

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFFECTO DE CITOCINAS INFLAMATORIAS SOBRE WT1 Y SUS
IMPLICACIONES EN LA IL-10 EN CÁNCER PULMONAR**

POR

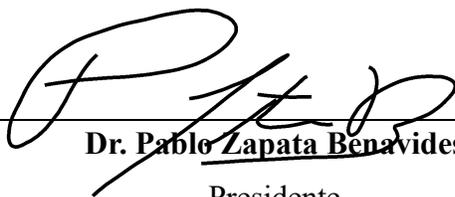
M.C. JUAN MANUEL IZAGUIRRE ALVAREZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

2025

EFFECTO DE CITOCINAS INFLAMATORIAS SOBRE WT1 Y SUS
IMPLICACIONES EN LA IL-10 EN CÁNCER PULMONAR

Comité de Tesis



Dr. Pablo Zapata Benavides
Presidente



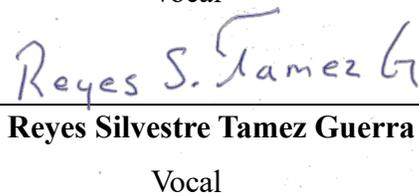
Dra. María Cristina Rodríguez Padilla
Secretario



Dra. Diana Reséndez Pérez
Vocal



Dr. Moisés Amides Franco Molina
Vocal



Dr. Reyes Silvestre Tamez Guerra
Vocal



Dra. Katiushka Arevalo Nino
Subdirectora de Posgrado



EFFECTO DE CITOCINAS INFLAMATORIAS SOBRE WT1 Y SUS
IMPLICACIONES EN LA IL-10 EN CÁNCER PULMONAR

Dirección de Tesis



Dr. Pablo Zapata Benavides

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.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES



Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por el apoyo en infraestructura, materiales y reactivos que hicieron posible la realización de esta investigación. Un agradecimiento especial a la Doctora Cristina Rodríguez Padilla y al Doctor Reyes Silvestre Tamez Guerra por su invaluable respaldo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de doctorado.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Pablo Zapata, mi mentor y amigo, por compartir su conocimiento, por su guía y paciencia, pero sobre todo por su amistad y por tratarme siempre como parte de su familia.

A mis sinodales:

Doctora Cristina Rodríguez Padilla, por abrirme las puertas de su grupo de investigación y por la calidez con la que siempre me ha recibido.

Doctor Reyes Silvestre Tamez Guerra, por ser un pilar fundamental del laboratorio y brindarme la oportunidad de desarrollar mi trabajo de investigación.

Doctor Moisés, por su motivación constante y por alentarme a seguir aprendiendo cada día.

Doctora Diana, por compartir conmigo su valioso conocimiento y experiencia.

A mi familia: mis padres, hermanos y mi tía Glo, cuya presencia en mi vida ha sido un motor fundamental para la realización de este trabajo.

A Jenny, por su amor incondicional, por acompañarme en mis momentos de alegría y en aquellos más difíciles. A ella y a su familia, la Sra. Maya, el Sr. David e Hiram, quienes me han recibido con los brazos abiertos y a quienes siempre llevo en mi corazón.

A mi gatito Francisco, quien, aunque ya no está conmigo, siempre fue una extensión de mi ser. Gracias por brindarme estabilidad cuando más la necesité, por ser mi compañero durante mis sesiones de lectura y escritura. Te llevo en mi corazón hasta que nos volvamos a encontrar, mi Cisco. También a su hermana Alexa, que me acompaña mientras escribo esta tesis y en quien encuentro la paz que necesito para seguir adelante.

A Mony, en el área de posgrado, por hacer que el trabajo diario sea más ameno, por su apoyo en los aspectos administrativos de mi doctorado, el café y, sobre todo, por su amistad.

A mis compañeros del laboratorio, con quienes he compartido innumerables momentos de aprendizaje y risas: Primito, Leo, Pao, Mara, Cecy, Óscar, Mariela, Phill, Dr. Wero, Adri,

Rubén, Juan Pablo, Luisa, Fer y todos los integrantes del LIV, quienes, de una u otra manera, han contribuido a mi formación.

A mis compañeros de generación, quienes hicieron de las clases una experiencia increíble y memorable:

Pao, por su amistad y por todas las experiencias compartidas, especialmente los días de natación que recuerdo con cariño.

Anita, por su entusiasmo y por motivarme siempre a dar lo mejor de mí en los estudios, además de su apoyo incondicional.

Pedro, por su compañía en los experimentos, en los videojuegos y en cada momento de esta etapa, por ser alguien en quien siempre puedo confiar.

A todo el equipo de Posgrado, en especial a la Doctora Katiushka, el Doctor Pablo, Mony, Paco y Mir, por recibirme siempre con calidez, por brindarme un espacio para trabajar en la unidad B y, sobre todo, por su amistad.

DEDICATORIA

A mis padres, tía Glo y Cisco...

INDICE

| SECCIÓN | PÁGINA |
|---|--------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1. Epidemiología del cáncer pulmonar..... | 3 |
| 2.2. Clasificación y etapas del cáncer de pulmón..... | 3 |
| 2.3. Inflamación y cáncer..... | 6 |
| 2.4. Biología molecular del cáncer pulmonar..... | 7 |
| 2.5. Microambiente tumoral..... | 8 |
| 2.6. El gen del Tumor de Wilm's 1 (WT1)..... | 9 |
| 2.7. WT1 y su función en cáncer..... | 11 |
| 2.8. Interleucina 10 y su modulación en cáncer..... | 12 |
| 2.9. Asociación entre WT1 e IL-10 en cáncer..... | 13 |
| 2.10. Terapias dirigidas e inmunobiología del cáncer de pulmón..... | 14 |
| 2.11. Vías de señalización involucradas en la inmunosupresión tumoral..... | 16 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 18 |
| 4. HIPÓTESIS | 19 |
| 5. OBJETIVOS | 19 |
| 6. MATERIAL Y MÉTODOS | 20 |
| 6.1. Análisis de expresión de TNF- α , IL-1 β , WT1 e IL-10 y su correlación en pacientes con cáncer pulmonar..... | 20 |
| 6.2. Producción del Plásmido de Expresión de WT1 (p-WT1)..... | 20 |
| 6.2.1. Formación de Bacterias Calcio-Competentes..... | 20 |
| 6.2.2. Transformación de Bacterias <i>E. coli</i> DH5 α con el Plásmido p-WT1..... | 21 |
| 6.2.3. Extracción a Pequeña Escala..... | 21 |
| 6.2.4. Caracterización del Plásmido p-WT1..... | 22 |
| 6.2.5. Producción a Mediana Escala del Plásmido p-WT1..... | 22 |
| 6.3. Obtención y Mantenimiento de las Líneas Celulares..... | 23 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 6.4. | Transfección en Células RAW264.7..... | 23 |
| 6.5. | Tratamientos con IL-1 β , TNF- α y LPS a las líneas celulares RAW264.7, RAW264.7 p-WT1, J774.2, B16-F10 y A549..... | 24 |
| 6.6. | Extracción de ARN..... | 25 |
| 6.7. | Determinación de concentración y pureza del ARN..... | 25 |
| 6.8. | Determinación de la integridad del ARN..... | 26 |
| 6.9. | Análisis de expresión de WT1, IL-10 y Bcl-2 mediante RT- PCR en células RAW264.7 y RAW264.7 p-WT1..... | 26 |
| 6.10. | Electroforesis en gel de agarosa..... | 27 |
| 6.11. | Estudio de la expresión de WT1 en células A549, B16-F10 y J774.2 mediante RT-PCR..... | 27 |
| 6.12. | Análisis de expresión de WT1 en células A549 y B16-F10 mediante Western blot..... | 28 |
| 6.13. | Expresión de IL-10 en células A549, B16-F10 y J774.2 mediante ELISA..... | 29 |
| 6.14. | Análisis de la localización subcelular de WT1 y la inducción de su fosforilación en respuesta a TNF- α e IL-1 β en células A549, B16-F10 y J774.2 mediante inmunofluorescencia..... | 29 |
| 6.15. | Colección de las muestras de pacientes con cáncer pulmonar..... | 30 |
| 6.16. | Expresión y asociación de WT1 e IL-10 en muestras de pacientes con cáncer pulmonar mediante inmunohistoquímica..... | 30 |
| 6.17. | Análisis estadísticos..... | 31 |
| 7. | RESULTADOS..... | 32 |
| 7.1. | Expresión diferencial de TNF- α , IL-1 β , WT1 e IL-10 y su correlación en pacientes con diferentes estadios de cáncer de pulmón..... | 32 |
| 7.2. | Análisis de supervivencia de pacientes con cáncer de pulmón en función de la expresión de WT1 e IL-10..... | 34 |
| 7.3. | Modulación de la síntesis de IL-10 por WT1 en macrófagos RAW264.7..... | 37 |
| 7.4. | Modulación de la expresión de WT1 por TNF- α e IL-1 β en células tumorales y macrófagos..... | 40 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 7.5. | Efecto de las citocinas proinflamatorias sobre la síntesis de IL-10 en células A549, B16-F10 y macrófagos J774.2..... | 43 |
| 7.6. | Localización subcelular de WT1 en células tumorales y macrófagos tras exposición a citocinas proinflamatorias..... | 45 |
| 7.7. | Inducción de fosforilación de WT1 por TNF- α e IL-1 β | 47 |
| 7.8. | Correlación clínica entre WT1 e IL-10 en pacientes con cáncer de pulmón..... | 51 |
| 8. | DISCUSIÓN..... | 53 |
| 9. | CONCLUSIONES..... | 58 |
| 10. | PERSPECTIVAS..... | 59 |
| 11. | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 60 |
| 12. | RESUMEN BIBLIOGRÁFICO..... | 68 |

INDICE DE TABLAS

| TABLA | PÁGINA |
|--|---------------|
| Tabla 1. Patrones de localización de WT1 en células A549..... | 45 |
| Tabla 2. Patrones de localización de WT1 en células B16-F10..... | 46 |
| Tabla 3. Patrones de localización de WT1 en células J774.2..... | 47 |

INDICE DE FIGURAS

| FIGURA | PÁGINA |
|--|--------|
| Figura 1. Clasificación histológica del cáncer pulmonar..... | 3 |
| Figura 2. WT1 y sus isoformas..... | 10 |
| Figura 3. Papel oncogénico de WT1..... | 12 |
| Figura 4. Esquematización del mecanismo de acción de la vacuna basada en péptidos de WT1..... | 15 |
| Figura 5. Expresión de TNF- α e IL-1 β en muestras de pacientes obtenidas de The Human Protein Atlas..... | 32 |
| Figura 6. Expresión de WT1, IL-10 y análisis de correlación de Pearson en diferentes estadios del cáncer pulmonar..... | 33 |
| Figura 7. Análisis de Kaplan-Meier de la expresión de WT1 en pacientes con cáncer de pulmón..... | 35 |
| Figura 8. Análisis de Kaplan-Meier de la expresión de IL-10 en pacientes con cáncer de pulmón..... | 36 |
| Figura 9. Análisis de Kaplan-Meier de la expresión conjunta de WT1 e IL-10 en pacientes con cáncer de pulmón..... | 37 |
| Figura 10. Crecimiento bacteriano y caracterización del plásmido codificante a WT1..... | 38 |
| Figura 11. Análisis de expresión de IL-10 en células RAW264.7 transfectadas con el plásmido de expresión WT1..... | 39 |
| Figura 12. Análisis de expresión de Bcl-2 en células RAW264.7 transfectadas con el plásmido de expresión WT1..... | 40 |
| Figura 13. Modulación de la expresión de WT1 en respuesta a citocinas proinflamatorias en células A549..... | 41 |
| Figura 14. Modulación de la expresión de WT1 en respuesta a citocinas proinflamatorias en células B16-F10..... | 42 |
| Figura 15. Modulación de la síntesis de WT1 en células J774.2..... | 43 |
| Figura 16. Expresión de IL-10 en células tumorales y de macrófagos..... | 44 |
| Figura 17. Localización de WT1 en células A549 bajo los tratamientos con TNF- α , IL-1 β y LPS..... | 45 |

| | |
|--|----|
| Figura 18. Localización de WT1 en células B16-F10 bajo los tratamientos con TNF- α , IL-1 β y LPS..... | 46 |
| Figura 19. Localización de WT1 en células J774.2 tras la exposición a los tratamientos con TNF- α , IL-1 β y LPS..... | 47 |
| Figura 20. Detección de WT1-p363 y p393 en células A549 tratadas con TNF- α , IL-1 β y LPS mediante inmunofluorescencia..... | 48 |
| Figura 21. Detección de WT1-p363 y p393 en células B16-F10 tratadas con TNF- α , IL-1 β y LPS mediante inmunofluorescencia..... | 50 |
| Figura 22. Detección de WT1-p363 y p393 en células J774.2 tratadas con TNF- α , IL-1 β y LPS mediante inmunofluorescencia..... | 51 |
| Figura 23. Expresión de WT1 e IL-10 en pacientes con cáncer pulmonar..... | 52 |

