratamiento, sin dejar de lado esta consecuencia que se ha descrito permanente y en algunos casos mortal (McGowan et al. 2017).

Algunas otras quimioterapias son capaces de inducir muerte celular inmunogénica, debido al estrés celular causado por el agente químico que desencadena la respuesta inmunitaria antitumoral mediante la liberación/exposición de patrones moleculares

asociados al daño (DAMPs) de las células tumorales y la promoción del campo de liberación de quimiocinas y citocinas (Galluzzi et al. 2015). De los principales DAMPs expuestos o liberados incluyen la translocación de calreticulina (CRT) en la membrana, el grupo de alta movilidad liberación de caja 1 (HMGB1), translocación de proteína de choque térmico (HSP), secreción de trifosfato de adenosina (ATP) e interferón tipo 1 (IFN). La liberación/exposición de DAMPs promueve que las células inmunes puedan viajar de manera quimiotáctica al sitio del tumor y reconozcan las células cancerosas para generar el reconocimiento del antígeno y su posterior procesamiento para erradicar el campo tumoral (Vankerckhoven et al. 2021). De igual manera, la quimioterapia produce estrés celular, si este estímulo no es suficiente para causar la muerte puede provocar la expresión de moléculas pro-apoptóticas involucradas en células inmunes como Fas, también receptores de ligandos inductores de apoptosis que están relacionados con el factor de necrosis tumoral (TNF), así como también es capaz de aumentar ROS en células diana y no diana. Este efecto que tiene la quimioterapia promueve la activación de la respuesta inmune de manera efectiva contra las células cancerosas (Blaser et al. 2016).

Las antraciclinas están ampliamente reportadas como inductores de muerte celular inmunogénica (Feng et al. 2016)(Gebremeskel and Johnston 2015) sin embargo, particularmente la EPI, se ha demostrado que posee un potencial inmunogénico mediante la liberación de HMGB1(Arnold et al. 2013), además se demostró su capacidad para inducir liberación de ATP y la formación de autofagosomas en células tumorales (Reyes-Ruiz et al. 2021).

La doxorubicina, ha demostrado tener un potencial proinflamatorio en interacción con células del sistema inmune, particularmente con células del SNC, como lo son las células de microglia, en donde al interactuar con este agente quimioterapéutico, se induce un estado senescente capaz de producir citocinas pro-inflamatorias, iniciando un proceso de neuroinflamación (Marques et al. 2020).

## **2.8 Comunicación cruzada entre sistema inmune central y microglía.**



En condiciones homeostáticas, el sistema nervioso central se considera como un sitio inmunológicamente privilegiado y su entorno está 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, microglía, astrocitos, oligodendrocitos y progenitores NG2-glía (Lécuyer et al. 2016). La microglía son 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 (Dingezweni 2020).

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 e iones, participación en la sinapsis tripartita así como la contribución al mantenimiento de la barrera hematoencefálica (Sofroniew and Vinters 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, es por lo que se debe tener en consideración a este tipo de células en neuropatías. (Lee and Kim 2020)

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

La interacción entre el sistema inmune periférico y la microglía se ha descrito en la esclerosis lateral amiotrófica y en un conjunto de condiciones neurodegenerativas, 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 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 está 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. (Uchida et al. 2018). 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 (Lee 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, enfermedad de Huntington, entre otras, esto después de infecciones sistémicas (Neher and Cunningham 2019) (Vieira and Gamarra 2016). 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 visas 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 (Gensel and Zhang 2015).

## **2.10 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 (Guadagno et al. 2013). 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 (Yuste et al. 2015). La evidencia reciente respalda la idea de que los procesos neuroinflamatorios que involucran células inmunes, células gliales y células neuronales son cruciales y fundamentales para comprender el origen o patogénesis de una enfermedad. Además, la inflamación periférica juega un papel importante en la neuroinflamación aumentando las respuestas inflamatorias del cerebro a través de varios mecanismos.

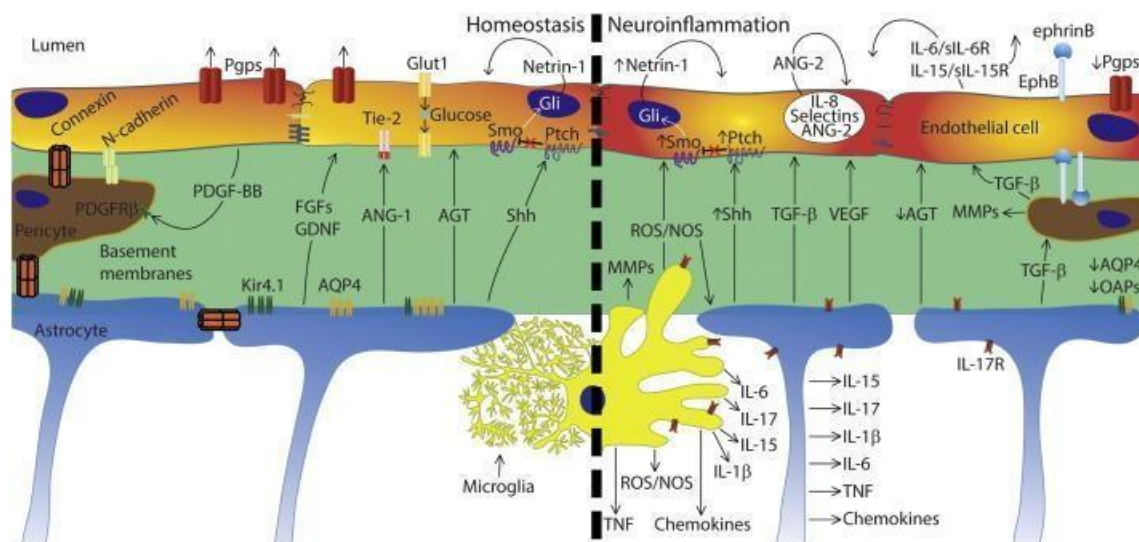


Figura 9. Regulación paracrina y autocrina de la BBB durante la homeostasis y la inflamación (Marc-André Lécuyer, 2016).

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 a la muerte celular, 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 citoquinas y ROS, lo que puede activar a las células inmunitarias periféricas, residentes de tejido del hígado y cerebro (Du et al. 2021). 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 de la microglia, astrocitos y oligodendrocitos. Estos procesos ocasionan el aumento la neurotoxicidad y neuroinflamación que se dirige a una neurodegeneración y senescencia celular. (Monje and Dietrich 2012)(Frank et al. 2019)

Existen otras enfermedades caracterizadas por inducir un perfil pro-inflamatorio, comprometiendo el funcionamiento del SNC, como la enfermedad por coronavirus de 2019 (COVID-19), que es una enfermedad infecciosa causada por el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2), este es un virus ssRNA envuelto y de detección positiva que se caracteriza por su morfología en forma de corona que afecta el sistema respiratorio humano varían de condiciones leves a severas (Georgiev 2020). La COVID-19 causada por el SARS-CoV-2 es una enfermedad de emergencia de salud pública mundial de importancia internacional, el sello distintivo de la patogénesis es la tormenta de citocinas con niveles elevados de interleucina-6 (IL-6), IL-1 $\beta$ , factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), y factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF)(Wu and Yang 2020). La COVID-19 puede causar neumonía grave y trastornos neurológicos, como accidente cerebrovascular, daño a la unidad neurovascular, alteraciones de la barrera hematoencefálica, citocinas proinflamatorias intracraneales elevadas y daño de las células endoteliales en el cerebro (Cevik et al. 2020). La COVID-19 puede inducir la neuroinflamación, por lo que el SARS-CoV-2 puede activar monocitos / macrófagos, células dendríticas, células T, mastocitos, neutrófilos e inducir una tormenta de citocinas en el pulmón que puede entrar al torrente sanguíneo y llegar a diversos órganos como el cerebro ocasionando neurotoxicidad y neuroinflamación. (Merad and Martin 2020)(Steardo et al. 2020)(Cevik et al. 2020).

## **2.10 Neurodegeneración y Patologías asociadas**

La edad, infección y la inflamación sistémica de carácter agudo o crónico son circunstancias que puede 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) (Santos and Pyter 2018). La enfermedad de Alzheimer (EA) es el trastorno neurodegenerativo más común en todo el mundo, y su principal manifestación clínica es la demencia progresiva (Pang et al. 2018). 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 (Plaza-Zabala et al. 2017). Los datos publicados mostraron que la administración crónica de LPS produjo deterioro de la memoria espacial en ratones Sprague Dawley y ratas Fisher (Carla Ribeiro Alvarez Batista, 2019).

Otra patología asociada a la neuroinflamación es la enfermedad de Parkinson (EP), caracterizada por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra pars compacta (SNpc), lo que resulta en un trastorno del movimiento (Plaza-Zabala et al. 2017). 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. (Yuste et al. 2015)

### **2.11 Deterioro cognitivo asociado a la quimioterapia**

El deterioro cognitivo asociado a la quimioterapia o también llamado “Chemobrain” o “chemofog” es una afección causada por el tratamiento con agentes quimioterapéuticos, que presenta una cantidad considerable de síntomas, donde se encuentran déficits de atención, pérdida de memoria a corto plazo, deficiencia de lenguaje, entre otras (Monje and Dietrich 2012).

Las causas aún no se encuentran bien descritas, sin embargo distintos mecanismos se han propuesto, uno de ellos la activación de las células de la microglía (Gibson and Monje 2019).

La microglia se encuentra bien integrada en la red neuronal glial de un sistema nervioso central sano. Está distribuida en todas las regiones del cerebro y la variación de densidades entre materia blanca y gris es de aproximadamente 5%. La morfología de estas células en reposo es caracterizada por ser muy pequeña con una forma un tanto redondeada. En condiciones normales, las células de la microglía no intervienen en los procesos neuronales y estos se mantienen estables. Una vez que se da el reconocimiento de un agente patógeno o cualquier estímulo inflamatorio, la microglía puede activarse y volverse efectora. Estas observaciones están dadas por un número amplio de receptores, como los receptores tipo-Toll, receptores basurero y algunos otros receptores de citocinas y quimiocinas (Gensel and Zhang 2015)

Gibson E, y colaboradores demostraron que el uso de metotrexato, un agente quimioterapéutico, genera anormalidades en oligodendrocitos y en su dinámica celular, debido a una reducción de mielina en sus vainas y esto se encuentra a muchos déficits de comportamiento como velocidad de reacción baja, ansiedad, y defectos cognitivos persistentes. Sorprendentemente mostraron que estos defectos eran muestra del daño asociado a la quimioterapia en el microambiente cerebral, una alteración en la maduración de los oligodendrocitos. Al parecer estos efectos eran mediados por la microglía, ya que depleción farmacológica de la microglía corregía el daño causado por el metotrexato, directamente la maduración de los oligodendrocitos y la presencia de mielina en las vainas así como todos los déficits de comportamiento asociados a este fármaco. Todo parece indicar que la activación de la microglia y la producción de citocinas pro inflamatorias, particularmente el TNF, IFN y NOS como una triada citotóxica, generan estos efectos. Por lo tanto el uso de un agente inmunomodulador en presencia de quimioterapia podría tener un efecto muy interesante (Gibson et al. 2019)(Gibson and Monje 2019)(Geraghty et al. 2019).