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|--|
| ° C | Grados Celsius |
| 4T1 | Células de Cáncer de Mama Triple Negativo |
| A549 | Células de Adenocarcinoma Pulmonar Humano |
| AA | Antibiótico - Antimicótico |
| aa | Aminoácidos |
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico |
| ADNc | Ácido Desoxirribonucleico Complementario |
| AKT | Proteína Quinasa B |
| ALK | Quinasa de Linfoma Anaplásico |
| ANOVA | Análisis de Varianza |
| APC | Célula Presentadora de Antígeno |
| ARN | Ácido Ribonucleico |
| ARNi | Ácido Ribonucleico de Interferencia |
| ARNm | Ácido Ribonucleico Mensajero |
| B16-F10 | Células de Melanoma Murino |
| Bcl-2 | Linfoma de Células B2 |
| BRAF | Fibrosarcoma Rápidamente Acelerado B |
| cm ² | Centímetros Cuadrados |
| CTLA-4 | Antígeno 4 de Linfocitos T Citotóxicos |
| DAPI | 4',6-diamino-2-fenilindol |
| DMEM/F12 | Medio de Eagle Modificado |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ácido Etilendiamino Tetra Acético |
| EGFR | Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico |
| EML4 | Proteína Similar Asociada a Microtúbulos de Equinodermos 4 |
| ELISA | Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas |
| FPKM | Fragmentos por Kilobases en un Millón de Lecturas |
| g | Gramos |

| | |
|--------------|--|
| GAPDH | Gliceraldehido-3-fosfato Deshidrogenasa |
| GC | Guanina – Citocina |
| h | Horas |
| HR | Humedad Relativa |
| HRP | Peroxidasa de Rábano Picante |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IL-1 β | Interleucina 1 β |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IGF1R | Receptor del Factor de Crecimiento Insulinodependiente 1 |
| J774.2 | Células de Macrófagos Murinos con Expresión de WT1 |
| JAK | Quinasa Janus |
| Kb | Kilobases |
| kDa | Kilo Daltones |
| KRAS | Kristen Sarcoma de Rata |
| KTS | Lisina, Treonina y Serina |
| L | Litros |
| LB | Luria Bertani |
| Log Rank | Prueba de Logaritmos |
| LPS | Lipopolisacárido |
| μ g | Microgramos |
| μ L | Microlitros |
| M | Molar |
| M1 | Macrófagos con Fenotipo Fagocítico |
| M2 | Macrófagos con Fenotipo Fibroso |
| MCF-7 | Células de Cáncer de Mama |
| MDSC | Células supresoras Derivadas de la Línea Mieloide |
| MET | Transición Epitelial - Mesenquimal |
| min | Minutos |
| mL | Mililitros |
| mM | Milimolar |

| | |
|----------|---|
| N1 | Neutrófilos Proinflamatorios |
| N2 | Neutrófilos Inmunosupresores |
| NaCl | Cloruro de Sodio |
| NaOH | Hidróxido de Sodio |
| NF-kB | Factor Nuclear Kappa de la Cadena Ligera de Anticuerpo B Activada |
| ng | Nanogramos |
| nm | Nanómetros |
| ns | No Significativo |
| NSCLC | Cáncer Pulmonar de Células No Pequeñas |
| p363 | Fosforilación en la Posición 363 |
| p393 | Fosforilación en la Posición 393 |
| p53 | Proteína de 53 kDa Supresora de Tumor |
| PAGE | Electroforesis en Gel de Poliacrilamida |
| PBS | Buffer de Fosfatos |
| PCC | Correlación de Pearson |
| PD-1 | Proteína de Muerte 1 |
| PD-L1 | Ligando de la Proteína de Muerte 1 |
| PEI | Poli(etil)enimina |
| pH | Potencial de Hidrógeno |
| PI3K | Fosfoinosítido 3-Quinasa |
| PIK3CA | Subunidad Catalítica Alfa de la Fosfoinosítido-3 Quinasa |
| p-WT1 | Plásmido Codificante a WT1 |
| RAW264.7 | Células de Macrófagos Murinos que no Expresan WT1 |
| Rb1 | Retinoblastoma 1 |
| ROS1 | Oncogén C-ros 1 |
| rpm | Revoluciones por Minuto |
| S363 | Serina en la Posición 363 |
| S393 | Serina en la Posición 393 |
| SCLC | Cáncer Pulmonar de Células Pequeñas |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sodio |

| | |
|---------------|---|
| SFB | Suero Fetal Bovino |
| STAT3 | Transductor de Señales y Activador de Transcripción 3 |
| TAA | Antígeno Asociado a Tumor |
| TAMs | Macrófagos Asociados a Tumor |
| TBS | Solución Salina Tamponada con Tris |
| TE | Buffer Tris EDTA |
| Tm | Temperatura de Alineamiento |
| TNF- α | Factor de Necrosis Tumoral α |
| TNM | Clasificación Tamaño, Número de Nódulos y Metástasis |
| Tw | Tween |
| U | Unidad Enzimática |
| V | Volts |
| VEGF | Factor de Crecimiento Endotelial Vascular |
| WT1 | Tumor de Wilm's 1 |
| WT1 +/+ | WT1 17 aa positivo KTS positivo |
| WT1 +/- | WT1 17 aa positivo KTS negativo |
| WT1 -/+ | WT1 17 aa negativo KTS positivo |
| WT1 -/- | WT1 17 aa negativo KTS negativo |

RESUMEN

El cáncer se caracteriza por la proliferación descontrolada de células anormales y tiene un origen multifactorial. En México, el cáncer pulmonar registra aproximadamente 9,000 nuevos casos y 8,000 defunciones anuales, siendo el tabaquismo un factor de riesgo predominante. La progresión del cáncer involucra diversos antígenos tumorales que promueven procesos como la evasión de la apoptosis, resistencia inmunitaria, proliferación celular y angiogénesis. Entre estos antígenos, la proteína WT1 (Proteína del Tumor de Wilm's 1) destaca como un factor transcripcional relevante, con alta expresión en leucemias y tumores sólidos.

A pesar de su relevancia, la relación entre los cambios en la expresión de WT1, el perfil de citocinas y su influencia en la formación de un microambiente tumoral favorable no se ha descrito ampliamente. Este estudio analizó la correlación entre WT1 y citocinas inflamatorias utilizando muestras de The Human Protein Atlas. Los resultados mostraron una disminución de citocinas proinflamatorias en estadios avanzados del cáncer pulmonar, mientras que la expresión de WT1 y de la citocina antiinflamatoria IL-10 (Interleucina 10) incrementó significativamente en el estadio IV.

Además, se evaluó el efecto de las citocinas proinflamatorias TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral α) e IL-1 β (Interleucina 1 β) sobre la expresión y localización de WT1 en células inmunitarias y tumorales. Estas citocinas redujeron los niveles de expresión de WT1 en transcritos y proteína, induciendo su fosforilación en la S363 (Serina 363) y S393 (Serina 393). Esto indujo su traslocación del núcleo al citoplasma, afectando su función como factor transcripcional y disminuyendo la expresión de genes regulados por WT1, como la *IL-10*.

En biopsias de pacientes, la expresión de WT1 aumentó proporcionalmente con el estadio tumoral, correlacionando positivamente con IL-10 en los estadios II, III y IV. Estos hallazgos resaltan la interacción entre WT1 y la inflamación en el cáncer pulmonar, destacando la necesidad de explorar los mecanismos reguladores de estos genes para diseñar estrategias terapéuticas que consideren la inflamación y su relación con oncogenes como WT1.

ABSTRACT

Cancer is characterized by the uncontrolled proliferation of abnormal cells and has a multifactorial origin. In Mexico, lung cancer accounts for approximately 9,000 new cases and 8,000 deaths annually, with smoking being a predominant risk factor. Cancer progression involves various tumor antigens that promote processes such as apoptosis evasion, immune resistance, cell proliferation, and angiogenesis. Among these antigens, WT1 (Wilm's Tumor Protein 1) stands out as a relevant transcription factor with high expression in leukemias and solid tumors.

Despite its significance, the relationship between changes in WT1 expression, cytokine profiles, and its influence on the formation of a tumor-supportive microenvironment has not been widely described. This study analyzed the correlation between WT1 and inflammatory cytokines using samples from The Human Protein Atlas. The results showed a decrease in pro-inflammatory cytokines in advanced stages of lung cancer, while the expression of WT1 and the anti-inflammatory cytokine IL-10 (Interleukin 10) significantly increased in stage IV.

Additionally, the effect of pro-inflammatory cytokines TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) and IL-1 β (Interleukin 1 β) on WT1 expression and localization was evaluated in immune and tumor cells. These cytokines reduced WT1 transcript and protein expression levels, inducing its phosphorylation at S363 (Serine 363) and S393 (Serine 393). This triggered its translocation from the nucleus to the cytoplasm, impairing its function as a transcription factor and reducing the expression of WT1-regulated genes, including *IL-10*.

In patient biopsies, WT1 expression increased proportionally with tumor stage and positively correlated with IL-10 in stages II, III, and IV. These findings underscore the interaction between WT1 and inflammation in lung cancer, highlighting the need to explore the regulatory mechanisms of these genes to design therapeutic strategies that address inflammation and its relationship with oncogenes like WT1.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad compleja caracterizada por la proliferación y diseminación descontrolada de células anormales en el organismo. Sus causas son multifactoriales, incluyendo el tabaquismo, exposición a radiaciones, mutaciones genéticas heredadas, disfunción inmunológica y agentes infecciosos. Ante la presencia de células tumorales, el sistema inmunológico activa respuestas para su eliminación, incluyendo la liberación de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β . Estas citocinas además de contribuir a la eliminación de células tumorales, también pueden modular la actividad de factores transcripcionales, alterando su función y, por ende, la progresión del tumor.

Los factores transcripcionales que actúan como oncogenes desempeñan un papel esencial en la evasión del sistema inmunológico y la inducción de procesos como la angiogénesis, cruciales para la metástasis. Durante la progresión tumoral, el perfil de citocinas en el microambiente puede presentar características proinflamatorias y antiinflamatorias, dependiendo de la etapa de la enfermedad. Este desequilibrio en las citocinas además de favorecer el crecimiento del tumor, también presenta desafíos para el diseño de terapias eficaces. Entre las estrategias terapéuticas actuales destacan la quimioterapia y los agentes inmunomoduladores, dirigidos contra los Antígenos Asociados a Tumor (TAA, por sus siglas en inglés).

Entre los TAA más estudiados se encuentra la proteína WT1 (Wilm's Tumor Protein 1), un factor transcripcional con alta expresión en tumores sólidos y hematológicos. Se han desarrollado diversas terapias contra WT1, como la vacunación con péptidos sintéticos y el uso de ARN de interferencia (ARNi), con la finalidad de reducir la expresión de este oncogén. Aunque WT1 es conocido como un factor transcripcional que regula genes esenciales para la supervivencia y proliferación celular, su papel en la modulación de la respuesta inmune aún no ha sido completamente descrito.

En este estudio, se analizaron las interacciones entre WT1 y citocinas inflamatorias en el cáncer pulmonar. Se estudió la expresión y correlación de TNF- α , IL-1 β , WT1 e IL-10 en pacientes con diferentes estadios de la enfermedad. Además, se realizaron ensayos *in vitro* para investigar cómo las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β modulan la expresión,

localización y fosforilación de WT1, y cómo estos cambios están asociados con la regulación de IL-10 en células tumorales y macrófagos. Finalmente, se analizaron biopsias de pacientes con cáncer pulmonar para correlacionar la expresión de WT1 con la IL-10 en distintos estadios de progresión tumoral.