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 (El-Agamy et al. 2018). Recientemente ha aumentado el interés en la reutilización de fármacos, especialmente en nuevas terapias de combinación, o en enfermedades con una necesidad

clínica insatisfecha, como las enfermedades huérfanas y desatendidas. 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 (Wen et al. 2017). 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 inmunomoduladoras y antioxidantes que puedan reducir el CRCI (Briones and Woods 2011; Wen et al. 2017).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Los agentes quimioterapéuticos son capaces de inducir citotoxicidad sobre células tumorales, sin embargo, estos no lo hacen de manera selectiva, únicamente en estas células. Hoy en día existen un gran número de reportes que apuntan a que las quimioterapias son capaces de inducir diversos efectos negativos sobre tejido no blanco y particularmente, sobre el sistema inmune, induciendo citotoxicidad, desregulación y en algunos casos depleción. Además, recientemente se ha descrito que las quimioterapias pueden inducir efectos negativos sobre el sistema nervioso central como un aumento del estrés oxidativo y promoción del fenotipo de neuroinflamación llevando a una pérdida de la homeostasis, comprometiendo su funcionamiento.



#### **4. HIPÓTESIS**

La epirrubicina (EPI) y ciclofosfamida (CTX) inducen un efecto citotóxico y proinflamatorio sobre células de microglía.

## **5. OBJETIVO GENERAL**

Analizar el efecto citotóxico y proinflamatorio de la epirubicina (EPI) y ciclofosfamida (CTX) sobre células de microglía.

### **5.1 Objetivos específicos**

- 1. Evaluar el mecanismo citotóxico inducido por EPI y CTX sobre células de microglía.**
- 2. Analizar el efecto pro-inflamatorio inducido por EPI y CTX sobre células de microglía.**

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Líneas celulares y su mantenimiento.**

#### **6.1.1 Cultivo de células**

Se obtuvieron células de microglía murina SIM-A9 (ATCC® HTB-22™) y cáncer de mama murino 4T1 (ATCC® HTB-26™) de la American Type Culture Collection (ATCC) y se cultivaron en DMEM-F12 completo o RPMI para 4T1 y se cultivaron de forma rutinaria siguiendo las instrucciones de la ATCC. Las células se mantuvieron en una incubadora humidificada que contenía CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C.

#### **6.1.2 Condiciones de tratamiento**

Las células se mantuvieron en DMEM-F12 y RPMI-1640 complementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % y penicilina-anfotericina-estreptomicina al 1 % (GIBCO by Life Technologies, Grand Island, NY) denominado DMEM-F12 completo o RPMI. La epirubicina (Farmorubicin RD®), EPI, se adquirió de Pfizer (Ciudad de México, México) y se disolvió en agua estéril. La ciclofosfamida (Cryofaxol®), CTX, se adquirió de Cryopharma (Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México) y se disolvió en DMEM-F12 completo o RPMI. Todas las soluciones madre se envolvieron en papel de aluminio y se almacenaron a -20 °C.

#### **6.1.3 Evaluación de viabilidad celular**

La pérdida de la viabilidad celular se determinó con Alamar blue (prueba de resazurina). Las células ( $5 \times 10^3$ ) se sembraron en microplacas de 96 pocillos de fondo plano y se expusieron a diferentes concentraciones de EPI y CTX durante 24 h. De acuerdo con las instrucciones del fabricante, se agregaron 20 µL de solución de resazurina (0.15 mg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a cada pozo y se incubaron durante 4 horas a 37 °C, luego de

lo cual se midió la fluorescencia a 590 nm utilizando un lector de microplacas (Varioskan Lux, Thermofisher®).

#### **6.1.4 Análisis de muerte celular**

Para la inducción de la muerte celular, se sembraron  $5 \times 10^4$  células en placas de 24 pocillos (CORNING). Las células se trataron con las concentraciones indicadas de EPI o CTX y se incubaron durante 24 horas a 37°C. A continuación, las células SIM-A9 se despegaron utilizando una solución de glucosa (1 mg/ml), EDTA (1 mM) y EGTA (1 mM) recomendada por la ATCC para SIM-A9 y se utilizó tripsina (GIBCO) para las células 4T1. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en 100 µl de buffer de unión anexina (HEPES 100 mM pH 7.4, NaCl 1.4 M y CaCl<sub>2</sub> 25 mM) tiñendo las células con anexina-V-APC (0.1 µg/ml, BD Biosciences). A continuación, las células se evaluaron con un citómetro de flujo BD Accury 6 y se analizaron con el software FlowJo.

#### **6.1.5 Evaluación de $\gamma$ -H2AX, p53 y p16.**

Las células se sembraron ( $2 \times 10^5$ ) en placas de 6 pocillos (CORNING) y se incubaron después del tratamiento con una concentración citotóxica de 50 (CC<sub>50</sub>) durante 24 horas. Después de la incubación, las células se separaron, se lavaron con PBS y se fijaron con metanol al 80 % (PBS al 20 %) y se almacenaron durante la noche a -20 °C. Posteriormente, las células se lavaron con buffer FACS con 2% SFB y luego se rehidrataron con buffer FACS con 10% SFB y se colocaron a 4 °C durante 30 minutos.

Para la evaluación de  $\gamma$ -H2AX, p53 y p16, el anticuerpo monoclonal de ratón ab26350 [9F3] contra gamma H2A.X (fosfo S139. Abcam, Cambridge, Reino Unido), anticuerpo sc-126 DO-1 (Santa Cruz, TX, EE. UU.) o p16 INK4a (ab108349), respectivamente, se incubaron en tampón FACS al 2 % en agitación constante durante 1 hora y se lavaron con buffer FACS al 2 %. Posteriormente, se añadió un anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (ab150077) para  $\gamma$ -H2AX y p16 o Alexa Fluor 488 (A11001. Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) para p53 en agitación constante durante 30 minutos y se lavó con

FACS con 2 % SFB. Por último, las células se evaluaron con un citómetro de flujo BD Accury 6 y se analizaron como se mencionó anteriormente.

#### **6.1.6 Análisis del ciclo celular**

Se incubaron  $2 \times 10^5$  células en placas de 6 pocillos (CORNING) con las concentraciones indicadas de EPI o CTX durante 24 h. A continuación, las células se lavaron y fijaron en etanol al 70 % (PBS al 30 %). Las células se lavaron de nuevo y la distribución del ciclo celular se determinó mediante tinción con yoduro de propidio (PI) de ADN. Las células se trataron simultáneamente con 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PI y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de RNasa a 37 °C durante 20 min.

#### **6.1.7 Análisis de degradación del ADN**

Se incubaron  $2 \times 10^5$  células en placas de 6 pocillos (CORNING) con las concentraciones indicadas de EPI o CTX durante 24 h. A continuación, las células se lavaron y fijaron en etanol al 70 % (PBS al 30 %). Las células se lavaron de nuevo y la distribución del ciclo celular se determinó mediante tinción con yoduro de propidio (PI) de ADN. Las células se trataron simultáneamente con 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PI y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de RNasa a 37 °C durante 20 min. Para la degradación del ADN, analizamos la población SubG1 obtenida del análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.

#### **6.1.8 Análisis de pérdida de potencial de membrana mitocondrial**

Para esta evaluación, se sembraron  $5 \times 10^4$  células en placas de 24 pozos (CORNING) y luego se trataron con CC50 de CTX o EPI durante 24 h. A continuación, se recuperaron las células y se lavaron con PBS. Se marcaron a las células con DIOC6 (0,1  $\mu\text{M}$ ) (Invitrogene) incubando las células a 37 °C durante 30 min y lavándolas dos veces con PBS.

Posteriormente, las células se evaluaron mediante citometría de flujo y se analizaron utilizando el software FlowJo.

#### **6.1.9 Análisis de producción de ROS y su rol en la muerte celular**

Las células se sembraron ( $5 \times 10^4$ ) en placas de 24 pocillos (CORNING) y se incubaron con cada quimioterapia a  $CC_{50}$  durante 24 horas. Posteriormente se recuperaron y se lavaron con PBS. La generación de ROS se midió mediante tinción DCFDA-AM (20 mM) (Thermo Fisher Scientific) que se incubó a 37 °C durante 30 min. Para evaluar la muerte celular dependiente de ROS, las células se pretrataron con N-acetil-cisteína (NAC) durante 30 minutos, luego, las células se trataron con  $CC_{50}$  de EPI o CTX. Después de 24 horas, las células se separaron y se resuspendieron en 100  $\mu$ L de buffer de unión anexina tiñendo las células con anexina-V-APC, para finalizar evaluando la muerte celular por citometría de flujo.

#### **6.1.10 Análisis de activación de caspasas y su rol en la muerte celular**

Las células se sembraron ( $5 \times 10^4$ ) en placas de 24 pocillos (CORNING) y se incubaron con cada quimioterapia a la  $CC_{50}$  durante 24 horas. Posteriormente se recuperaron y se lavaron con PBS. La activación de caspasas se evaluó mediante General Caspase Activation Assay (Thermo Fisher Scientific) que se incubó a 37 °C durante 30 min. Para evaluar la muerte celular dependiente de caspasas, las células se pretrataron con QVD-OpH (QVD) durante 30 minutos, luego, las células se trataron con la  $CC_{50}$  de EPI o CTX. Después de 24 horas, las células se separaron y se resuspendieron en 100  $\mu$ L de buffer de unión anexina tiñendo las células con anexina-V-APC, para finalizar evaluando la muerte celular por citometría de flujo.

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

Las células se sembraron ( $5 \times 10^4$ ) en placas de 24 pocillos (CORNING) y se incubaron con cada quimioterapia a  $CC_{50}$  durante 24 horas. Posteriormente se recuperaron y se lavaron con PBS. La generación de ROS se midió mediante tinción DAF-FM (10 mM) (Thermo Fisher Scientific) que se incubó a 37 °C durante 30 min. Por último se lavaron las muestras dos veces y se llevó a cabo el análisis por citometría de flujo.

#### **6.1.12 Evaluación de la liberación de citocinas.**

Se sembraron células SIM-A9 en placas de 24 pocillos (CORNING) a una confluencia de  $5 \times 10^4$  células/pocillo, y se incubaron con concentraciones sub letales (CSL) y  $CC_{20}$  de EPI por 24 horas, posteriormente, se recolectaron los sobrenadantes y se evaluó el perfil de liberación de citocinas por citometría de flujo, mediante el uso del kit Mouse inflammation Cytokine Assay ( BD Pharmigen, Franklin Lakes, NJ, USA).

#### **6.1.13 Evaluación de Iba-1.**

Las células se sembraron ( $2 \times 10^5$ ) en placas de 6 pocillos (CORNING) y se incubaron después del tratamiento con una concentración citotóxica de 50 ( $CC_{50}$ ), 20 ( $CC_{20}$ ) y a concentraciones no letales (CSL) durante 24 horas. Después de la incubación, las células se separaron, se lavaron con PBS y se fijaron con metanol al 80 % (PBS al 20 %) y se almacenaron durante la noche a -20 °C. Posteriormente, las células se lavaron con buffer FACS al 2% y luego se rehidrataron con buffer FACS al 10% y se colocaron a 4 °C durante 30 minutos.

Para la evaluación de Iba-1, se utilizó anticuerpo policlonal contra Iba-1 (PA5-27436, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Se incubaron en tampón FACS al 2 % en agitación constante durante 1 hora y se lavaron con buffer FACS al 2 %. Posteriormente, se añadió un anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (ab150077) en agitación constante durante 30 minutos y se lavó con FACS al 2 %. buffer. Por último, las células se evaluaron con un citómetro de flujo BD Accury 6 y se analizaron como se mencionó anteriormente.

#### **6.1.14 Evaluación de la autofagia**

Se sembraron células en placas de 24 pocillos (CORNING) a una confluencia de  $5 \times 10^4$  células/pocillo, y se incubaron con CC50 de EPI o CTX solo o pretratadas durante 30 min con spautin-1 (Abcam) (inhibidor de autofagia). Posteriormente, las células se recolectaron y tiñeron usando CYTO ID (tecnologías ENZO) siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, las células se evaluaron mediante citometría de flujo y se analizaron utilizando el software FlowJo.