Esta investigación permite resaltar a WT1 como un modulador de la respuesta inmunológica además de su participación en la proliferación celular. Los resultados permiten destacar su contribución para generar un microambiente favorable para el crecimiento tumoral, incrementando su relevancia como blanco terapéutico en el tratamiento del cáncer pulmonar.

2. ANTECEDENTES

2.1. Epidemiología del cáncer pulmonar.

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2020) el cáncer pulmonar se ubica en el tercer lugar en cuanto a incidencia, presentando cerca de 2,360,000 casos nuevos a nivel global, respecto a la mortalidad, este tipo de cáncer se ubica como primer lugar con 1,680,000 muertes anuales. En México, la incidencia del cáncer pulmonar es de 540,000 casos nuevos, con una mortalidad de 510,000 de forma anual.

Se ha descrito que el cáncer pulmonar es de origen multifactorial, de entre los principales agentes inductores destaca el tabaquismo, los factores genéticos ligados a la herencia, agentes infecciosos, problemas inmunológicos y la exposición a radiaciones (Miranda et al. 2019). La cantidad de agentes causales y la complejidad de los pulmones dan lugar a diferentes tipos del cáncer pulmonar, divididos en dos grandes grupos: SCLC (Cáncer pulmonar de células pequeñas por sus siglas en inglés) y NSCLC (Cáncer pulmonar de células no pequeñas por sus siglas en inglés) (Figura 1).

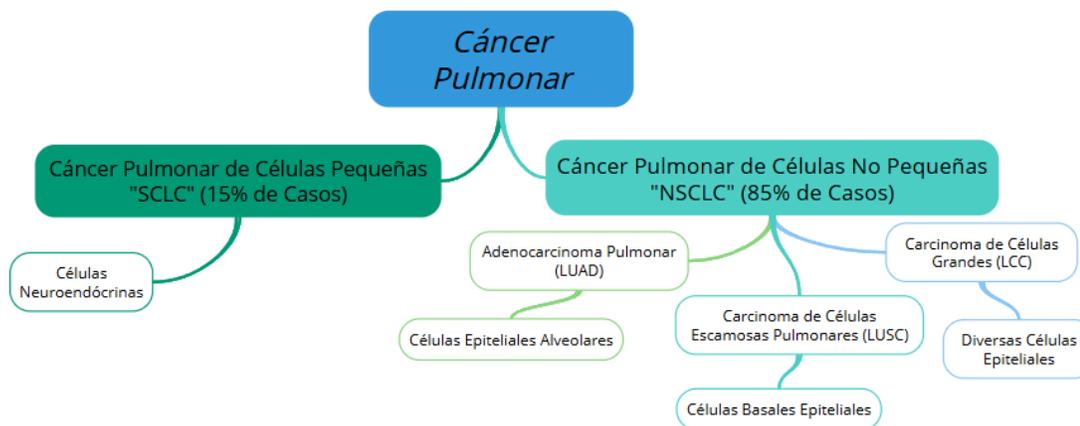


Figura 1. Clasificación histológica del cáncer pulmonar. El cáncer pulmonar se clasifica en SCLC y NSCLC, este último, a su vez, se divide en LUAD, LUSC y LCC.

2.2. Clasificación y etapas del cáncer de pulmón.

El SCLC representa un bajo porcentaje de los casos de cáncer pulmonar, siendo responsable de entre el 10-15% de las incidencias. Este tipo de cáncer se caracteriza por

su alta agresividad, presentando un rápido crecimiento y diseminación. Suele estar asociado al tabaquismo, y las células tumorales son pequeñas y de forma ovalada. El SCLC se clasifica en dos etapas: limitado, cuando el cáncer está localizado en un lado del tórax, y extenso, cuando se ha diseminado a otros órganos (Li et al. 2020).

El NSCLC es el tipo más común de cáncer pulmonar, representando aproximadamente el 85-90% de los casos. Se clasifica en subtipos como adenocarcinomas, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células grandes, entre otros. A diferencia del SCLC, la proliferación y diseminación del NSCLC es más lenta y no siempre está relacionada con el tabaquismo. Al ser menos agresivo, el pronóstico para los pacientes con NSCLC tiende a ser más favorable, aunque depende del estadio en el que se detecte el cáncer (Ganti et al. 2020).

La clasificación del cáncer pulmonar es esencial para determinar el tratamiento y emitir un pronóstico. En el SCLC, se utiliza una clasificación en dos etapas: limitado y extenso. En el estadio limitado se puede realizar un tratamiento con radioterapia, este representa aproximadamente un tercio de los casos, mientras que el estadio extenso representa la mayoría de los casos de SCLC (Raso et al. 2021).

Por otro lado, el NSCLC se clasifica en cuatro estadios utilizando el sistema TNM (Tumor, Nodos, Metástasis) (Shames y Wistuba 2014). Estos estadios también se subdividen en subtipos:

Estadio I:

IA (T1, N0, M0): El tumor es pequeño y está confinado al pulmón, sin afectación de ganglios linfáticos ni metástasis.

IB (T2, N0, M0): El tumor es un poco más grande con características adicionales, pero aún está confinado al pulmón.

Estadio II:

IIA (T1, N1, M0): El tumor es pequeño, pero se ha diseminado a ganglios linfáticos cercanos.

IIB (T2-3, N1, M0): El tumor es más grande y ha afectado estructuras cercanas, como los ganglios linfáticos.

Estadio III:

IIIA (T1-4, N2, M0): El tumor puede ser de cualquier tamaño, con afectación significativa de ganglios linfáticos dentro del tórax.

IIIB (T1-4, N3, M0): Afectación de ganglios linfáticos más distantes o estructuras importantes dentro del tórax.

IIIC (T3-4, N3, M0): Tumores más avanzados y/o afectación de múltiples ganglios linfáticos.

Estadio IV:

IVA (Cualquier T, cualquier N, M1a/b): Presencia de metástasis a distancia, que pueden incluir otros lóbulos del pulmón, líquido pleural o pericárdico maligno, o metástasis a otros órganos.

IVB (Cualquier T, cualquier N, M1c): Múltiples metástasis a distancia.

Determinar la clasificación del cáncer pulmonar es de suma importancia, ya que las opciones de tratamiento varían según el estadio. Por ejemplo, los tumores en estadios tempranos (I y II) del NSCLC podrían tratarse con cirugía, mientras que los tumores en etapas más avanzadas pueden requerir terapias combinadas como quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia. En el SCLC, los pacientes con estadio limitado suelen recibir quimioterapia y radioterapia, mientras que aquellos con estadio extenso pueden ser tratados con quimioterapia e inmunoterapia (Chen et al. 2015).

La clasificación del cáncer pulmonar está estrechamente relacionada con la tasa de supervivencia. En general, los pacientes diagnosticados en estadios tempranos (para NSCLC) o en estadio limitado (para SCLC) tienen un pronóstico más favorable en comparación con aquellos en estadios avanzados o en estadio extenso (Garinet et al. 2022). La aparición de este tipo de cáncer se asocia con mutaciones y alteraciones genéticas en oncogenes y genes supresores tumorales, lo que lleva a una pérdida en la

regulación del crecimiento celular y, como consecuencia, a la formación de una neoplasia (Chevallier et al. 2021).

2.3. Inflamación y cáncer.

La inflamación crónica desempeña un papel crucial en el desarrollo y progresión de diversos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer pulmonar (Gomes et al. 2014). Aunque la inflamación aguda es una respuesta inmunitaria natural y protectora frente a infecciones o lesiones, en estado crónico puede desencadenar cambios en el microambiente tisular que favorecen la carcinogénesis (Lee et al. 2009). Durante la inflamación crónica, las células inmunitarias liberan diversas citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento que promueven la proliferación celular, la resistencia a la apoptosis, la angiogénesis y la invasión de células tumorales (Cho et al. 2011).

En el cáncer, la inflamación puede actuar en diversas fases de la enfermedad. Inicialmente, la inflamación crónica puede generar daño tisular que, junto con una señalización constante, lleva a mutaciones genéticas y a la activación de oncogenes (Borrello et al. 2008). A medida que el tumor avanza, las citocinas inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina-6 (IL-6) y la interleucina-1 beta (IL-1 β), promueven un entorno favorable para el crecimiento tumoral, la remodelación del estroma y la angiogénesis (Naldini y Carraro 2005).

El microambiente inflamatorio en el cáncer está estrechamente vinculado a la presencia de macrófagos asociados a tumores (TAMs), que son reclutados por las células tumorales y los fibroblastos activados (Wang et al. 2011). Estos macrófagos, una vez polarizados al fenotipo M2, liberan citocinas antiinflamatorias como la interleucina-10 (IL-10), que contribuyen a la inmunosupresión, bloqueando la actividad citotóxica de las células T y favoreciendo la tolerancia del tumor. Además, las citocinas proinflamatorias inducen la activación de vías de señalización cruciales para la progresión tumoral, como las vías NF- κ B, JAK/STAT y PI3K/AKT, que favorecen la proliferación celular, la inhibición de la apoptosis y la angiogénesis (Dinakar et al. 2022).

En el contexto del cáncer pulmonar, la inflamación juega un papel crucial, sobre todo en fumadores, quienes sufren inflamación crónica debido a la exposición a carcinógenos presentes en el humo del tabaco. Esta inflamación sostenida da lugar a un daño continuo en el tejido pulmonar, lo que aumenta el riesgo de mutaciones que pueden dar lugar al cáncer (Tao, 2019).

2.4. Biología molecular del cáncer pulmonar.

Se han descrito mutaciones y alteraciones genéticas que favorecen la carcinogénesis y el desarrollo del cáncer pulmonar, de entre los principales genes involucrados en el SCLC destacan: TP53, las mutaciones en este gen son comunes y resultan en la inactivación de la proteína p53, causando una desregulación en el ciclo celular y la inhibición de la apoptosis (Viktorsson et al. 2005). Otro gen afectado es RB1, la inactivación de este gen es una característica de la mayoría de los casos de SCLC y provoca una proliferación descontrolada de la célula (Kaye, 2002). Las amplificaciones y alteraciones en genes de la familia MYC también son muy frecuentes en SCLC y se asocian a un comportamiento tumoral más agresivo (Zajac-Kaye, 2001), así como las alteraciones en la vía de NOTCH (Collins et al. 2004).

En el NSCLC se pueden observar alteraciones en otro tipo de genes, por ejemplo, el gen de EGFR (Receptor del factor de crecimiento epidérmico) que aumentan la actividad de tirosina quinasa del receptor, lo que promueve una proliferación descontrolada (Bethune et al. 2010), también suelen observarse reordenamientos en ALK (Linfoma quinasa anaplásico), como la fusión EML4-ALK, resultando en una proteína de fusión con actividad tirosina quinasa constitutiva. Las mutaciones en KRAS son comunes, reordenamientos en ROS1, mutaciones en BRAF, MET, alteraciones en PIK3CA, entre otros (Riely et al. 2009).

Además de los genes previamente mencionados, Oji (Oji et al. 2002) establece la presencia de WT1 en la mayoría de los casos para SCLC (86%) y NSCLC (96%). Esto sugiere que WT1 podría desempeñar un papel fundamental en la tumorigénesis del cáncer pulmonar.

2.5. Microambiente tumoral.

El microambiente tumoral en el cáncer pulmonar es un entorno dinámico y complejo que desempeña un papel crucial en la progresión de la enfermedad. Este microambiente está formado por una red de células inmunitarias, factores de crecimiento, citocinas y componentes de la matriz extracelular que interactúan constantemente con las células tumorales. Las interacciones entre contribuyen a la evasión de la respuesta inmune y a la resistencia a los tratamientos y facilitan el crecimiento tumoral (Mittal et al. 2016).

Uno de los principales componentes del microambiente tumoral son las citocinas, proteínas que modulan la respuesta inflamatoria y la comunicación celular. En el cáncer pulmonar, citocinas como la interleucina-10 (IL-10) tienen un papel clave al promover un entorno inmunosupresor. IL-10 es una citocina antiinflamatoria que inhibe la función de las células T y las células presentadoras de antígenos (APC), lo que permite que las células tumorales escapen al reconocimiento y ataque por parte del sistema inmunológico (Wang et al. 2011). Además, IL-10 es producida principalmente por macrófagos polarizados al fenotipo M2, que son reclutados por las células tumorales y que, en lugar de atacar al tumor, favorecen su crecimiento a través de la angiogénesis y la promoción de un ambiente de baja inflamación (Conway et al. 2016).

El reclutamiento y la polarización de otras células inmunitarias también son esenciales en este entorno. Macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, influenciados por las señales tumorales, adoptan roles pro-tumorales que apoyan la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, los macrófagos asociados a tumores (TAMs) liberan citocinas y factores de crecimiento que favorecen la invasión y metástasis del cáncer pulmonar. Asimismo, las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) inhiben la activación de las células T citotóxicas, contribuyendo a una pobre respuesta del sistema inmune en contra del tumor (Ortiz et al. 2014).

Las citocinas proinflamatorias, como la IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), también desempeñan un papel importante en el microambiente tumoral, promoviendo la proliferación celular, la angiogénesis y la migración de células tumorales. Además, las vías de señalización activadas por estas citocinas, como JAK/STAT y NF-kB, son

cruciales para mantener la inflamación crónica y el crecimiento tumoral (Liang et al. 2013).

2.6. El gen del Tumor de Wilm's 1 (WT1).

El gen WT1 está localizado en el brazo corto del cromosoma 11, en la región 13, y abarca aproximadamente 50 kb con 10 exones que producen un ARNm de 3 kb (Gessler et al. 1992). Este ARNm presenta tres sitios de inicio de traducción, generando tres isoformas de distintos pesos moleculares: 52-54 kilo Daltones (kDa), 62-64 kDa y 36-38 kDa, siendo la primera la comúnmente expresada (Ito et al. 2006).

WT1 puede generar más de 36 isoformas debido a modificaciones postranscripcionales en el ARNm, destacando dos eventos de splicing alternativo: uno en el exón 5 y otro en el exón 9. En el exón 5 ocurre una delección de 17 aminoácidos (AA), mientras que en el exón 9 la delección es de 3 AA: lisina, treonina y serina, resultando en las variantes +/- 17aa y +/- KTS (Figura 2). De esta manera, se obtienen cuatro isoformas principales de la proteína:

WT1+/+: Positiva para 17aa y KTS.

WT1+/-: Positiva para 17aa, pero sin KTS.

WT1-/+ : Sin los 17aa, pero con KTS.

WT1-/-: Negativa para 17aa y sin KTS.

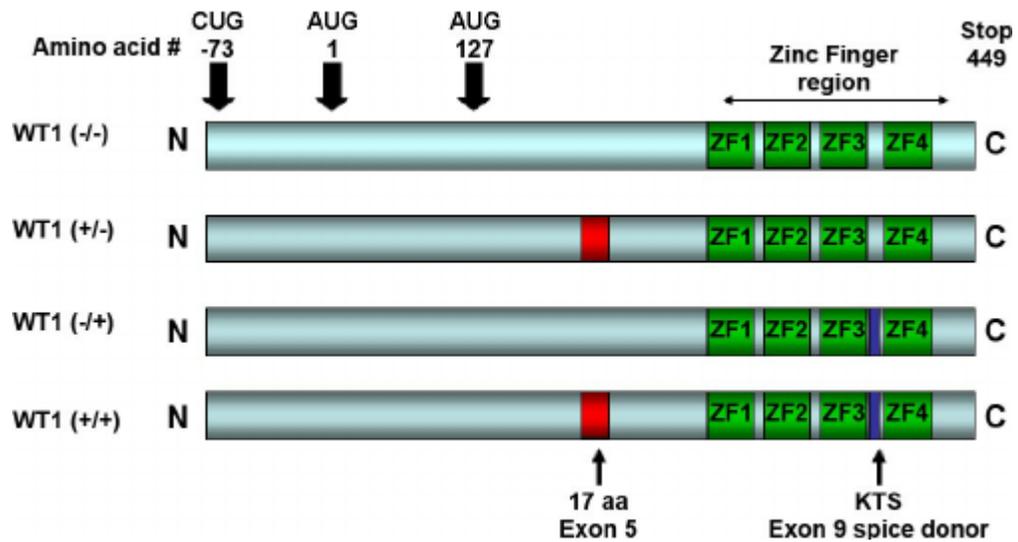


Figura 2. WT1 y sus isoformas. Se destacan dos eventos de corte y empalme alternativos, uno en el exón 5 y otro en el exón 9, por su presencia o ausencia dan lugar a las cuatro isoformas principales de WT1.

Un elemento de relevancia para la función de WT1, es la existencia o ausencia de KTS en el exón 9, ya que el dominio C-terminal de WT1 contiene un dominio de unión al ADN formado por cuatro dedos de zinc, que interactúa con secuencias ricas en GC y participa en la expresión de numerosos genes. La variante KTS influye en la interacción con el ADN, ya que la inserción o ausencia de estos aminoácidos provoca un reordenamiento tridimensional en los dedos de zinc, afectando la afinidad de WT1 por el ADN, permitiendo o impidiendo su unión (Graidis et al. 2010).

WT1 también es conocido como un factor transcripcional maestro, desempeña diversas funciones según el tejido en el que se exprese. Inicialmente fue caracterizado en individuos con tumor de Wilms o nefroblastoma, y se definió originalmente como un gen supresor tumoral debido a sus alteraciones en aproximadamente el 15% de estos tumores (Das et al. 2002). Sin embargo, actualmente se le considera un potencial oncogén, capaz de inducir la proliferación de células neoplásicas al actuar como un factor transcripcional de genes relacionados con este proceso (Dao et al. 2013).

2.7. WT1 y su función en cáncer.

WT1 juega un papel fundamental en diversos tipos de cáncer, incluidos los cánceres hematológicos y sólidos, como el cáncer de pulmón, mama, páncreas y ovario. WT1 es un factor de transcripción involucrado en la regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis celular, así como en el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas y germinales (Royer-Pokora et al. 2010).

En cáncer, WT1 puede actuar tanto como oncogén como supresor tumoral, dependiendo del tipo de tejido (Yang et al. 2007). En cánceres hematológicos, como la leucemia, se ha observado una sobreexpresión de WT1, lo que sugiere un papel oncogénico (Rosenfeld et al. 2003). De manera similar, en cánceres sólidos como el de pulmón y ovario, WT1 también está sobreexpresado, contribuyendo a la proliferación tumoral, la angiogénesis y la resistencia a la apoptosis (Mayo et al. 1999). Esta sobreexpresión se asocia frecuentemente con un mal pronóstico y una mayor agresividad tumoral.

Uno de los mecanismos clave por los cuales WT1 contribuye al cáncer es la regulación de genes involucrados en la proliferación celular, como IGF1R y VEGF (Hanson et al. 2007). Además, WT1 puede modular la respuesta inmune del tumor, interfiriendo en la activación de las células T citotóxicas y promoviendo un entorno inmunosupresor en el microambiente tumoral.

Dado su papel en la oncogénesis, WT1 ha emergido como una diana terapéutica en el tratamiento del cáncer. Se han desarrollado estrategias inmunoterapéuticas, como vacunas basadas en péptidos derivados de WT1, que buscan activar una respuesta inmune dirigida contra células tumorales que sobreexpresan este gen (Oka et al. 2008). Además, las terapias basadas en ARNi y los inhibidores de WT1 también están en estudio para reducir su expresión y frenar la progresión tumoral (Zamora-Ávila et al. 2009).

Con respecto a la respuesta inflamatoria, se ha descrito que WT1 puede inducir la síntesis de la IL-10, una citocina antiinflamatoria que podría promover un microambiente inmunosupresor y tolerogénico que facilite los procesos carcinogénicos y la evasión del tumor a la respuesta del sistema inmunológico (Sciesielski et al. 2010) (Figura 3).

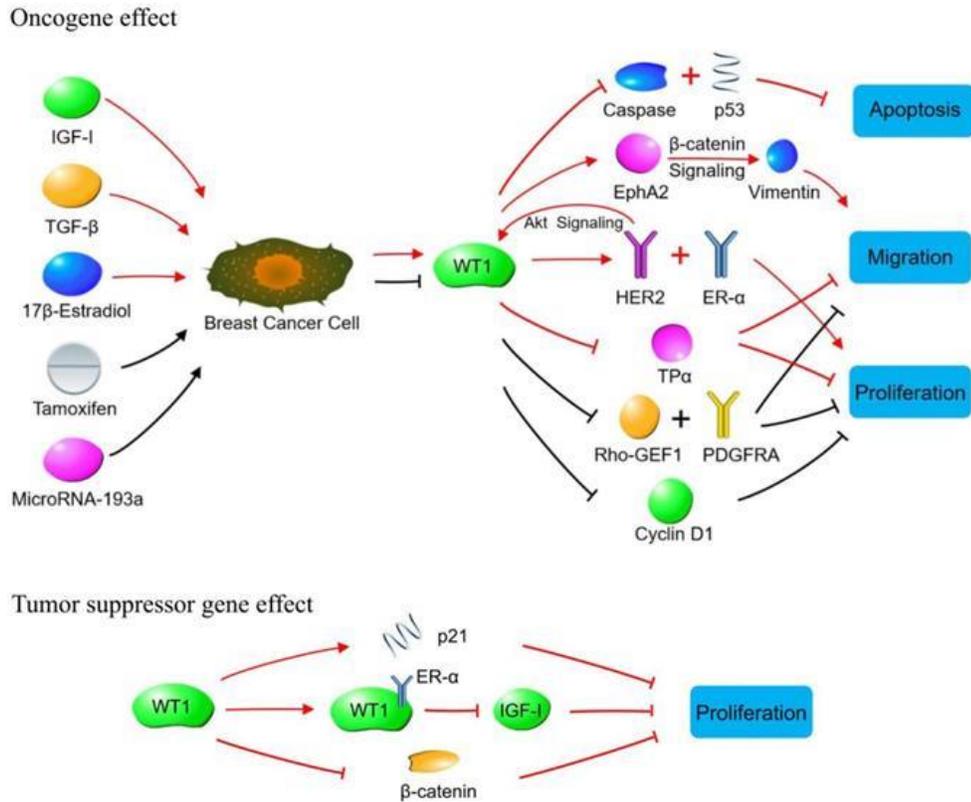


Figura 3. Papel oncogénico de WT1. WT1 participa en vías de señalización involucradas en la evasión a la muerte por apoptosis, indicción de metástasis, angiogénesis, proliferación celular, entre otras.

2.8. Interleucina 10 y su modulación en cáncer.

La interleucina 10 (IL-10) es una citocina antiinflamatoria clave en la modulación del sistema inmune, y su papel en el cáncer ha sido objeto de amplio estudio, particularmente en relación con su impacto en el pronóstico y la evolución de la enfermedad (Hatanaka et al. 2000). En el caso del cáncer pulmonar, se ha observado que, durante las etapas iniciales del desarrollo tumoral, el aumento de citocinas proinflamatorias promueve la expresión del gen WT1. Este entorno inflamatorio inicial también facilita el reclutamiento de células inmunitarias, como macrófagos y neutrófilos, que tras su polarización de M1 y N1 a los fenotipos M2 y N2, respectivamente, participan en la angiogénesis tumoral, un proceso clave para el crecimiento del tumor (Carus et al. 2013).

Un estudio realizado por Sciesielski et al. (2010) mostró que WT1 puede regular de manera positiva la expresión de IL-10, lo que desencadena un cambio en el perfil inflamatorio hacia uno de naturaleza antiinflamatoria. Este cambio permite al tumor evadir la respuesta inmune, creando un ambiente favorable para su progresión. Además, investigaciones recientes han sugerido que la IL-10 puede ser un blanco terapéutico en las primeras etapas del cáncer pulmonar. Se ha propuesto que la administración de IL-10 por inhalación podría contrarrestar el perfil inflamatorio y, de esta manera, inhibir la angiogénesis y el crecimiento tumoral (Anderson y Egilmez 2018).