#### **6.2 Análisis Estadístico**

Los resultados representan la media  $\pm$  desviación estándar de al menos tres determinaciones en triplicado de tres experimentos independientes. Se consideraron diferencias significativas si  $p < 0,05$  utilizando la prueba t de Student pareada. Los datos fueron analizados utilizando GraphPad Prism (San Diego, CA).

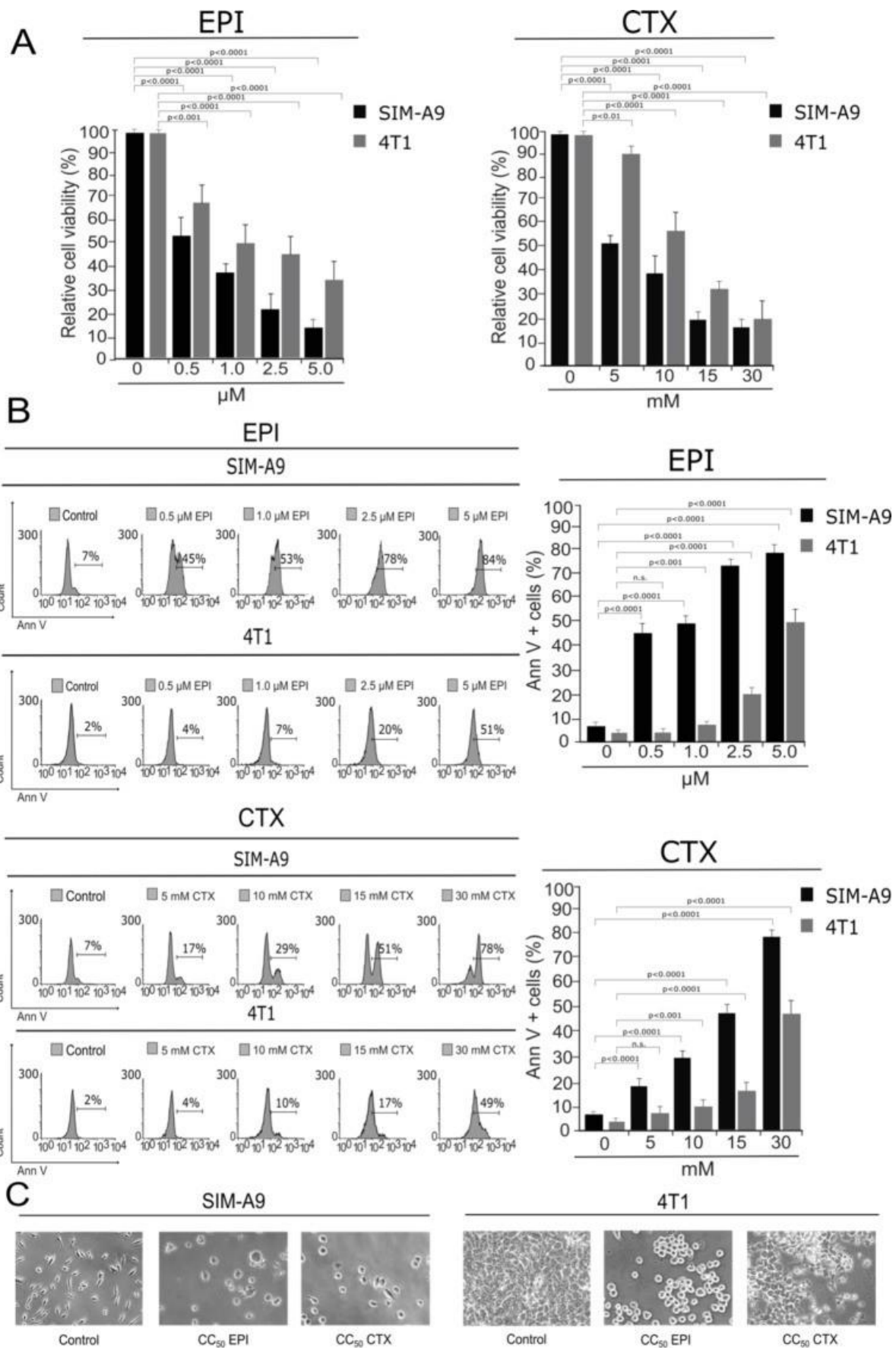


## 7. Resultados

### 7.1 Las células de microglía son cinco veces más sensibles a la quimioterapia que las células de cáncer de mama.

Se ha demostrado que la EPI y CTX disminuyen la viabilidad celular en diversas líneas de células tumorales (Trebunova et al. 2012; Xiong et al. 2016). Sin embargo, no se ha evaluado su efecto sobre la viabilidad celular y la muerte en células de microglía, por lo que lo primero que se hizo fue determinar el efecto de CTX y EPI en células de microglía SIM-A9 usando 4T1, células de cáncer de mama murinas, como control. Nuestros resultados muestran que la EPI y CTX disminuyeron la viabilidad de las células SIM-A9 y 4T1 de manera dependiente de la dosis (Fig. 10 A), sin embargo, se observó que sobre células de cáncer de mama la quimioterapia parece inducir un efecto citotóxico menor comparado con las células de microglía.

Una vez demostrada la disminución de la viabilidad celular, decidimos evaluar la muerte celular mediante la exposición a la fosfatidilserina (PS) (Fig. 10 B). En las células sanas, la PS generalmente se restringe a cara interna de la membrana celular, y la exposición de la fosfatidilserina en la cara externa es un efecto que se observa comúnmente durante la muerte celular regulada (Reyes-Ruiz et al. 2015). Determinamos la externalización de PS mediante citometría de flujo, a través de un marcaje con Anexina-V-APC sobre células previamente tratadas con EPI y CTX a diferentes dosis durante 24 h. Como se muestra en la Fig. 10 B, la EPI y CTX indujeron muerte celular en SIM-A9 a dosis significativamente más bajas en comparación con las células 4T1 según la población celular anexina-V positiva. Además, como se esperaba con los resultados de la resazurina, EPI y CTX indujeron citotoxicidad de forma dosis dependiente. A su vez, EPI indujo muerte celular en el 50 % de las células ( $CC_{50}$ ) a 1,0  $\mu$ M en células de microglía y 5  $\mu$ M en células de cáncer de mama, mientras que CTX indujo el 50 % de la muerte celular ( $CC_{50}$ ) a 15 mM en SIM-A9 y 30 mM en células 4T1. Además, la evaluación morfológica mostró una reducción de la confluencia celular y alteraciones en la morfología celular que fueron visibles después de 24 horas de tratamiento con EPI y CTX (Fig. 10 C).



**Figura 10. Citotoxicidad inducida por EPI y CTX en células SIM-A9 y 4T1.** Las células SIM-A9 y 4T1 se trataron con varias concentraciones (0,5, 1,0, 2,5 y 5,0  $\mu$ M) de EPI y 5, 10, 15 y 30 mM de CTX durante 24 horas. A) La viabilidad celular se midió mediante el ensayo de resazurina representado como porcentaje del control (viabilidad celular no tratada = 100 %) que presenta medias  $\pm$  DE. B) La muerte celular se midió por citometría de flujo mediante tinción con anexina-V. Los histogramas se refieren a células positivas para anexina-V analizadas por el software FlowJo (izquierda) y los gráficos de barras representan la media ( $\pm$  DE) (derecha). C) La evaluación de la morfología se realizó con Nikon Eclipse TS100 utilizando un objetivo de 20x.

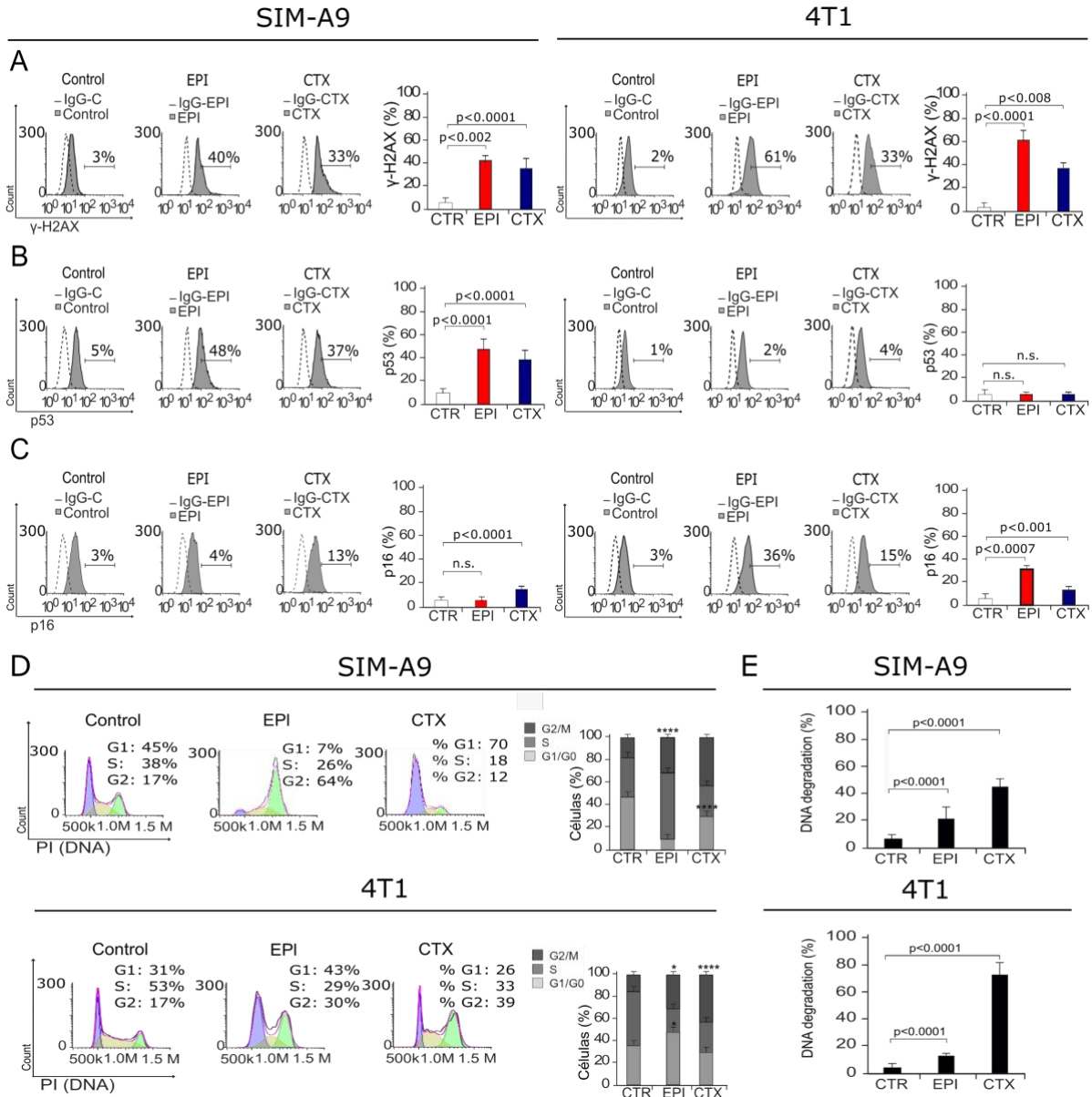
## **7.2 EPI y CTX inducen daño en el ADN y arresto del ciclo celular.**

Una vez que observamos la inducción de muerte celular en células SIM-A9 y 4T1 después del tratamiento con EPI y CTX, decidimos dilucidar el mecanismo. Primero, para evaluar si se produce daño en el ADN después del tratamiento con quimioterapia sobre las células de microglía evaluamos la fosforilación de H2AX ( $\gamma$ -H2AX). El daño del ADN puede conducir a  $\gamma$ -H2AX, el primer paso para reclutar y localizar proteínas de reparación del ADN (Mah et al. 2010), que a su vez, puede iniciar el arresto del ciclo celular, seguido de la muerte celular y la degradación del ADN. Encontramos que el tratamiento con EPI y CTX aumenta el porcentaje de células positivas para  $\gamma$ -H2AX, de 3% a 40% y 33% respectivamente en SIM-A9 (izquierda) y de 2% a 61% y 33% respectivamente en células 4T1 (derecha) (Fig. 11 A), indicando que ambos tratamientos inducen daño en el ADN. Además, evaluamos la expresión de p53 y los resultados muestran un aumento en la expresión de p53 para ambos tratamientos en SIM-A9, del 5 % al 48 % y 37 % para EPI y CTX, respectivamente (Fig. 11 B), a su vez, la evaluación de p16 mostró un aumento significativo en el tratamiento con CTX en las células SIM-A9 (del 3 % al 13 %), mientras que en el tratamiento con 4T1, EPI y CTX, respectivamente, del 3 % al 36 % y al 15 % (fig. 11 C).