Por otro lado, se ha demostrado que, en las etapas avanzadas del cáncer pulmonar, los macrófagos tipo M2 producen IL-10, promoviendo la progresión tumoral a través de la vía JAK1/STAT1/NFkB/Notch1 (Sarode et al. 2020). Este fenómeno contribuye a la creación de un microambiente tumoral antiinflamatorio, que favorece la supervivencia del cáncer. Estudios adicionales, como el de Wang et al. (2011), han confirmado la correlación entre niveles elevados de IL-10 en etapas avanzadas del cáncer, sugiriendo que su incremento inhibe la actividad de las células T y las APC, lo que dificulta el reconocimiento y la eliminación de células tumorales (Sharma et al. 2019). Este proceso refuerza la tolerancia del tumor en un ambiente inmunosupresor, promoviendo su progresión y resistencia a las terapias inmunológicas (Vahl et al. 2017).

Este balance entre inflamación y antiinflamación, regulado en parte por IL-10, resulta crítico en la dinámica de la progresión del cáncer pulmonar y en la capacidad del sistema inmunológico para combatir el tumor.

2.9. Asociación entre WT1 e IL-10 en cáncer.

El gen WT1 ha sido identificado como uno de los principales antígenos tumorales, lo que ha impulsado el desarrollo de inmunoterapias basadas en péptidos dirigidos contra su expresión en pacientes con cáncer pulmonar. Estas terapias han mostrado resultados prometedores, con evidencia de regresión parcial de la enfermedad en algunos pacientes, según lo reportado por Oka et al. (2004). La razón detrás del uso de WT1 como diana

terapéutica radica en su papel en la regulación de genes clave para la proliferación celular y la apoptosis, procesos fundamentales para el crecimiento y la supervivencia tumoral.

Además de su participación en estos mecanismos, existen estudios prospectivos que analizan la relación entre WT1 y la inmunosupresión en el microambiente tumoral (Sciesielski et al. 2010), en este trabajo se analizó dicho mecanismo a través de la regulación de la IL-10. WT1 interactúa con el promotor de IL-10 y activa su expresión, esta activación podría ser un factor clave en la creación de un entorno inmunosupresor, que permitiría al tumor evadir la respuesta inmunológica. La IL-10 es conocida por su capacidad para inhibir la respuesta inmunitaria al suprimir la actividad de las células T y las células presentadoras de antígenos, favoreciendo así la tolerancia del tumor.

2.10. Terapias dirigidas e inmunobiología del cáncer de pulmón.

El tratamiento del cáncer pulmonar ha demostrado avances significativos gracias a las terapias dirigidas y las inmunoterapias, que aprovechan la biología del sistema inmunitario para combatir el tumor (Steven et al. 2016). Estas estrategias se enfocan en modificar el microambiente tumoral, la actividad de las células inmunitarias y los mecanismos moleculares que impulsan el crecimiento y la supervivencia del cáncer. Entre estas innovaciones destacan los inhibidores de puntos de control inmunitario y las terapias basadas en péptidos dirigidos contra antígenos tumorales como el gen del tumor de Wilms 1 (WT1) (Tsuboi et al. 2004) (Figura 4).

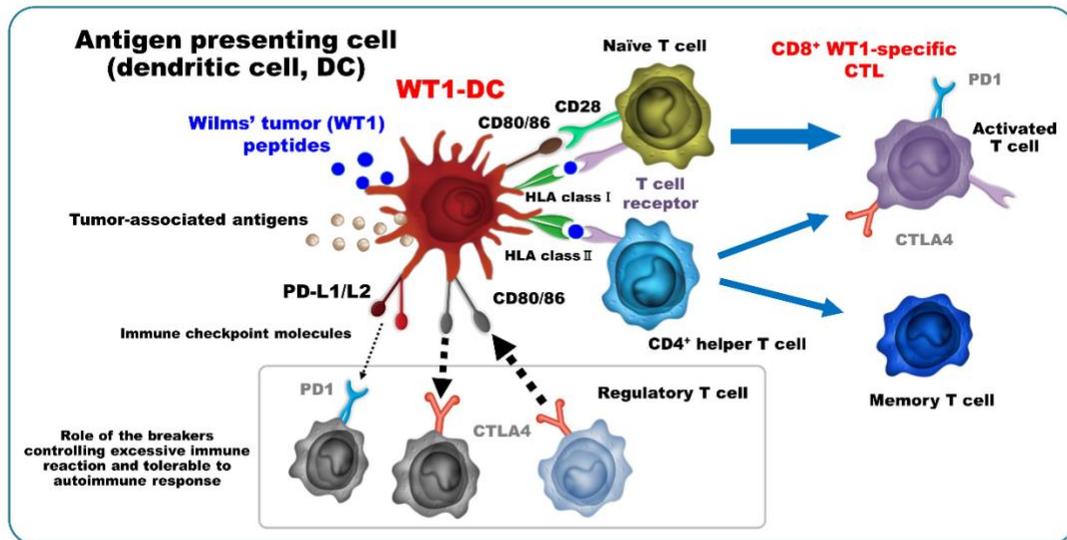


Figura 4. Esquematización del mecanismo de acción de la vacuna basada en péptidos de WT1. Los péptidos antigénicos de WT1 son expuestos a una célula presentadora de antígeno, misma que a su vez, presenta mediante el MHC I a los linfocitos CD8⁺ para inducir una respuesta citotóxica en contra de células que presenten el antígeno tumoral. La presentación también puede ocurrir mediante el MHC II a los linfocitos CD4⁺, para inducir una respuesta de tipo humoral y activar a los linfocitos B para la generación de anticuerpos en contra de dicho antígeno tumoral.

Los inhibidores de puntos de control inmunitario, como los inhibidores de PD-1/PD-L1 y CTLA-4, han transformado el tratamiento del cáncer pulmonar al reactivar la respuesta inmunitaria contra las células tumorales (Lafuente-Sanchis et al. 2017). Estas terapias bloquean las señales que permiten al tumor evadir el sistema inmunológico, restaurando así la capacidad de las células T citotóxicas para atacar las células cancerosas. El éxito de estas inmunoterapias ha sido significativo en algunos pacientes con cáncer pulmonar avanzado, lo que ha llevado a una mayor supervivencia a largo plazo en ciertos casos.

Por otro lado, las terapias basadas en péptidos dirigidas a WT1 han mostrado potencial en cáncer pulmonar, al aprovechar su capacidad para activar respuestas inmunitarias específicas. WT1, al ser un antígeno asociado a tumores, es un objetivo en el diseño de vacunas y terapias personalizadas (Krug et al. 2010). Los estudios han demostrado que los pacientes con cáncer pulmonar que reciben estas terapias pueden experimentar una regresión parcial del tumor, ya que los péptidos de WT1 inducen una respuesta de células T dirigida contra las células tumorales (Oka et al. 2008).

En este contexto, la modulación de citocinas como la IL-10 juega un papel crítico. La IL-10 puede contrarrestar la eficacia de las inmunoterapias al inhibir la activación de células T y promover un entorno tumoral antiinflamatorio. La regulación de IL-10, ya sea a través de inhibidores específicos o la manipulación del microambiente tumoral, podría mejorar la respuesta a las terapias dirigidas a WT1 y los inhibidores de puntos de control. Al reducir la inmunosupresión mediada por IL-10, se podría potenciar la actividad antitumoral del sistema inmunitario, aumentando así las probabilidades de éxito de las inmunoterapias.

2.11. Vías de señalización involucradas en la inmunosupresión tumoral.

En el cáncer pulmonar, la inmunosupresión es uno de los mecanismos clave que permite la evasión del sistema inmunitario por parte del tumor. Vías de señalización como JAK/STAT y NF-kB juegan un papel central en este proceso (Purohit et al. 2023), regulando factores como WT1 y a la citocina IL-10, que promueven un microambiente tumoral favorable para el crecimiento y la supervivencia del tumor. Estas vías además de facilitar la proliferación celular y la resistencia a la apoptosis también contribuyen a la creación de un entorno inmunosupresor que limita la capacidad del sistema inmunológico para atacar el tumor.

La vía JAK/STAT es esencial en la transducción de señales de diversas citocinas, incluidas aquellas que modulan la respuesta inflamatoria y la inmunosupresión. Cuando la IL-10 se une a su receptor, activa la vía JAK1/STAT3 (Riley et al. 1999), lo que desencadena una cascada de señalización que suprime la función de las células T y de las células presentadoras de antígenos (APC). Este proceso es crucial para el establecimiento de un microambiente antiinflamatorio, lo que a su vez permite que las células tumorales escapen al reconocimiento inmunitario. La activación sostenida de STAT3 además de promover la inmunosupresión, también regula genes que controlan la proliferación celular y la resistencia a la muerte celular programada (Gritsko et al. 2006).

Por otro lado, la vía NF-kB también desempeña un papel fundamental en la regulación del microambiente tumoral. Esta vía es activada por diversas citocinas proinflamatorias, como

el TNF- α y la IL-1 β , y está estrechamente vinculada con la inflamación crónica en el cáncer (López-Bojórquez et al. 2004). Una vez activada, NF-kB transloca al núcleo celular y regula la expresión de genes relacionados con la inflamación, la proliferación y la supervivencia celular. En el contexto del cáncer pulmonar, NF-kB además de contribuir a la progresión del tumor, puede regular la expresión de WT1, aumentando la capacidad del tumor para inhibir la respuesta inmunitaria.

La interacción entre WT1 e IL-10 a través de estas vías de señalización sugiere un mecanismo de inmunosupresión. WT1, al regular positivamente la producción de IL-10, favorece un entorno tumoral donde predominan las señales antiinflamatorias y la inhibición de las respuestas citotóxicas. Estas vías actúan de manera sinérgica, promoviendo la supervivencia del tumor al facilitar la evasión del sistema inmunológico.

El presente trabajo busca investigar si WT1 contribuye directamente a la inmunosupresión observada en el cáncer pulmonar a través de su regulación de IL-10. De ser así, se fortalecería la hipótesis de que WT1 no solo promueve la proliferación tumoral, sino que también modula el microambiente inmune para facilitar la progresión del cáncer. Este doble papel de WT1 podría tener implicaciones importantes para las terapias dirigidas, permitiendo el desarrollo de nuevas estrategias que combinen la inhibición de WT1 con la modulación de citocinas como IL-10 para mejorar la eficacia de los tratamientos asociados a la inmunoterapia en cáncer pulmonar.

3. JUSTIFICACIÓN

A pesar de los avances en inmunoterapia y tratamientos dirigidos, el cáncer pulmonar continúa siendo una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo, debido principalmente a la capacidad de los tumores para evadir el sistema inmunológico.

WT1 es un antígeno tumoral que favorece la proliferación celular, angiogénesis y metástasis, además, se ha descrito que puede regular la expresión de IL-10, una citocina antiinflamatoria que favorece un entorno inmunosupresor en el microambiente tumoral. Con base en esto, elucidar los mecanismos de interacción entre WT1 e IL-10 en las diferentes etapas del cáncer pulmonar podría generar nuevas perspectivas sobre los mecanismos de inmunosupresión que limitan la efectividad de las terapias actuales.

Este proyecto busca identificar el impacto de las citocinas inflamatorias en la regulación de WT1 y cómo esto influye en la transición de un microambiente inflamatorio pro-tumoral a uno inmunosupresor, proporcionando una base para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que inhiban estas vías, revertiendo la inmunosupresión y mejorando la respuesta a las inmunoterapias dirigidas, permitiendo así la generación de nuevas vías para el tratamiento personalizado en cáncer pulmonar, mediante el diseño estrategias que ataquen al tumor y también que modifiquen el microambiente tumoral para lograr una respuesta inmune efectiva, mejorando el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes.

4. HIPÓTESIS

Las citocinas proinflamatorias modulan la expresión y localización de WT1, regulando la producción de IL-10 en cáncer pulmonar y células del sistema inmunológico.

5. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar las implicaciones de WT1 bajo el efecto de citocinas proinflamatorias en la producción de la IL-10 en cáncer pulmonar y células del sistema inmunológico.

Objetivos específicos:

Analizar la expresión de TNF- α , IL-1 β , WT1 e IL-10 y establecer sus correlaciones en diferentes estadios del cáncer pulmonar.