Posteriormente, se llevó a cabo la evaluación del ciclo celular en microglía y células de cáncer de mama mediante tinción con PI. El análisis muestra que EPI induce el arresto del ciclo celular en G2 en SIM-A9 y G1 y G2 en células 4T1, mientras que en CTX induce la

detención del ciclo celular en G1 en SIM-A9 y G2 en células 4T1, en comparación con las células del grupo control (Fig. 11D).

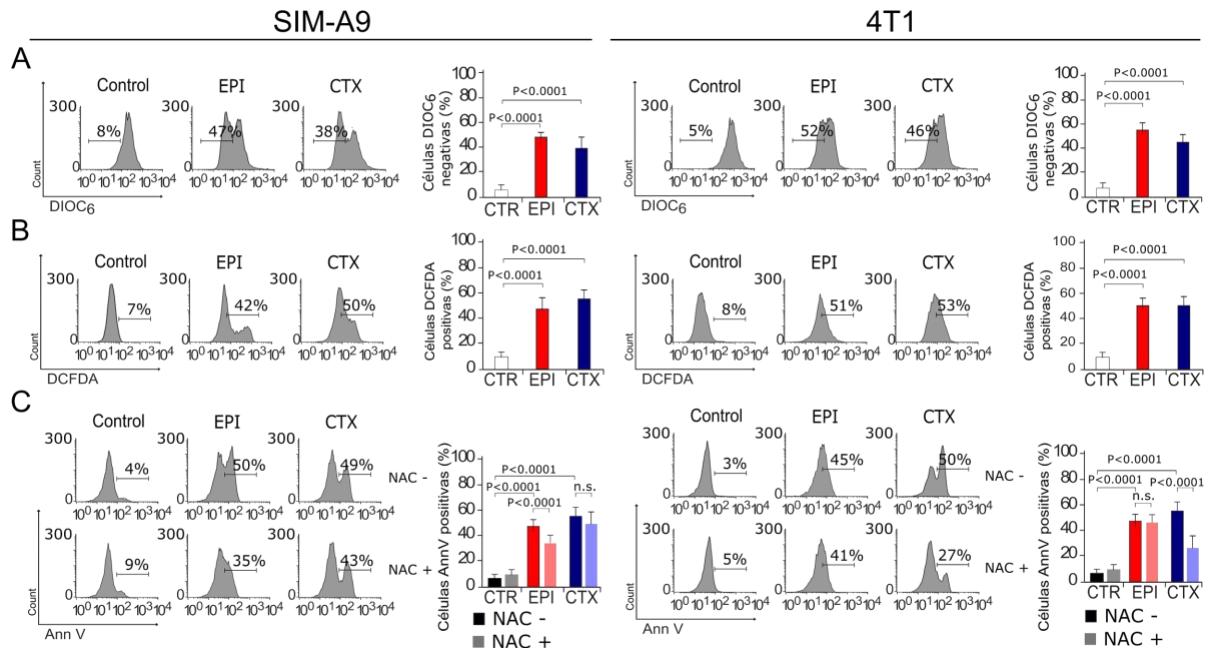
Como la degradación del ADN es una característica recurrente de la muerte celular, especialmente después del daño del ADN (Kawane et al. 2014), analizamos la degradación del ADN mediante la cuantificación de la población sub-G1 en microglía y en células de cáncer de mama tratadas con EPI y CTX. Los resultados muestran 22% y 45% de degradación de ADN en SIM-A9 correspondientes al tratamiento EPI y CTX a 24 horas, respectivamente. En las células 4T1, la relación de degradación del ADN fue del 17 % para EPI y del 65 % en CTX para un tratamiento de 24 horas (Fig. 11 E). La degradación del ADN se ha sido caracterizada como una característica de la apoptosis. Por lo anterior, decidimos investigar otras características de la apoptosis, como la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la activación de caspasas.



**Figura 11. Daño en el ADN y detención del ciclo celular.** Las células SIM-A9 y 4T1 se trataron durante 24 h con  $CC_{50}$  de EPI o CTX y se evaluaron mediante citometría de flujo. Histogramas representativos de análisis y cuantificación de daños nucleares medidos a través de A) evaluación de  $\gamma$ -H2AX, B) expresión de p53, C) expresión de p16 y D) análisis del ciclo celular. Las barras de la derecha representan la media  $\pm$  SD. E) La degradación del ADN se evaluó mediante tinción con yoduro de propidio (PI) como en D, y se analizó la población SubG1 y se presentó la media ( $\pm$  DE) en gráficos de barras.

### **7.3 EPI y CTX inducen la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la producción de ROS.**

El papel de las mitocondrias en la muerte celular es ampliamente conocido, ya que juegan un papel central en el metabolismo celular y en la señalización que lleva a la célula a muerte celular. Además, la disfunción mitocondrial conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Vakifahmetoglu-Norberg et al. 2017). Por lo anterior, Evaluamos si EPI y CTX podían inducir la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ( $\downarrow\Psi_{mit}$ ) y la producción de ROS, a través del marcaje con yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DIOC6) y diacetato de 2',7'-diclorofluorescina (DCFDA), respectivamente. Posteriormente, seguido de un por de citometría de flujo. Como se muestra en la Fig. 12 A, EPI y CTX inducen la pérdida de  $\downarrow\Psi_{mit}$  y la producción de ROS (Fig. 12 B) en ambas líneas celulares. También encontramos una correlación entre la producción de ROS y la exposición a PS, puesto que aproximadamente el 50 % de las células presentan estas dos características (Fig. 12 C). Posteriormente, usamos el antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC), que aumenta los niveles de glutatión intracelular (GSH) y posee actividad de intercambio tiol-disulfuro (Xie et al. 2018), para determinar si las ROS desempeñan un papel en la muerte celular inducida por los agentes quimioterapéuticos, pretratando las células con NAC. Como se muestra en la Fig. 12 C, NAC fue capaz de inhibir la muerte celular inducida por EPI en células SIM-A9, como se observó mediante la reducción de la tinción de Anexina V<sup>+</sup>. Estos resultados muestran que EPI y CTX inducen la pérdida de  $\downarrow\Psi_m$  y la producción de ROS y que en particular el pretratamiento con NAC en células tratadas con EPI disminuye significativamente la muerte celular en SIM-A9. Por otro lado, observamos producción de ROS en células 4T1 tratadas con CC50 de EPI y CTX. Usando NAC, determinamos la dependencia de ROS para la muerte celular en células 4T1 después del tratamiento con CTX, pero no después del tratamiento con EPI.

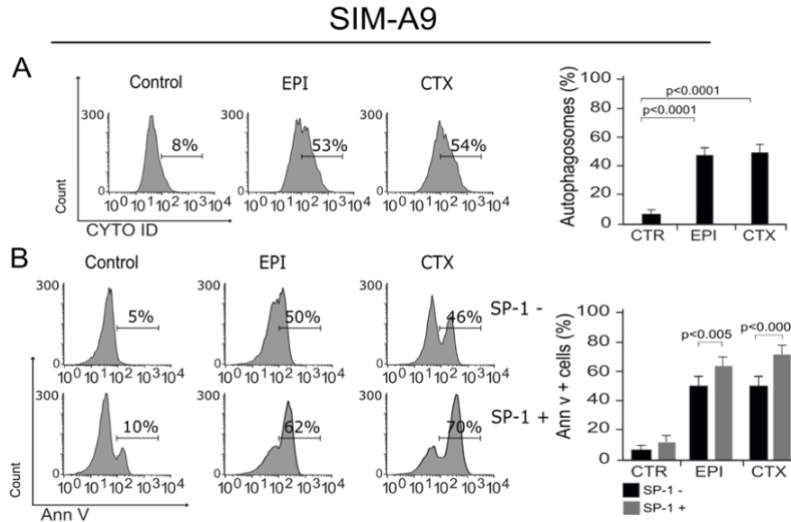


**Figura 12. Alteraciones mitocondriales y producción de ROS.** Las células SIM-A9 y 4T1 se dejaron sin tratamiento (control) o se trataron con CC50 de EPI y CTX durante 24 h y se evaluaron mediante citometría de flujo. A) Histograma representativo del potencial de membrana mitocondrial medido mediante tinción con DIOC6 (izquierda), las barras representan la media +/- SD (derecha). B) Histograma representativo de la producción de ROS medida con DCFDA (izquierda), las barras representan la media +/- SD (derecha). C) Histograma representativo de la tinción de Anexina V, en células pretratadas o no con el antioxidante NAC y luego tratadas con EPI o CTX (izquierda), las barras representan la media +/- SD (derecha).

#### 7.4 EPI y CTX inducen autofagia.

Se ha demostrado que la producción de ROS y  $\downarrow\Psi_{mit}$  podría conducir a la autofagia, un mecanismo protector que ayuda a las células a sobrevivir y que se ha descrito previamente como un mecanismo regulador de la homeostasis en las células de la microglía (Plaza-Zabala et al. 2017). En este sentido, decidimos evaluar la formación de autofagosomas en células de microglía después del tratamiento con EPI y CTX. Como se muestra en la Figura 13 A, ambas quimioterapias inducen autofagia a la CC50. Además, evaluamos la muerte celular en células pretratadas con spautina-1 (SP-1), un inhibidor de la autofagia al mejorar la degradación de beclin-1 (Schott et al. 2018), para confirmar si la autofagia desempeñaba un papel protector.

Observamos que el pretratamiento con SP-1 aumentó la muerte celular inducida por el CC50 de ambas quimioterapias (Fig. 13 B).