Evaluar el impacto de TNF- α e IL-1 β en la expresión de WT1 y su efecto sobre la producción de IL-10 en células tumorales y células del sistema inmunológico.

Determinar la localización subcelular de WT1 y la inducción de su fosforilación en respuesta a TNF- α e IL-1 β en células tumorales y células del sistema inmunológico.

Evaluar la expresión de WT1 e IL-10 en muestras de pacientes con cáncer pulmonar y establecer su correlación.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Análisis de expresión de TNF- α , IL-1 β , WT1 e IL-10 y su correlación en pacientes con cáncer pulmonar.

Se accedió a los datos de expresión de TNF- α , IL-1 β , WT1 e IL-10 de la base de datos de The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org>). Se llevó a cabo un metaanálisis que incluyó 994 muestras, las cuales fueron categorizadas según el estadio tumoral. La distribución de muestras fue de 510 para estadio I, 277 para estadio II, 163 para estadio III y 32 para estadio IV. La cuantificación de la expresión se realizó en Fragmentos por Kilobase en un Millón de fragmentos mapeados (FPKM) para TNF- α , IL-1 β , WT1 e IL-10. Se identificó la correlación en los niveles de expresión de los genes evaluados entre los pacientes clasificados en cada grupo de estadio tumoral.

Se realizó un análisis de Kaplan-Meier para determinar la tasa de supervivencia en pacientes con cáncer pulmonar con alta y baja expresión de WT1, se utilizó una muestra de 2166 pacientes disponibles en la base de datos de Kaplan-Meier Plotter (<https://kmpplot.com>), los resultados fueron comparados con la tasa de supervivencia en pacientes con alta y baja expresión de la IL-10 y se determinó si existe una asociación entre ambos genes con la supervivencia de estos pacientes.

6.2. Producción del Plásmido de Expresión de WT1 (p-WT1).

6.2.1. Formación de Bacterias Calcio-Competentes.

Se inoculó una colonia de *E. coli* DH5 α en 5 mL de caldo Luria Bertani (LB), compuesto por un 10% de peptona de caseína, 5% de extracto de levadura y 5% de Cloruro de Sodio (NaCl), ajustado a un pH de 7.2 ± 0.2 . La muestra se incubó durante toda la noche a 37 grados centígrados ($^{\circ}\text{C}$), con agitación constante a 300 revoluciones por minuto (rpm). Al día siguiente, se tomaron 100 μL de esta solución y se transfirieron a otro tubo con 5 mL de caldo LB fresco, se incubaron nuevamente durante 4 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 300 rpm. Posteriormente, se centrifugaron 3 mL de la suspensión bacteriana, se descartó el sobrenadante, y se resuspendió la pastilla en 1.2 mL de una solución de cloruro de calcio a 50 mM/L en frío. Esta solución se mantuvo en hielo durante 20 minutos (min), después

se centrifugó a 10,000 rpm por 2 min. La pastilla resultante fue reconstituida en 50 μ L de cloruro de calcio.

6.2.2. Transformación de Bacterias *E. coli* DH5 α con el Plásmido p-WT1.

Se añadieron 5 mL de caldo LB a dos tubos de 15 mL, a uno de ellos se agregó ampicilina a una concentración de 100 ng/mL y fue utilizado como control de transformación, el tubo sin ampicilina se utilizó como control de crecimiento bacteriano. Se inoculó 1 μ L de bacterias *E. coli* DH5 α en cada tubo y se incubaron a 37 °C en un agitador a 300 rpm durante toda la noche.

La transformación se realizó añadiendo 1 μ g del p-WT1 en la pastilla de bacterias calcio competentes obtenido previamente, se incubó en hielo durante 1 hora (h) con agitación cada 5 min. Se realizó un choque térmico a 37°C durante 2 min y se añadieron 200 μ L de caldo LB sin antibiótico. Después de 30 min se transfirieron las bacterias transformadas a un tubo con 25 mL de medio con antibiótico para ser incubadas durante toda la noche a 37 °C con agitación a 300 rpm.

6.2.3. Extracción a Pequeña Escala.

Se realizó la extracción del plásmido p-WT1 a pequeña escala empleando las siguientes soluciones:

1. Solución 1: 2.5 mL de glucosa al 1M, 1 mL de EDTA al 0.5M y 0.62 mL TrisHCl al 2M a un pH de 8.0, aforada a 50 mL.
2. Solución 2: 8.8 mL de agua bidestilada, 200 μ L de NaOH 10M y 1mL de SDS al 10%.
3. Solución 3: 6 mL de acetato de potasio 5M, 2.8 mL de agua bidestilada y 1.2 mL de ácido acético glacial.

Se tomaron 3 mL de la solución con bacterias transformadas y se centrifugó durante 2 min a 10,000 rpm, la pastilla obtenida fue resuspendida en 100 μ L de la solución 1. Se añadieron 200 μ L de la solución 2 y se incubó durante 5 min, después, se añadieron 100 μ L de la solución 3 y se incubó nuevamente durante 3 min.

Se centrifugó la solución durante 5 min a 10,000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, se añadió isopropanol (0.75 volúmenes) y se incubó durante 2 min. Se centrifugó la solución a 10,000 rpm durante 15 min y se decantó el sobrenadante, se lavó la pastilla con etanol al 70% sin resuspenderla y se centrifugó nuevamente durante 15 min a 10,000 rpm. La pastilla fue resuspendida nuevamente en etanol al 70% y se centrifugó durante 15 min a 10,000 rpm. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla para finalmente resuspenderla en 15 μ L de agua libre de DNAsas.

6.2.4. *Caracterización del Plásmido p-WT1.*

Se determinó la concentración del plásmido obtenido de la extracción a pequeña escala, se llevó a cabo un ensayo de digestión enzimática para lograr caracterizar el p-WT1, utilizando 1 U de la enzima EcoRI y 1 μ g del p-WT1, se añadieron 6 μ L de Buffer Green 10X previamente diluidos en 10 μ L de agua libre de DNAsas. La muestra se sometió al ensayo de digestión durante 1 hora a 37 °C y los productos fueron visualizados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, misma que se llevó a cabo durante 1 h a 80 Volts (V).

6.2.5. *Producción a Mediana Escala del Plásmido p-WT1.*

Se utilizó el kit QIAGEN Plasmid Midi Kit. Se tomó una colonia de bacterias *E. coli* DH5 α transformadas con el plásmido p-WT1 y se inoculó en 5 mL de caldo LB con ampicilina a una concentración de 100 ng/mL, se incubó durante 8 h a 37°C con agitación a 300 rpm. De este cultivo primario se tomaron 50 μ L y se inocularon en 50 mL de caldo LB con ampicilina para ser incubados durante 16 horas a 37°C en un agitador a 300 rpm.

Se centrifugó la solución con bacterias a 6,000 gravedades durante 15 min a 4 °C, se resuspendió la pastilla en 5 mL del buffer P1 que contenía RNAsa. Se agregaron 5 mL del buffer P2, se mezcló por inversión y se incubó durante 5 min. Después, se añadieron 5 mL del buffer P3, se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 20 min para la precipitación.

Se centrifugó la solución a 10,000 gravedades durante 15 min a 4 °C y se colectó la fase acuosa en otro tubo. Se centrifugó nuevamente a 10,000 g durante 15 min a 4 °C y se colectó el sobrenadante. Se equilibró la columna QIAGEN-tip 500 con buffer QBT y se

vació por gravedad, el sobrenadante con el p-WT1 se transfirió a la columna y se dejó fluir por gravedad, se lavó la columna dos veces con 15 mL del buffer QC y se eluyó el ADN plasmídico con 15 mL del buffer QF.

La precipitación del ADN plasmídico colectado se realizó añadiendo 0.7 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcló y se centrifugó a 10,000 gravedades durante 30 min a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 5 mL de etanol al 70% a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10,000 g durante 10 min, se decantó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 min, finalmente, se resuspendió en buffer TE a pH de 8.0.

6.3. Obtención y Mantenimiento de las Líneas Celulares.

Las líneas celulares RAW264.7, J774.2, B16-F10 y A549 fueron obtenidas del banco de células del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas. Se cultivaron en una caja de 25 centímetros cuadrados (cm²) con medio de Eagle modificado con Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico antimicótico (aa). Los cultivos fueron colocados en una incubadora a 37 °C con humedad relativa (HR) del 70% y una inyección de dióxido de carbono (CO₂) del 5%, el cultivo se monitoreó diariamente hasta alcanzar la estabilidad de las líneas celulares.

6.4. Transfección en células RAW264.7.

Se sembró la línea celular RAW264.7 en una placa de 6 pozos, utilizando 200,000 células por pozo en un volumen de 2 mL de medio DMEM suplementado con 10% SFB y 1% aa, se incubó en las condiciones previamente descritas hasta que la línea celular alcanzó una confluencia del 70-80%. Se utilizó como agente transfectante el polímero policatiónico Polietilenimina (PEI) ramificado y con un peso molecular de 25 kilo Daltones (kDa). Se preparó una solución de PEI a una concentración de 4.3 mg/mL en agua miliQ estéril.

Se utilizaron las siguientes cantidades para la transfección en cada pozo: 100 μ L de NaCl al 150 mM con 0.4 μ L de PEI y 100 μ L de NaCl 150 mM con 4 μ g del p-WT1. Se llevaron al vórtex y spin ambas soluciones y la solución de PEI se añadió a la solución del p-WT1, se llevó a vórtex y spin nuevamente y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de agregarse a las células para la transfección. Tras 48 horas, las células transfectadas fueron seleccionadas utilizando el marcador neomicina a una concentración de 400 μ g/mL para la selección y después a una concentración de 200 μ g/mL durante 3 semanas para el mantenimiento, permitiendo así obtener la línea celular estable RAW264.7 p-WT1.

6.5. Tratamientos con IL-1 β , TNF- α y LPS a las líneas celulares RAW264.7, RAW264.7 p-WT1, J774.2, B16-F10 y A549.

Para los ensayos *in vitro*, se aplicaron los siguientes tratamientos a los tiempos evaluados que se describen a continuación, se utilizó la misma dosis y tiempos para cada una de las líneas celulares evaluadas:

1. TNF- α : 10ng/mL, añadiendo 30 μ L del stock de TNF- α a 2,970 μ L de medio DMEM suplementado con 10% de SFB y 1% de aa.
2. IL-1 β : 20ng/mL, añadiendo 60 μ L del stock de IL-1 β a 2,940 μ L de medio DMEM suplementado con 10% de SFB y 1% de aa.
3. LPS: 100ng/mL, añadiendo 750 μ L del stock de LPS a 2,250 μ L de medio DMEM suplementado con 10% de SFB y 1% de aa.
4. Control Negativo: Las células para el control negativo fueron colocadas con 3 mL de medio DMEM suplementado con 10% de SFB y 1% de antibiótico/antimicótico.

Se aplicó cada tratamiento por triplicado en placas de 6 pozos, durante los tiempos de 6 h, 12 h y 24 h. Las células fueron cultivadas bajo las condiciones previamente descritas para garantizar el correcto crecimiento celular, después de cada tiempo a evaluar, se colectó el sobrenadante para los posteriores análisis de expresión de citocinas, también se colectaron

las células para su extracción de proteínas y de ARN. Se realizó la colecta por disgregación celular con tripsina-EDTA y se transfirió a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL.

6.6. Extracción de ARN.

Se realizó una extracción de ARN total a las líneas celulares incubadas con los tratamientos descritos previamente, la extracción se llevó a cabo empleando el reactivo Trizol (Thermo Fisher Scientific). Se homogenizaron las células añadiendo 1mL de Trizol incubó durante 5 min a temperatura ambiente para la lisis celular. Después, se agregaron 200 μ L de cloroformo y se homogenizó vigorosamente la solución durante 15 s, se dejó en incubación a temperatura ambiente durante 3 min para realizar la extracción de ARN, posteriormente se centrifugó a 12,000 gravedades por 5 min a 4 °C. Se tomó la fase acuosa y se precipitó en un tubo de microcentrífuga con 500 μ L de isopropanol, se incubó a temperatura ambiente durante 10 min, y se centrifugó a 12,000 gravedades por 10 min a 4 °C. Después, se lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 75%, se homogenizó y se centrifugó a 7,500 gravedades por 5 min a 4°C, por último, se dejó secar de 10 a 15 min y se resuspendió en 50 μ L de agua libre de RNAsas. Las muestras se incubaron a 55 °C de 10 a 15 min para posteriormente realizar la lectura de su concentración y pureza empleando el NanoDrop.