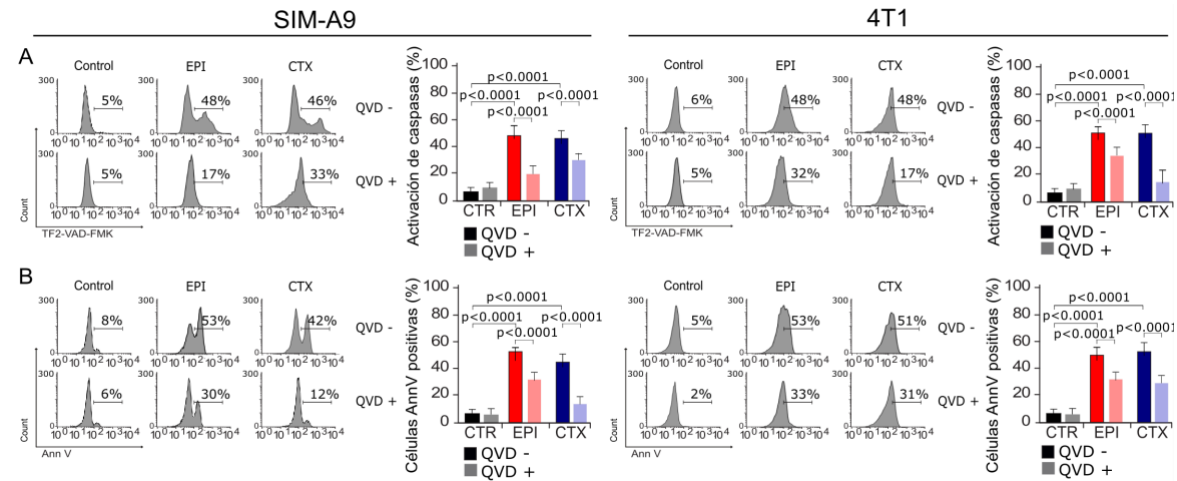
**Figura 13. Formación de autofosomas y muerte celular.** A) Histograma representativo de autofagia, medido por citometría de flujo usando tinción Cyto-ID en células SIM-A9 tratadas con EPI y CTX durante 24 horas (izquierda), las barras representan la media +/- SD (derecha). B) Histogramas representativos que muestran la participación de la autofagia en la muerte celular, evaluados mediante el pretratamiento de las células SIM-A9 con el inhibidor de la autofagia, SP-1, y midiendo la muerte celular mediante células positivas para Ann V después de 24 horas de tratamiento con EPI o CTX (CC50) (izquierda), las barras representan la media +/- SD (derecha).

### 7.5 EPI y CTX inducen la activación de caspasas.

Para evaluar si EPI y CTX activaban los principales reguladores moleculares de la apoptosis, por ello, evaluamos la actividad de las caspasas (McIlwain et al. 2015) después del tratamiento. Como se muestra en la Figura 14, EPI y CTX inducen la activación de caspasas, según lo determinado por la detección de TF2-VAD-FMK (Fig. 14 A). Para determinar si este tipo de muerte celular dependía de la actividad de las caspasas, utilizamos el inhibidor de activación de caspasas QVD-Oph (C.L. y T.L. 2015). Como muestra la Figura 14 A, el QVD pudo inhibir la activación de caspasas en células SIM-A9 y 4T1. Además, encontramos



que la muerte celular inducida por quimioterapias disminuye en presencia de QVD (Fig. 14 B). Este resultado muestra que EPI y CTX inducen la muerte celular dependiente de caspasas en ambas líneas celulares.



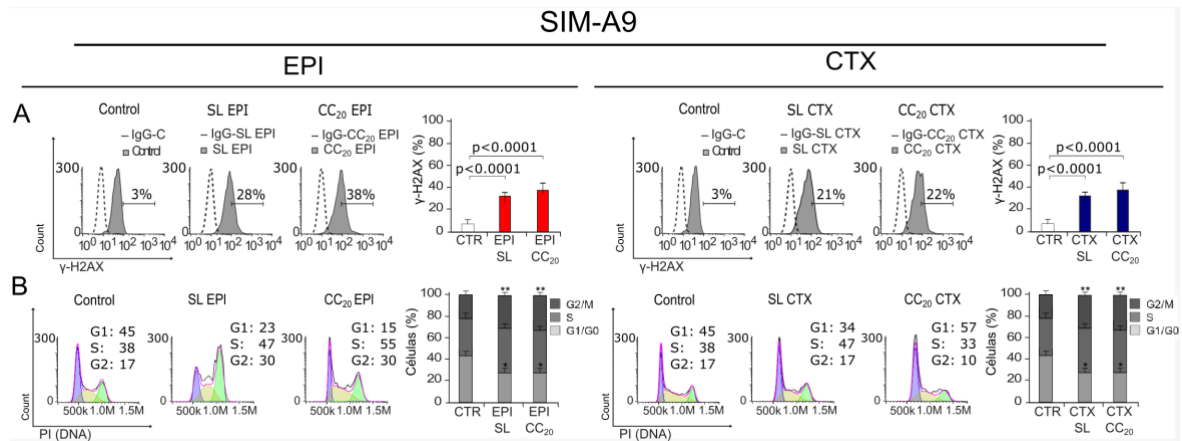
**Figura 14. Activación y papel de las caspasas en la muerte celular.** A) Histogramas representativos de activación de caspasa medidos por citometría de flujo usando TF2-VAD-FMK en células SIM-A9 y 4T1 tratadas con EPI y CTX durante 24 horas (izquierda). Las barras de la derecha representan la media +/- SD. B) Las células se pretrataron con el inhibidor de pan-caspasa QVD-Oph y luego se trataron con EPI o CTX (CC<sub>50</sub>) durante 24 horas y se evaluaron las células SIM-A9 o 4T1 positivas para Ann V. Se muestran histogramas representativos (izquierda) y gráficos de barras que presentan la media +/- SD (derecha).

## 7.6 La baja concentración de EPI induce daño en el ADN y detención del ciclo celular.

Diversos estudios muestran que EPI y CTX tienen una capacidad limitada o nula para cruzar la barrera hematoencefálica (BBB) (Guo et al. 2011), una membrana protectora selectiva que cubre los vasos sanguíneos que cruzan el sistema nervioso central (Vieira y Gamarra 2016), sin embargo, las antraciclinas y los agentes alquilantes pueden interrumpir la BBB al cabo del paso de los ciclos de quimioterapia (Ren et al. 2019). Teniendo en cuenta que la cantidad de quimioterapia necesaria para lograr CC<sub>50</sub> no corresponde a un escenario factible en condiciones *in vivo*, decidimos probar concentraciones más bajas de EPI y CTX para determinar si estas concentraciones inducen daño en el ADN y una mayor detención del

ciclo celular. Para ello utilizamos concentraciones subletales (CSL) y CC<sub>20</sub> de EPI (SL de 0,1  $\mu$ M y CC<sub>20</sub> de 0,25  $\mu$ M), y CTX (SL de 2 mM y CC<sub>20</sub> de 5 mM) en células de microglía.

Nuestros resultados muestran que la EPI puede inducir daños en el ADN (Fig. 15 A) y arresto del ciclo celular (Fig. 15 B) en CSL y CC<sub>20</sub>. Por otro lado, CTX indujo daño en el ADN a la concentración de CSL (Fig. 15 A), pero no se observó detención del ciclo celular, aunque se observó detención de G1 en CC<sub>20</sub> (Fig. 15 B).

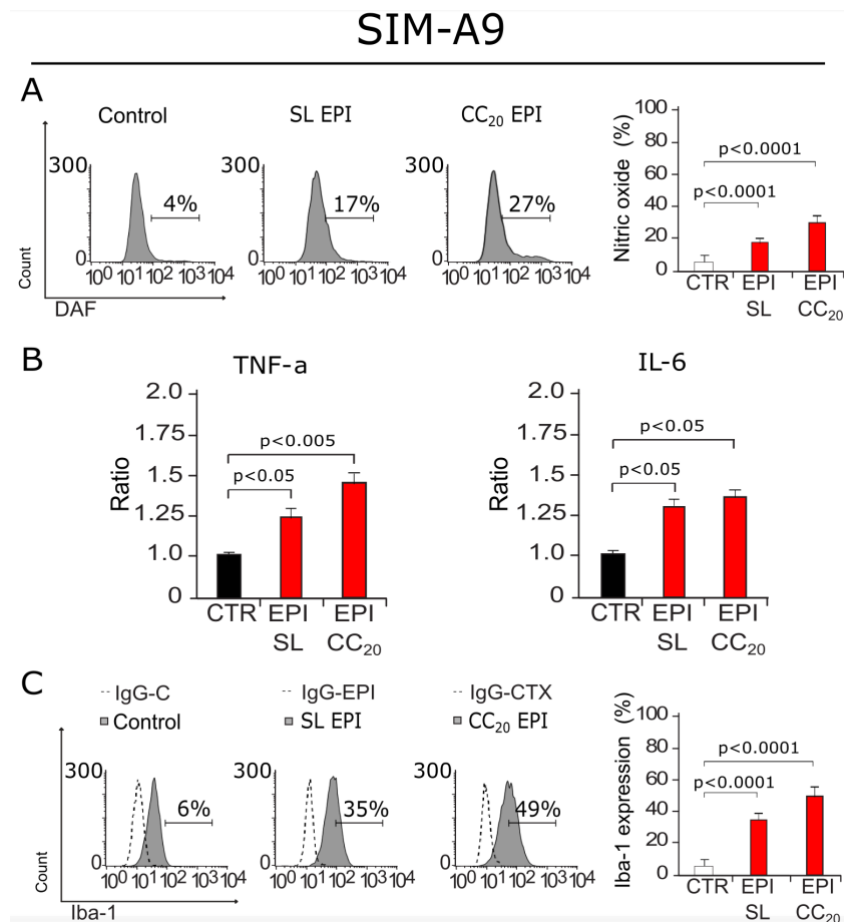


**Figura 15. Daño en el ADN y detención del ciclo celular inducido por bajas concentraciones de EPI y CTX.** A) Histogramas representativos de análisis y cuantificación de daños nucleares medidos a través de  $\gamma$ -H2AX. Las barras de la derecha representan la media +/- SD. B) Análisis del ciclo celular mediante tinción con yoduro de propidio (PI) tras tratamiento con SL o CC<sub>20</sub> de EPI o CTX en SIM-A9 durante 24 h. Se muestran histogramas representativos (izquierda) y gráficos de barras que presentan la media +/- SD (derecha).

### 7.7 EPI induce la activación de la microglía.

Dado que los resultados muestran daño en el ADN y detención del ciclo celular a partir de una concentración subletal, se decidió evaluar si la EPI también podía inducir la producción del mediador neuroinflamatorio, el óxido nítrico (NO) (Frank et al. 2019). En la Figura 16A, podemos observar un aumento en la producción de NO en las células tratadas con EPI a una concentración SL y CC<sub>20</sub>. Posteriormente, dado que las citocinas son actores

clave en la neuroinflamación, y dado que un aumento en p16 y  $\gamma$ -H2AX se ha relacionado con la producción de citocinas por parte de la microglía (Marques et al. 2020), decidimos evaluar la liberación de citocinas después del tratamiento con EPI (SL y CC20). Nuestros resultados muestran que la EPI induce un aumento significativo en la liberación de TNF- $\alpha$  e IL-6 en SL y CC20 (Fig. 16 B). Estos resultados llevaron a la idea de que las células de la microglía podrían haber sido activadas por el tratamiento con EPI. Para concluir la idea evaluamos la expresión de la molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1 (Iba-1), ya que su sobreexpresión se correlaciona con la activación de la microglía (Zhao et al. 2019) . En la Figura 16C se observa que EPI aumenta la expresión de Iba-1 en células tratadas con concentraciones SL y CC<sub>20</sub>, lo que indica que el tratamiento con EPI induce la activación de la microglía.



**Figura 16. Producción de NO, liberación de citoquinas y expresión de Iba-1 después del tratamiento con SIM-A9 con EPI.** Se muestran histogramas representativos de la producción de óxido nítrico (NO) (izquierda) medida a través de tinción DAF, gráficos de barras que presentan la media +/- SD (derecha). B) Gráficos de barras que muestran la media +/- SD de la liberación de citoquinas TNF-a e IL-6 evaluada en células SIM-A9 tratadas durante 24 horas con una concentración subletal (SL) de EPI o EPI CC20. C) Histogramas representativos de la expresión de Iba-1 (izquierda) evaluada por el anticuerpo anti-Iba-1, se muestran gráficos de barras que presentan la media +/- SD (derecha).

## 8. Discusión

El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte entre las mujeres de todo el mundo (American Cancer Society 2017). Los tratamientos incluyen principalmente cirugía, radioterapia y quimioterapia. Dos agentes quimioterapéuticos comúnmente utilizados son las antraciclinas y los agentes alquilantes, como la epirrubicina (EPI) y la ciclofosfamida (CTX) (Feng et al. 2016; Du et al. 2021). La mayoría de las quimioterapias inducen la muerte celular regulada (MCR), un mecanismo por el cual la célula activa su propia maquinaria para autodestruirse (Galluzzi et al. 2018). Ambas quimioterapias, EPI y CTX, tienen mecanismos de acción similares que incluyen daños en el ADN (Taymaz-Nikerel et al. 2018), arresto del ciclo celular (Xiong et al. 2016), alteraciones mitocondriales y estrés oxidativo (Prasad et al. 2010), en diferentes líneas celulares tumorales y algunas líneas celulares no neoplásicas (Standish et al. 2008). Aunque las quimioterapias son efectivas contra neoplasias, también inducen efectos secundarios, al atacar tejido no blanco de manera indiscriminada, induciendo náuseas, alopecia (Uchida et al. 2018), hepatotoxicidad y cardiotoxicidad (Wu et al. 2016a), disminuyendo directamente la calidad de vida del paciente. Las células del sistema inmune son frecuentemente dañadas por los tratamientos contra el cáncer (Verma et al. 2016), ya sea en todo el cuerpo o en órganos específicos, como el hígado, los pulmones y recientemente descrito, el cerebro (Matsos et al. 2017).

Se sabe que el deterioro cognitivo inducido por quimioterapia (CRCI, por sus siglas en inglés) aparece tras el tratamiento quimioterápico de tumores no relacionados con el sistema nervioso central (SNC), y estudios recientes proponen a la microglía como principal artífice del CRCI (Gibson and Monje 2019). Las células de la microglía son macrófagos residentes de tejido, que desempeñan funciones vitales en el sistema nervioso central (SNC), como el mantenimiento de la homeostasis, la liberación de factores neurotróficos y la protección contra patógenos. Debido a su naturaleza de macrófagos, las células de la microglía producen citocinas y regulan la neuroinflamación, que se ha asociado a diferentes neuropatologías, como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y el deterioro cognitivo (McLeary et al. 2019).

El objetivo general fue evaluar el efecto de las quimioterapias CTX y EPI sobre células de microglía, comparando la sensibilidad y los mecanismos de muerte celular entre ambos tipos de células. Los resultados indican que las células SIM-A9 son altamente susceptibles a EPI y CTX, aproximadamente cinco veces más para EPI y dos veces más para CTX que 4T1. Existen diversos estudios que muestran la respuesta de la microglía ante quimioterapias, pero ninguno de ellos había abordado el mecanismo de muerte celular inducida por EPI y CTX. Aquí mostramos que ambas quimioterapias inducen daño en el ADN, como lo demuestra  $\gamma$ H2AX, una variante de histona que responde a roturas de doble cadena (Kitazumi and Tsukahara 2011), que también se ha descrito como un marcador de senescencia (Noren Hooten and Evans 2017). Para evaluar la activación de los genes de reparación, se evaluó p53 y p16, ya que las células 4T1 son p53 nulas (Yerlikaya et al. 2012), por lo que la evaluación de p16 fue importante para comparar proteínas capaces de inducir el arresto del ciclo celular. Se observó aumento en la activación de p53 y en p16 en células SIM-A9, de acuerdo con la detención del ciclo celular en fase G1 y G2 por tratamiento con EPI y CTX, respectivamente. Algunas quimioterapias pueden activar y producir p53 y p16 (Marques et al. 2020) en la microglía, sin embargo, p16 y  $\gamma$ H2AX se han reportado como marcadores de senescencia, lo que indica que se deben realizar más investigaciones para determinar si EPI y CTX inducen la senescencia en las células de la microglía, que se sabe que puede conducir a la neurodegeneración (Angelova and Brown 2019). Adicionalmente, como perspectiva de este trabajo queda el análisis de p21, dado a que esta proteína reguladora del ciclo celular es un inhibidor de cinasas dependientes de ciclina (CDK), uniéndose particularmente a los complejos CDK2 o CDK1 para regular la transición de G1 a S, por lo que adquiere importancia al observar la diferencia en el arresto durante el tratamiento con CTX y EPI, dado a que CTX induce un arresto en fase G1 y EPI en G2.

Está ampliamente descrito que la mayoría de las quimioterapias pueden alterar el potencial de la membrana mitocondrial (Gorini et al. 2018), nuestros hallazgos sugieren que se produce una pérdida de  $\downarrow\psi_m$  en la microglía y podría provocar estrés oxidativo, que se ha presentado en microglía y en algunos tejidos de modelos *in vivo* tratados con doxorubicina (DOX) (Cruzado et al. 2014), metotrexato (MTX) (Gibson and Monje 2019) y algunas otras quimioterapias (Gaman et al. 2016), pero el papel de ROS en la muerte celular

en microglia no se ha descrito antes. Observamos una dependencia de ROS para la muerte celular en SIM-A9 tratados con EPI. Las antraciclinas aumentan la producción de ROS para inducir la muerte celular, pero el estrés oxidativo podría provocar una alteración directa de la homeostasis del SNC, generando neurotoxicidad y disminuyendo el rendimiento cognitivo de los pacientes (Bergamini et al. 2018; Solleiro-Villavicencio and Rivas-Arancibia 2018; Misra et al. 2020) De igual manera, se sabe que los ROS actúan como segundos mensajeros favoreciendo la activación de proteínas efectoras, como las caspasas (Vakifahmetoglu-Norberg et al. 2017).

Como último punto en la evaluación del mecanismo de la muerte celular, se llevó a cabo el análisis de activación de caspasas en ambos tratamientos sobre microglía y células de cáncer de mama. Al observar un aumento en la activación de estas, decidimos evaluar su rol en la muerte, observando que la inhibición de la activación de estas disminuye de manera significativa la muerte celular. Estos resultados llevan a la conclusión de que la muerte celular por vía apoptótica estaba ocurriendo en la microglía después de 24 horas de tratamiento con EPI  $CC_{50}$  y CTX  $CC_{50}$ . Se ha reportado a la apoptosis mediada por caspasas como mecanismo fundamental en el desarrollo de los vertebrados (Ashkenazi and Salvesen 2014), sin embargo, estudios recientes muestran que la apoptosis inducida por agentes externos puede afectar el comportamiento de células vecinas y desaparecer poblaciones específicas de células (Nguyen and Ehrlich 2020). Tomando en cuenta nuestros resultados, es importante considerar que los agentes quimioterapéuticos inducen una mayor citotoxicidad en nuestro modelo no tumoral y de esta manera, sería importante extrapolarlo a otros modelos celulares pertenecientes al SNC.

Aunque algunos autores describen que la CTX no puede cruzar BHE, no hay información para EPI, sin embargo, DOX tiene una capacidad limitada para penetrar BHE (Dingezweni 2020) (Vieira and Gamarra 2016). Aunque escasa, existe evidencia que respalda que la quimioterapia aumenta la permeabilidad de la BHE, principalmente a través del daño generado con el paso de los ciclos a las células endoteliales que la componen lo que permite la interacción directa entre las quimioterapias y las células del SNC, como la microglía (McGowan et al. 2017).

Al analizar la cantidad de quimioterapia necesaria para alcanzar el 50 % de citotoxicidad ( $CC_{50}$ ), nos preguntamos ¿qué sucedería si concentraciones más bajas de quimioterapia interactúan con la microglía? Por lo tanto, usamos concentraciones subletales (no letales) y  $CC_{20}$  de ambos agentes. Con los datos obtenidos de este ejercicio, pudimos observar que una cantidad 100 veces menor a la  $CC_{50}$  es suficiente para inducir un daño en las células de microglia. Los resultados del análisis de  $\gamma$ H2AX demuestran que ambas quimioterapias inducen daño en el ADN a concentración SL y  $CC_{20}$ . Además, como algunas quimioterapias pueden interrumpir el ciclo celular a bajas concentraciones, evaluamos si el daño en el ADN podría conducir a la detención del ciclo celular. Las células tratadas con EPI a la concentración SL,  $CC_{20}$ , y  $CC_{50}$  tenían un arresto en la fase G2, mientras que en las células tratadas con CTX el ciclo celular se detuvo en fase G1. Estos hallazgos sugieren que los efectos negativos de EPI en la microglía ocurren antes de la citotoxicidad. Se han informado hallazgos similares con DOX en células de microglia (Marques et al. 2020). En este estudio observamos que desde concentraciones no letales las quimioterapias son capaces de inducir un arresto en el ciclo celular.

Debido a que los efectos negativos de EPI en la microglía eran evidentes a partir de las concentraciones de SL, decidimos evaluar la producción de NO en la concentración más baja de EPI donde no se observó la muerte celular. Los aumentos de NO se han asociado con la neuroinflamación y el aumento del estrés oxidativo en el SNC (Frank et al. 2019). Como observamos, EPI en SL y  $CC_{20}$  puede aumentar la producción de NO. El NO es considerado un agente trófico y neurotransmisor, sin embargo, a concentraciones elevadas induce citotoxicidad y genera reactividad entre células gliales (Bergamini et al. 2018; Liu et al. 2018). También se ha descrito que los aumentos de TNF- $\alpha$  e IL-6 podrían ser perjudiciales para el SNC y hay evidencia de su inducción por algunas quimioterapias (Ren et al. 2017). Dado que las células de la microglía son capaces de liberar citocinas en función de su vía de activación, evaluamos la liberación de citocinas en respuesta a estímulos de quimioterapia. Observamos un aumento en TNF- $\alpha$  e IL-6, en SL de EPI después de 24 horas de tratamiento, esto ha sido probado en células de microglía tratadas con inductores de activación, como el LPS, sin embargo, esto sugiere que estas quimioterapias podrían tener la capacidad de activar



la microglía e inducir una desregulación citocinica en el SNC que potencialmente podrían iniciar la neurodegeneración *in vivo* (Marques et al. 2020). Sin embargo, se evaluaron otros marcadores de activación microglial como la expresión de Iba-1 (molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1), ya que su sobreexpresión se correlaciona con la activación de la microglía (Zhao et al. 2019). Se ha observado que en animales en tratamiento con diversas quimioterapias, existe un aumento de células Iba-1 positivas en cerebro, al igual que se ha observado en cerebros de niños que fueron tratados con metotrexato un aumento en la expresión de Iba-1 y en esta misma investigación al aplicar el tratamiento en un modelo *in vivo*, se observó un aumento en la expresión de Iba-1 y de otros marcadores que sugerían la presencia de células en un estado de activación hacia el fenotipo “reactivo” de la microglía (Gibson and Monje 2021). Observamos que el tratamiento con EPI indujo la sobreexpresión de Iba-1. Este resultado, junto con la producción de NO y la liberación de citocinas proinflamatorias, nos llevó a concluir que el tratamiento con EPI induce la activación de la microglía, que se ha asociado con la neurodegeneración y se sabe que es uno de los mecanismos de inicio y mantenimiento del CRCI (Csonka et al. 2015; Cerulla et al. 2019; Gibson and Monje 2019). Se ha observado apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  liberado por microglía activada en células neurales progenitoras (NPC) (Guadagno et al. 2013), así como deterioro cognitivo en ratones estimulados con LPS en modelos *in vivo* (Zhao et al. 2019). Es de amplia importancia considerar que el TNF- $\alpha$  es capaz de inducir la activación de astrocitos, otra célula del SNC perteneciente a la glía, capaz de colaborar en la defensa de este. Cuando los astrocitos sensan un daño promueven el fenotipo pro-inflamatorio mediado por la microglía y a su vez, la microglía es la célula encargada de modular a los astrocitos (Yuste et al. 2015), lo que indica que al estar activadas y/o muertas esta regulación podría no tener lugar. Finalmente, la IL-6 no solo se ha asociado con la neurodegeneración y la senescencia, sino también con la pérdida de masa corporal magra y grasa en ratones libres de tumores (Quispe-Tintaya 2017), lo que sugiere la importancia de evaluar la liberación de citocinas por parte de las células inmunitarias periféricas tratadas con quimioterapia y además, la interacción entre el sistema inmunológico periférico y central. Se sabe que cuando el sistema inmune glial induce un estado pro-inflamatorio libera quimiocinas capaces de llevar a cabo el reclutamiento de monocitos, como por ejemplo, a través de MCP-1, sin embargo, esto no está limitado a este modelo celular, ya que en algunos estudios, se ha

demostrado presencia de linfocitos T citotóxicos y células NK en cerebro (Liu et al. 2018) y que este mantiene y aumenta el efecto negativo ocasionado por una liberación descontrolada de factores pro-inflamatorios dentro del SNC. Por lo tanto, aunque se deben realizar más investigaciones para evaluar estos efectos *in vivo*, aquí demostramos que EPI y CTX inducen efectos celulares importantes en la microglía, causando daño en el ADN desde concentraciones subletales, mientras que EPI induce la activación de la microglía y un fenotipo proinflamatorio a bajas concentraciones.