6.7. Determinación de concentración y pureza del ARN.

Se llevaron las muestras a un análisis en NanoDrop (NanoDrop One, Thermo Fisher Scientific), después de seleccionar que se realizará una cuantificación de ácido nucleico, específicamente ARN monocatenario, se añadió 1 μ L de agua MiliQ para medir el blanco. Se realizaron las lecturas añadiendo 1 μ L de cada muestra por cuantificación, se realizó la medición a 260 nanómetros (nm) y a 280 nm, se calculó la relación buscando valores entre 1.8 y 2.0 para poder establecer que las muestras no presentan contaminantes como sales, residuos de fenoles o proteínas. Las muestras que resultaron con valores por debajo o encima del rango estimado, fueron descartadas y se repitió el experimento.

Se determinó la concentración del ARN extraído para cada muestra, misma que se expresó en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, la cuantificación permitió determinar el volumen necesario para realizar las reacciones de RT-PCR y el ensayo de electroforesis para determinar la integridad del ARN extraído. El valor de la concentración fue obtenido mediante el NanoDrop.

6.8. Determinación de la integridad del ARN.

Las muestras fueron sometidas a una electroforesis en gel de agarosa para determinar la integridad del ARN extraído, para ello se preparó un gel de agarosa al 1.2% y se cargaron 2 μg de ARN de cada muestra en su carril correspondiente. Se aplicaron 80 V para el corrimiento de las muestras a través de la agarosa durante 30 min y se visualizaron los productos del corrimiento electroforético mediante la tinción con bromuro de etidio como agente intercalante, donde se indujo su excitación mediante una fuente de luz ultravioleta. Para garantizar la integridad del ARN, en cada muestra se buscó la presencia de los ARN ribosomales 28S, 18S y en ocasiones presentaron los 5S, correspondientes a las subunidades mayor y menor de los ribosomas.

6.9. Análisis de expresión de WT1, IL-10 y Bcl-2 mediante RT-PCR en células RAW264.7 y RAW264.7 p-WT1

Se sintetizó el ADN complementario (ADNc) a partir de las muestras de ARN de las células RAW264.7 y RAW264.7 p-WT1 que presentaron calidad e integridad, para ello se utilizaron 5 μg de ARN total, 200 U de Superscript III y 0.5 μg de oligo dT bajo las condiciones de 42 °C durante 90 min y 70 °C durante 10 min.

Se determinó la expresión génica a nivel transcrito de los genes *WT1*, *IL-10* y *Bcl-2* mediante un ensayo de PCR, para ello se amplificó el ADNc obtenido utilizando la enzima Taq DNA polimerasa (Life Technologies) y los primers para *WT1* Forward: 5'-AACGCCCTTCATGTGTGC-3' y Reverse 5'-GCTGGTCTGAACGAGAAAACCTTC-3' a una temperatura de alineamiento (T_m por sus siglas en inglés) de 58.5 °C para amplificar un fragmento de 223 pb. La amplificación del gen de la *IL-10* se llevó a cabo utilizando los primers Forward: 5'-

TCTCCGAGATGCCTTCAGCAGA-3' y Reverse 5'-
TCAGACAAGGCTTGGCAACCCA-3' a una T_m de 58.3 °C, obteniendo un fragmento
de 126pb y para el gen *Bcl-2* se emplearon los primers Forward: 5'-
TCATGTGTGTGGAGAGCGTCAA-3' y Reverse 5'-
GTGTGTGTCTGTCTGTGTGTGTGA-3' a una T_m de 62.4 °C generando un producto
de 408 pb. Se utilizó como control endógeno la amplificación de la gliceraldehído-3-
fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*), usando los primers Forward: 5'-
GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' y Reverse 5'- GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'
a una T_m de 60.6 °C para generar un producto de 425 pb.

6.10. Electroforesis en gel de agarosa.

Se analizó la expresión génica de *WT1*, *IL-10* y *Bcl-2* en células RAW264.7 y RAW264.7 p-WT1 mediante una electroforesis en gel de agarosa, los productos de la amplificación se corrieron en un gel de agarosa a una concentración de 1.0% y se observaron en un fotodocumentador proporcionado por el departamento de Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia para la obtención de las imágenes. Las imágenes se analizaron mediante un análisis por densitometría con el programa Image Studio Lite Ver 5.2. Los resultados fueron graficados y analizados para las diferencias significativas con el programa de Graphpad – Prism10.

6.11. Estudio de la expresión de WT1 en células A549, B16-F10 y J774.2 mediante RT-PCR.

Se trataron las células A549, B16-F10 y J774.2 con TNF- α , IL-1 β y LPS a los tiempos de 6 h, 12 h y 24 h como se describió previamente y por triplicados. Luego de separar el sobrenadante de la placa de 6 pozos para los ensayos de ELISA, las pastillas celulares fueron obtenidas mediante el uso de tripsina para la disgregación. A continuación, las pastillas fueron destinada al análisis de la expresión de WT1 mediante RT-PCR.

Se realizó la extracción, cuantificación y determinación de pureza e integridad del ARN como se describió previamente, así mismo, se llevó a cabo la reacción de PCR para el gen de *WT1* bajo las condiciones previamente descritas. Se visualizaron los productos de la amplificación mediante un gel de agarosa al 1.0 % como se describió previamente y se sometieron a un análisis estadístico para determinar los cambios en la expresión, los resultados del análisis fueron graficados utilizando el programa Graphpad – Prism10.

6.12. Análisis de expresión de WT1 en células A549 y B16-F10 mediante Western blot.

Se determinó la expresión de la proteína WT1 en células tumorales B16-F10 y A549, las células se cultivaron a una densidad de 1×10^5 células en placas de 6 pozos, utilizando 2 mL de medio DMEM/F-12 suplementado con SFB al 10% y se incubaron durante toda la noche. Se aplicaron tratamientos con TNF- α (10 ng/mL), IL-1 β (20 ng/mL) y LPS (100 ng/mL) durante 6 h, tras lo cual se colectaron las células.

Se lisaron las células en 100 μ L de tampón de lisis (1% Triton, 150 mM NaCl, 25 mM Tris pH 7.6) y se midieron las concentraciones de proteína utilizando el kit de ensayo de proteínas DC (Bio-Rad, Hércules, CA, EE. UU.). Se separaron 50 μ g de proteína de cada muestra mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12%, mediante el corrimiento a 60 V hasta que pasaron la fase del gel concentrador y después a 80 V para su migración y separación en la fase del gel separador.

Después se realizó una transferencia a membrana de nitrocelulosa durante toda la noche a 4 °C, seguido de un bloqueo con leche descremada (Thermo Fisher) al 5% en buffer TBS-Tween durante 1 h. Se llevó a cabo la inmunodetección utilizando los anticuerpos Anti-WT1 (F-6) sc-7585 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EE. UU.). Se empleó el anticuerpo Anti-GAPDH (Sigma) para la detección y normalización con la proteína GAPDH. La inmunodetección se realizó exponiendo la membrana de nitrocelulosa con las proteínas ya bloqueada a los anticuerpos durante 1 h, después de 3 lavados de 15 minutos con TBS-Tween se aplicó el anticuerpo secundario Anti-Mouse conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y se dejó incubar durante 1 h. Nuevamente se lavó la

membrana con TBS-Tween tres veces durante 15 minutos y las proteínas fueron visualizadas utilizando el sistema de transferencia Western Lumi-Light (Roche, Pleasanton, CA, EE. UU.) y su exposición a un film en cuarto oscuro.

6.13. Expresión de IL-10 en células A549, B16-F10 y J774.2 mediante ELISA.

Se cuantificó el nivel de expresión de IL-10 en las líneas celulares tumorales (A549 y B16-F10) y de macrófagos (J774.2) mediante un kit de ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA). Se utilizaron 200 μ L del medio de cultivo de cada línea celular (A549, B16-F10 y J774.2) tratada con TNF- α (10 ng/mL), IL-1 β (20 ng/mL) y LPS (100 ng/mL) durante 6, 12 y 24 horas, siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante PeproTech (PeproTech, Ciudad de México, México).

6.14. Análisis de la localización subcelular de WT1 y la inducción de su fosforilación en respuesta a TNF- α e IL-1 β en células A549, B16-F10 y J774.2 mediante inmunofluorescencia.

Se evaluó la localización de WT1 en células A549, B16-F10 y J774.2 previamente tratadas con las citocinas proinflamatorias y el LPS (TNF- α a 10 ng/mL, IL-1 β a 20 ng/mL y LPS a 100 ng/mL durante 6 h). Las células se fijaron con metanol/acetona (50-50) a -20 $^{\circ}$ C, seguido de lavados con PBS y permeabilización con buffer permeabilizante (0.1 % de Triton con 1 % de citrato de sodio en PBS), seguido de tres lavados con PBS. Se bloquearon las células con FBS al 20 % en PBS durante 30 minutos y se incubaron durante 1 h con anticuerpo monoclonal Anti-WT1 (F-6) (sc-7585 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU.), Anti-WT1-p363 (sc-12933, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU.) y Anti-WT1-p393 (sc-12934, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU.).

Tras lavados con PBS, se aplicó el anticuerpo Anti-IgG-FITC de conejo (sc-2012, Santa Cruz Biotechnology) e IgG1 Texas Red Anti-ratón de cabra (sc-2979, Santa Cruz Biotechnology). Las células se contrastaron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los portaobjetos se montaron y examinaron mediante microscopía de barrido con focal. La

intensidad de la señal se expresó en píxeles y se analizó con el software Image-Pro-Plus, versión 7.0 (Media Cybernetics, Rockville, MD, EE. UU.). La localización de WT1, WT1-p363 y WT1-p393 se determinó mediante el coeficiente de correlación de Pearson (PCC).

6.15. Colección de las muestras de pacientes con cáncer pulmonar.

Las muestras utilizadas en este estudio retrospectivo fueron obtenidas en el 2010 de 27 pacientes con confirmación de cáncer pulmonar del Hospital Regional de Zacatecas, México. El tamaño de la muestra fue determinado por la disponibilidad de pacientes con cáncer pulmonar diagnosticado. Este estudio se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración Helsinki (Revisada en el 2013). El estudio fue aprobado por el comité de ética institucional de la UANL FCB con el número de registro No.: CEIBA-FCB-35/2022 y no se optó por la adquisición del consentimiento informado individual para este estudio retrospectivo. Se dividieron las muestras de acuerdo con el estadio tumoral: Estadio I, estadio II, estadio III y estadio IV y se determinó la expresión y asociación de WT1 con la IL-10 en las muestras de cáncer pulmonar de los pacientes.

6.16. Expresión y asociación de WT1 e IL-10 en muestras de pacientes con cáncer pulmonar mediante inmunohistoquímica.

Se determinó la expresión de WT1 e IL-10 en muestras de pacientes con cáncer pulmonar mediante los anticuerpos sc-7585 y sc-8438 respectivamente (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Las muestras fueron anonimizadas y los cortes fueron desparafinados y permeabilizados. La inmunohistoquímica se realizó utilizando el kit Universal Quick (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se analizaron usando un microscopio de luz con un aumento del 40X (Primo Star, Carl Zeiss, GmbH, Germany). Todos los experimentos se realizaron por triplicado para garantizar la reproducibilidad de los resultados.

6.17. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos de la base de datos The Human Protein Atlas fueron analizados utilizando el programa estadístico GraphPad – Prism10 (Versión 10.3; Graphpad Software, Sand Diego, CA, USA). Se empleó un Análisis de Varianza (ANOVA) y la prueba post hoc de Tukey para comparar la expresión entre los diferentes estadios. La correlación de la expresión entre TNF- α , IL-1 β , WT1 e IL-10 de los pacientes con cáncer pulmonar se determinó mediante el PCC, donde valores cercanos a 1 indican correlación positiva, -1 correlación negativa y valores cercanos a 0 ausencia de correlación. Se aplicó el método de Bonferroni para controlar el riesgo de error tipo I.