La desregulación de citocinas conduce a la neuroinflamación, lo que provoca una neurogénesis reducida (Christie et al. 2012) por citotoxicidad en las células neurales progenitoras, pérdida de dendritas (Cao et al. 2016) en neuronas maduras (Bitzer-Quintero and González-Burgos 2012), liberación reducida de neurotransmisores (Leite et al. 2017) y alteraciones en la mielinización activa (Briones and Woods 2014) por interrupciones en la maduración de oligodendrocitos (Bradl and Lassmann 2010), lo que resulta en CRCI (Chiang et al. 2019). El uso de inmunomoduladores La sustitución de esteroides en patologías inflamatorias es cada vez mayor, algunos de ellos tienen capacidad antioxidante (El-Agamy et al. 2018), pero la mayoría no, ya que dependen de diferentes mecanismos para modular las citocinas proinflamatorias. El uso de extractos o moléculas naturales podría ser una alternativa no solo para modular la producción de citocinas proinflamatorias (Lee et al. 2018) sino también para proteger la microglía de la citotoxicidad de la quimioterapia cuando la BBB está comprometida. Aunque la diafonía entre el sistema inmunológico periférico y la microglía en algunas patologías neurodegenerativas está bien descrita este no es el caso para CRCI. Es imperativo describir ampliamente el mecanismo detrás de esto para comprender y proponer diferentes enfoques de estrategias terapéuticas.

## 9. Conclusiones

La presente tesis demuestra que las células de microglía son más susceptibles a CTX y EPI que las células de cáncer de mama, aproximadamente de dos a cinco veces con CTX y EPI respectivamente. Además, se demostró que la CTX induce daño en el ADN, arresto al ciclo celular y pérdida del potencial de membrana mitocondrial promoviendo la producción de ROS y la activación de caspasas, induciendo muerte celular dependiente de caspasas. La EPI induce daño en el ADN, arresto al ciclo celular, pérdida del potencial de membrana mitocondrial, que a su vez lleva a la producción de ROS y al evaluar su rol en la muerte, pudimos observar su dependencia para la inducción de muerte y a su vez la activación de caspasas y la dependencia de estas para la inducción de muerte celular. Ambas quimioterapias a concentraciones subletales y  $CC_{20}$  fueron capaces de inducir daños en el ADN y arresto al ciclo celular, desde CSL con EPI y  $CC_{20}$  con CTX. La EPI igualmente demostró ser capaz de inducir un proceso de activación sobre células de microglía, que mantiene como características principales liberación de NO, liberación de TNF- $\alpha$  e IL-6 y aumento en la expresión de Iba-1, que se describen en la literatura como características natas de un proceso inflamatorio. Este efecto puntual de la EPI denota la inducción de un estado de “reactividad” en las células de microglía.

Este trabajo abre la puerta al estudio de nuevos agentes que puedan disminuir la muerte y activación de las células de la microglía, así como a la identificación de los mecanismos que conducen a estos efectos y en profundizar el efecto protector e inmunomodulador del I-CRP en combinación con agentes quimioterapéuticos.

## REFERENCIAS

- American Cancer Society. Breast Cancer What is breast cancer ? Am Cancer Soc Cancer Facts Fig Atlanta, Ga Am Cancer Soc. 2017;1–19. <http://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>
- Angelova DM, Brown DR. Microglia and the aging brain: are senescent microglia the key to neurodegeneration? *J Neurochem*. 2019;151:676–88.
- Arnold T, Michlmayr A, Baumann S, Burghuber C, Pluschnig U, Bartsch R, et al. Plasma HMGB-1 after the initial dose of epirubicin/docetaxel in cancer. *Eur J Clin Invest*. 2013;43:286–91.
- Ashkenazi A, Salvesen G. Regulated cell death: signaling and mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:337–56.
- Bergamini G, Mechtersheimer J, Azzinnari D, Sigrist H, Buerge M, Dallmann R, et al. Chronic social stress induces peripheral and central immune activation, blunted mesolimbic dopamine function, and reduced reward-directed behaviour in mice. *Neurobiol Stress*. 2018;8:42–56.
- Bitzer-Quintero OK, González-Burgos I. Immune system in the brain: A modulatory role on dendritic spine morphophysiology? *Neural Plast*. 2012;2012.
- Blaser H, Dostert C, Mak TW, Brenner D. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. *Trends Cell Biol*. 2016;26:249–61.
- Bradl M, Lassmann H. Oligodendrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119:37–53.
- Briones TL, Woods J. Chemotherapy-induced cognitive impairment is associated with decreases in cell proliferation and histone modifications. *BMC Neurosci*. 2011;12.
- Briones TL, Woods J. Dysregulation in myelination mediated by persistent neuroinflammation: Possible mechanisms in chemotherapy-related cognitive impairment. *Brain Behav Immun*. 2014;35:23–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2013.07.175>
- Cao Z, Yang X, Zhang H, Wang H, Huang W, Xu F, et al. Aluminum chloride induces neuroinflammation, loss of neuronal dendritic spine and cognition impairment in developing rat. *Chemosphere*. 2016;151:289–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.092>
- Cerulla N, Arcusa À, Navarro JB, de la Osa N, Garolera M, Enero C, et al. Cognitive impairment following chemotherapy for breast cancer: The impact of practice effect on results. *J Clin Exp Neuropsychol*. 2019;41:290–9. <https://doi.org/10.1080/13803395.2018.1546381>
- Cevik L, Alves MJ, Otero JJ. Neuropathologists play a key role in establishing the extent of COVID-19 in human patients. *Free Neuropath*. 2020;1:11. <https://www.uni-muenster.de/Ejournals/index.php/fnp/article/view/2736>

- Chiang ACA, Huo X, Kavelaars A, Heijnen CJ. Chemotherapy accelerates age-related development of tauopathy and results in loss of synaptic integrity and cognitive impairment. *Brain Behav Immun*. 2019;79:319–25. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.04.005>
- Chittaranjan S, Bortnik S, Dragowska WH, Xu J, Abeysundara N, Leung A, et al. Autophagy inhibition augments the anticancer effects of epirubicin treatment in anthracycline-sensitive and -resistant triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2014;20:3159–73.
- Christie LA, Acharya MM, Parihar VK, Nguyen A, Martirosian V, Limoli CL. Impaired cognitive function and hippocampal neurogenesis following cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2012;18:1954–65.
- Conte PF, Gennari A, Landucci E, Orlandini C. Role of epirubicin in advanced breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2000;1 Suppl 1:S46–51. <http://dx.doi.org/10.3816/CBC.2000.s.009>
- Coronado-Cerda EE, Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Prado-García H, Rivera-Morales LG, Zapata-Benavides P, et al. In Vivo Chemoprotective Activity of Bovine Dialyzable Leukocyte Extract in Mouse Bone Marrow Cells against Damage Induced by 5-Fluorouracil. *J Immunol Res*. 2016;2016.
- Cruzado JA, López-Santiago S, Martínez-Marín V, José-Moreno G, Custodio AB, Feliu J. Longitudinal study of cognitive dysfunctions induced by adjuvant chemotherapy in colon cancer patients. *Support Care Cancer*. 2014;22:1815–23.
- Csonka C, Páli T, Bencsik P, Görbe A, Ferdinandy P, Csont T. Measurement of NO in biological samples. *Br J Pharmacol*. 2015;172:1620–32.
- Dingezweni S. The blood–brain barrier. *South African J Anaesth Analg*. 2020;26:S32–4.
- Du J, Zhang A, Li J, Liu X, Wu S, Wang B, et al. Doxorubicin-Induced Cognitive Impairment: The Mechanistic Insights. *Front Oncol*. 2021;11:1–10.
- Eid RA, Razavi GSE, Mkrtichyan M, Janik J, Khleif SN. Old-School Chemotherapy in Immunotherapeutic Combination in Cancer, A Low-cost Drug Repurposed. *Cancer Immunol Res*. 2016;4:377–82.
- El-Agamy SE, Abdel-Aziz AK, Wahdan S, Esmat A, Azab SS. Astaxanthin Ameliorates Doxorubicin-Induced Cognitive Impairment (Chemobrain) in Experimental Rat Model: Impact on Oxidative, Inflammatory, and Apoptotic Machineries. *Mol Neurobiol*. 2018;55:5727–40.
- Feng H, Dong Y, Wu J, Qiao Y, Zhu G, Jin H, et al. Epirubicin pretreatment enhances NK cell-mediated cytotoxicity against breast cancer cells in vitro. *Am J Transl Res*. 2016;8:473–84.
- Frank MG, Fonken LK, Watkins LR, Maier SF. Microglia: Neuroimmune-sensors of stress. *Semin Cell Dev Biol*. 2019;94:176–85.

- Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell*. 2015;28:690–714.
- Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018;25:486–541.
- Gaman AM, Uzoni A, Popa-Wagner A, Andrei A, Petcu EB. The role of oxidative stress in etiopathogenesis of chemotherapy induced cognitive impairment (CICI)-"Chemobrain". *Aging Dis*. 2016;7:307–17.
- Gebremeskel S, Johnston B. Concepts and mechanisms underlying chemotherapy induced immunogenic cell death: Impact on clinical studies and considerations for combined therapies. *Oncotarget*. 2015;6:41600–19.
- Gensel JC, Zhang B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Res*. 2015;1619:1–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2014.12.045>
- Georgiev T. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) and anti-rheumatic drugs. *Rheumatol Int*. 2020;40:825–6. <https://doi.org/10.1007/s00296-020-04570-z>
- Geraghty AC, Gibson EM, Ghanem RA, Greene JJ, Ocampo A, Goldstein AK, et al. Loss of Adaptive Myelination Contributes to Methotrexate Chemotherapy-Related Cognitive Impairment. *Neuron*. 2019;103:250-265.e8.
- Gibson EM, Monje M. Emerging mechanistic underpinnings and therapeutic targets for chemotherapy-related cognitive impairment. *Curr Opin Oncol*. 2019;31:531–9.
- Gibson EM, Monje M. Microglia in Cancer Therapy-Related Cognitive Impairment. *Trends Neurosci*. 2021;44:441–51.
- Gibson EM, Nagaraja S, Ocampo A, Tam LT, Wood LS, Pallegar PN, et al. Methotrexate Chemotherapy Induces Persistent Tri-glial Dysregulation that Underlies Chemotherapy-Related Cognitive Impairment. *Cell*. 2019;176:43-55.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.049>
- Gorini S, De Angelis A, Berrino L, Malara N, Rosano G, Ferraro E. Chemotherapeutic drugs and mitochondrial dysfunction: Focus on doxorubicin, trastuzumab, and sunitinib. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018.
- Guadagno J, Xu X, Karajgikar M, Brown A, Cregan SP. Microglia-derived TNF $\alpha$  induces apoptosis in neural precursor cells via transcriptional activation of the Bcl-2 family member Puma. *Cell Death Dis*. 2013;4:1–10.
- Jeelani R, Khan SN, Shaeib F, Kohan-Ghadr HR, Aldahheri SR, Najafi T, et al. Cyclophosphamide and acrolein induced oxidative stress leading to deterioration of metaphase II mouse oocyte

- quality. *Free Radic Biol Med*. 2017;110:11–8.
- Kitazumi I, Tsukahara M. Regulation of DNA fragmentation: The role of caspases and phosphorylation. *FEBS J*. 2011;278:427–41.
- Lécuyer MA, Kebir H, Prat A. Glial influences on BBB functions and molecular players in immune cell trafficking. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2016;1862:472–82.
- Lee JH, Kim W. The role of satellite glial cells, astrocytes, and microglia in oxaliplatin-induced neuropathic pain. *Biomedicines*. 2020;8.
- Lee WJ, Liao YC, Wang YF, Lin IF, Wang SJ, Fuh JL. Plasma MCP-1 and cognitive decline in patients with Alzheimer’s disease and mild cognitive impairment: A two-year follow-up study. *Sci Rep*. 2018;8:4–11. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-19807-y>
- Leite JA, Orellana AMM, Kinoshita PF, Mello NP de, Scavone C, Kawamoto EM. Neuroinflammation and Neurotransmission Mechanisms Involved in Neuropsychiatric Disorders. *Mech Neuroinflammation*. 2017;
- Liu L, Zhao L, Yang Y, Gao J, Hu C, Guo B, et al. Cytotoxic chemotherapy reduces T cell trafficking to the spleen by downregulating the expression of C-C motif chemokine ligand 21 and C-C motif chemokine ligand 19. *Oncol Lett*. 2018;16:5013–9.
- Marques L, Johnson AA, Stolzing A. Doxorubicin generates senescent microglia that exhibit altered proteomes, higher levels of cytokine secretion, and a decreased ability to internalize amyloid  $\beta$ . *Exp Cell Res*. 2020;395:112203. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112203>
- Matsos A, Loomes M, Zhou I, Macmillan E, Sabel I, Rotziokos E, et al. Chemotherapy-induced cognitive impairments: White matter pathologies. *Cancer Treat Rev*. 2017;61:6–14. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.09.010>
- McGowan J V., Chung R, Maulik A, Piotrowska I, Walker JM, Yellon DM. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2017;31:63–75.
- McLeary F, Davis A, Rudrawar S, Perkins A, Anoopkumar-Dukie S. Mechanisms underlying select chemotherapeutic-agent-induced neuroinflammation and subsequent neurodegeneration. *Eur J Pharmacol*. 2019;842:49–56. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.09.034>
- Merad M, Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2020;2. <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-0331-4>
- Misra UK, Singh SK, Kalita J, Kumar A. Astrocyte activation following nitrous oxide exposure is related to oxidative stress and glutamate excitotoxicity. *Brain Res*. 2020;1730:146645. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146645>
- Moisés A. Franco-Molina. Anti-inflammatory and antioxidant effects of IMMUNEPOTENT CRP

- in Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human macrophages. *African J Microbiol Res.* 2011;5.
- Monje M, Dietrich J. Cognitive side effects of cancer therapy demonstrate a functional role for adult neurogenesis. *Behav Brain Res.* 2012;227:376–9.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.05.012>
- Nair MG, Desai K, Prabhu JS, Hari PS, Remacle J, Sridhar TS.  $\beta$ 3 integrin promotes chemoresistance to epirubicin in MDA-MB-231 through repression of the pro-apoptotic protein, BAD. *Exp Cell Res.* 2016;346:137–45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.05.015>
- Neher JJ, Cunningham C. Priming Microglia for Innate Immune Memory in the Brain. *Trends Immunol.* 2019;40:358–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2019.02.001>
- Nguyen LD, Ehrlich BE. Cellular mechanisms and treatments for chemobrain: insight from aging and neurodegenerative diseases. *EMBO Mol Med.* 2020;12:1–17.
- Noren Hooten N, Evans MK. Techniques to induce and quantify cellular senescence. *J Vis Exp.* 2017;2017:1–14.
- Pang S, Li J, Zhang Y, Chen J. Meta-Analysis of the relationship between the APOE gene and the onset of Parkinson’s disease dementia. *Parkinsons Dis.* 2018;2018.
- Peng J, Wang Z, Li Y, Lv D, Zhao X, Gao J, et al. Identification of differential gene expression related to epirubicin-induced cardiomyopathy in breast cancer patients. *Hum Exp Toxicol.* 2020;39:393–401.
- Plaza-Zabala A, Sierra-Torre V, Sierra A. Autophagy and microglia: Novel partners in neurodegeneration and aging. *Int J Mol Sci.* 2017;18.
- Prasad SB, Rosangkima G, Nicol BM. Cyclophosphamide and ascorbic acid-mediated ultrastructural and biochemical changes in Dalton’s lymphoma cells in vivo. *Eur J Pharmacol.* 2010;645:47–54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.07.020>
- Quispe-Tintaya W. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav.* 2017;176:139–48.
- Ren X, Boriero D, Chaiswing L, Bondada S, St. Clair DK, Butterfield DA. Plausible biochemical mechanisms of chemotherapy-induced cognitive impairment (“chemobrain”), a condition that significantly impairs the quality of life of many cancer survivors. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2019;1865:1088–97.
- Ren X, St. Clair DK, Butterfield DA. Dysregulation of cytokine mediated chemotherapy induced cognitive impairment. *Pharmacol Res.* 2017;117:267–73.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2017.01.001>
- Reyes-Ruiz A, Calvillo-Rodriguez KM, Martínez-Torres AC, Rodríguez-Padilla C. The bovine dialysable leukocyte extract IMMUNEPOTENT CRP induces immunogenic cell death in



- breast cancer cells leading to long-term antitumour memory. *Br J Cancer*. 2021;124:1398–410.  
<http://dx.doi.org/10.1038/s41416-020-01256-y>
- Santana-Krímskaya SE, Franco-Molina MA, Zárate-Triviño DG, Prado-García H, Zapata-Benavides P, Torres-del-Muro F, et al. IMMUNEPOTENT CRP plus doxorubicin/cyclophosphamide chemotherapy remodel the tumor microenvironment in an air pouch triple-negative breast cancer murine model. *Biomed Pharmacother*. 2020;126:110062.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110062>
- Santos JC, Pyter LM. Neuroimmunology of behavioral comorbidities associated with cancer and cancer treatments. *Front Immunol*. 2018;9.
- Schiavoni G, Sistigu A, Valentini M, Mattei F, Sestili P, Spadaro F, et al. Cyclophosphamide synergizes with type I interferons through systemic dendritic cell reactivation and induction of immunogenic tumor apoptosis. *Cancer Res*. 2011;71:768–78.
- Sofroniew M V., Vinters H V. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119:7–35.
- Solleiro-Villavicencio H, Rivas-Arancibia S. Effect of chronic oxidative stress on neuroinflammatory response mediated by CD4+T cells in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:1–13.
- Standish LJ, Sweet ES, Novack J, Wenner CA, Bridge C, Nelson A, et al. Breast cancer and the immune system. *J Soc Integr Oncol*. 2008;6:158–68.
- Steardo L, Steardo L, Zorec R, Verkhatsky A. Neuroinfection may contribute to pathophysiology and clinical manifestations of COVID-19. *Acta Physiol*. 2020;229:10–3.
- Taymaz-Nikerel H, Karabekmez ME, Eraslan S, Kırdar B. Doxorubicin induces an extensive transcriptional and metabolic rewiring in yeast cells. *Sci Rep*. 2018;8:1–14.
- Uchida M, Nakamura T, Shima T, Yoshimoto G, Kato K, Hosohata K, et al. Comparative quantification of chemotherapy-induced nausea and emesis between the common terminology criteria for adverse events and the multinational association of supportive care in cancer antiemesis tool. *Biol Pharm Bull*. 2018;41:1667–71.
- Vakifahmetoglu-Norberg H, Ouchida AT, Norberg E. The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;482:426–31.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.088>
- Vankerckhoven A, Baert T, Riva M, De Bruyn C, Thirion G, Vandenbrande K, et al. Type of chemotherapy has substantial effects on the immune system in ovarian cancer. *Transl Oncol*. 2021;14:101076. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101076>
- Verma R, Foster RE, Horgan K, Mounsey K, Nixon H, Smalle N, et al. Lymphocyte depletion and

- repopulation after chemotherapy for primary breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2016;18:1–12.  
<http://dx.doi.org/10.1186/s13058-015-0669-x>
- Vieira DB, Gamarra LF. Getting into the brain: Liposome-based strategies for effective drug delivery across the blood–brain barrier. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:5381–414.
- Wen X, Xiao L, Zhong Z, Wang L, Li Z, Pan X, et al. Astaxanthin acts via LRP-1 to inhibit inflammation and reverse lipopolysaccharide-induced M1/M2 polarization of microglial cells. *Oncotarget.* 2017;8:69370–85.
- Wijayahadi N, Haron MR, Stanslas J, Yusuf Z. Changes in cellular immunity during chemotherapy for primary breast cancer with anthracycline regimens. *J Chemother.* 2007;19:716–23.
- Wu D, Yang XO. TH17 responses in cytokine storm of COVID-19: An emerging target of JAK2 inhibitor Fedratinib. *J Microbiol Immunol Infect.* 2020;53:368–70.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.03.005>
- Wu J, Waxman DJ. Metronomic cyclophosphamide eradicates large implanted GL261 gliomas by activating antitumor Cd8+ T-cell responses and immune memory. *Oncoimmunology.* 2015;4:1–13.
- Wu J, Xue X, Zhang B, Cao H, Kong F, Jiang W, et al. Enhanced antitumor activity and attenuated cardiotoxicity of Epirubicin combined with Paeonol against breast cancer. *Tumor Biol.* 2016a;37:12301–13. <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-016-5088-9>
- Wu TT, Li WM, Yao YM. Interactions between autophagy and inhibitory cytokines. *Int J Biol Sci.* 2016b;12:884–97.
- Xiong J, Fan F, Zhang Y, Chen W, Mao W. Epirubicin inhibits proliferation of breast cancer cells through upregulating p21cip1 expression. *Int J Clin Exp Med.* 2016;9:22764–72.
- Yerlikaya A, Okur E, Ulukaya E. The p53-independent induction of apoptosis in breast cancer cells in response to proteasome inhibitor bortezomib. *Tumor Biol.* 2012;33:1385–92.
- Yuste JE, Tarragon E, Campuzano CM, Ros-Bernal F. Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:1–13.
- Zhao J, Bi W, Xiao S, Lan X, Cheng X, Zhang J, et al. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Sci Rep.* 2019;9:1–12.  
<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-42286-8>

1.