Los cambios en la expresión de WT1 y IL-10 en las líneas celulares tratadas con TNF- α , IL-1 β y LPS, se analizaron con un ANOVA y la prueba post hoc de Tukey, considerando significativos los valores de $p < 0.05$.

Para identificar la localización de WT1 en las líneas celulares A549, B16-F10 y J774.2 tratadas con TNF- α , IL-1 β y LPS se calculó el PCC, clasificando como localización nuclear valores entre 1 y 0.8, localización perinuclear valores entre 0.8 y 0.6, y localización citoplasmática valores por debajo de 0.6.

7. RESULTADOS

7.1. Expresión diferencial de TNF- α , IL-1 β , WT1 e IL-10 y su correlación en pacientes con diferentes estadios de cáncer de pulmón.

Para evaluar la relación entre las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β con WT1 e IL-10 en pacientes con cáncer de pulmón, se analizaron datos de 994 muestras provenientes del Human Protein Atlas, mismas que fueron clasificadas de acuerdo con el estadio del cáncer.

Las Figuras 5A-5B muestran una tendencia a la disminución en la expresión de TNF- α e IL-1 β , para TNF- α la disminución se ve más pronunciada en el estadio III, pero sin diferencia significativa con el resto de los estadios, en el caso de la IL-1 β se observa una fuerte disminución en el estadio IV, sin embargo, tampoco presenta diferencias significativas respecto al resto de estadios.

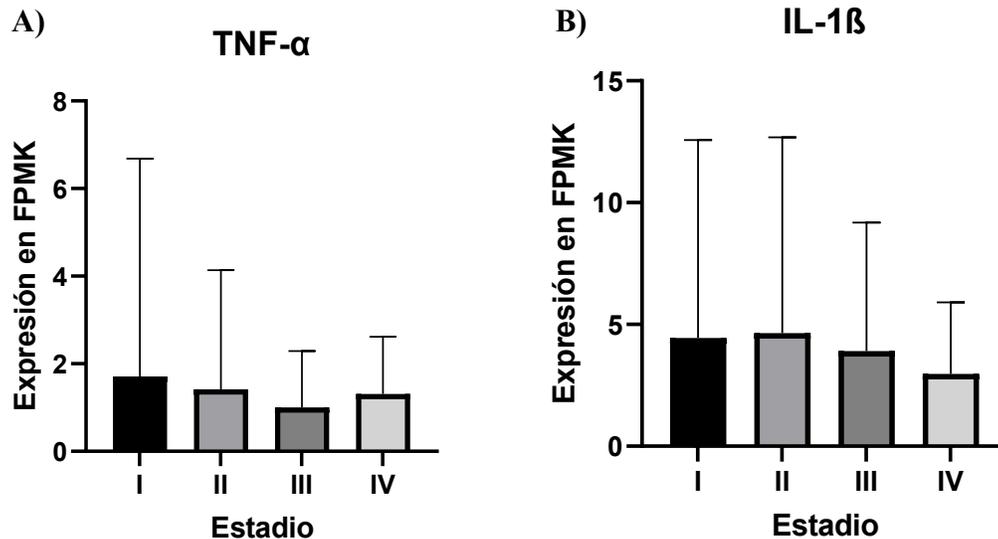


Figura 5. Expresión de TNF- α e IL-1 β en muestras de pacientes obtenidas de The Human Protein Atlas. (A) La expresión de TNF- α disminuye a medida que el estadio tumoral va aumentando, de la misma manera, (B) la IL-1 β disminuye desde el estadio I hasta el IV. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA y la prueba post hoc de Tukey con un valor de $p < 0.05$, seguido de la prueba de Pearson.

Por otro lado, WT1 inicia con una baja expresión en pacientes con estadio I, pero mantiene una alta expresión en pacientes con estadio IV (Figura 6A). De manera similar, la

expresión de IL-10 fue menor en los estadios II y III en comparación con el estadio I, pero aumentó nuevamente en el estadio IV (Figura 6B). El análisis de correlación de Pearson reveló una correlación positiva entre WT1 e IL-10 en los estadios II y IV, y una correlación negativa entre WT1 y las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β en el estadio IV (Figura 6C).

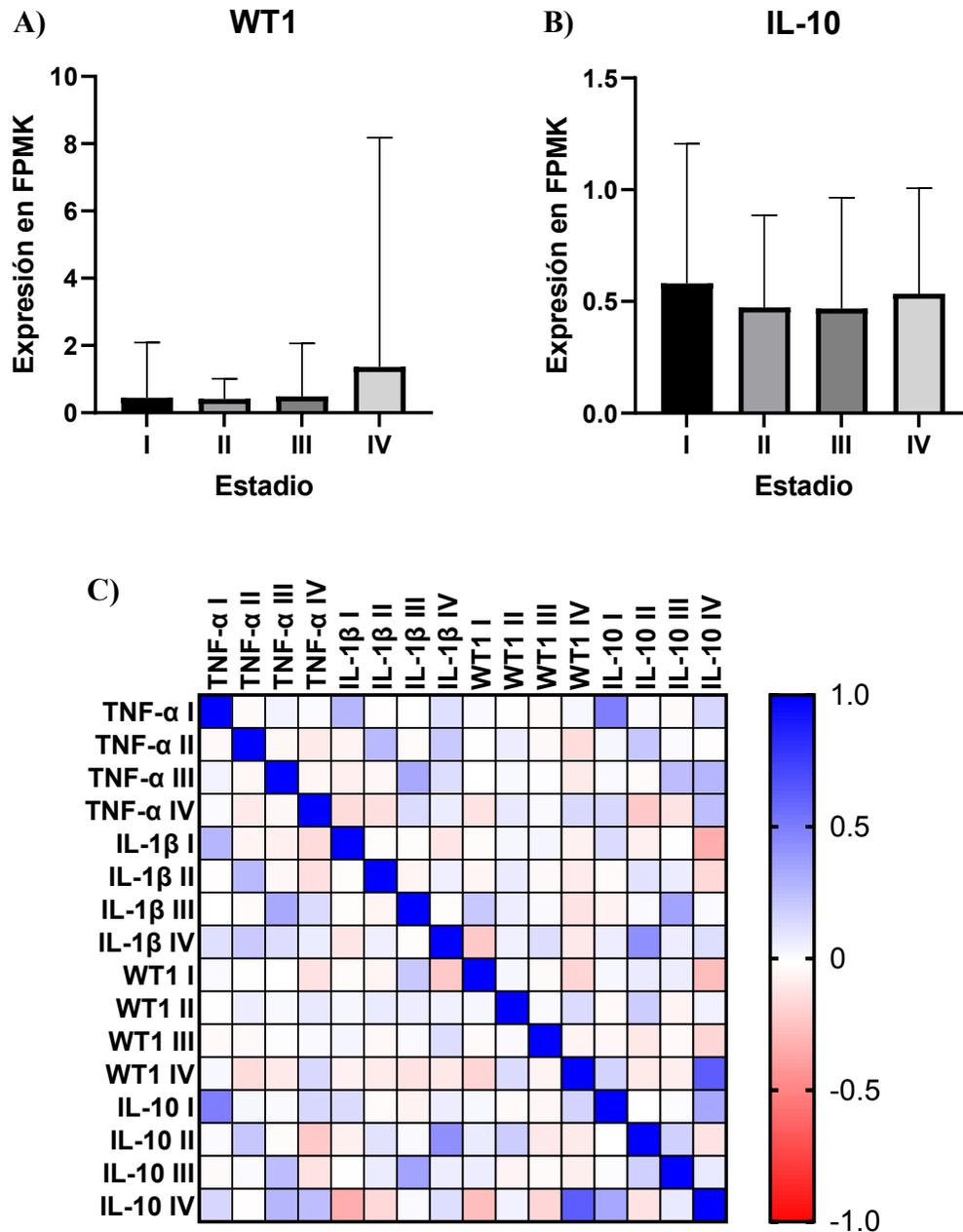


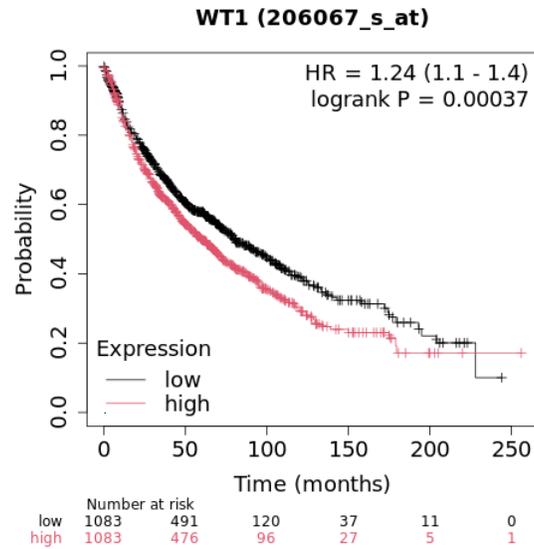
Figura 6. Expresión de WT1, IL-10 y análisis de correlación de Pearson en diferentes estadios del cáncer pulmonar. (A) La expresión de WT1 muestra una tendencia a incrementar a medida que avanza el

estadio tumoral, **(B)** la IL-10 también incrementa en el estadio IV con respecto a los estadios II y III. **(C)** El Análisis de correlación de Pearson permite determinar una correlación positiva entre WT1 y TNF- α en los estadios II y IV, una correlación positiva entre WT1 e IL-1 β en el estadio II, pero negativa en el estadio IV, y una correlación positiva entre WT1 e IL-10 en los estadios II y IV. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA y la prueba post hoc de Tukey con un valor de $p < 0.05$, seguido de la prueba de Pearson.

7.2. Análisis de supervivencia de pacientes con cáncer de pulmón en función de la expresión de WT1 e IL-10

Se realizó un análisis de Kaplan-Meier para evaluar si la asociación observada entre WT1 e IL-10 tiene un impacto en la supervivencia. Para ello, se utilizaron datos disponibles en la base de datos Kaplan-Meier Plotter (<https://kmplot.com>), trabajando con una cohorte de 2166 pacientes con información accesible sobre la expresión de estos genes y su relación con la tasa de supervivencia.

Los resultados indicaron que los pacientes con alta expresión de WT1 presentan una menor tasa de supervivencia en comparación con aquellos con baja expresión de este gen. Se observó que la mediana de supervivencia en pacientes con alta expresión de WT1 fue de 60 meses, mientras que en los pacientes con baja expresión alcanzó los 80 meses. El análisis estadístico demostró un hazard ratio (HR) de 1.24 (1.1 – 1.4) con un valor de Log-rank $p = 0.00037$ (Figura 7), indicando que una mayor expresión de WT1 se asocia con un peor pronóstico en cáncer de pulmón.



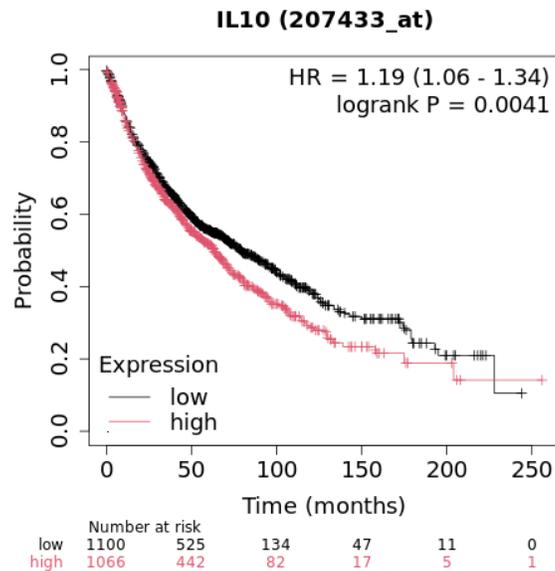
[Download plot as a PDF](#)

Median survival

| Low expression cohort (months) | High expression cohort (months) |
|--------------------------------|---------------------------------|
| 80 | 60 |

Figura 7. Análisis de Kaplan-Meier de la expresión de WT1 en pacientes con cáncer de pulmón. Se observa que una alta expresión de WT1 se asocia con una menor tasa de supervivencia (60 meses) en comparación con pacientes con baja expresión (80 meses).

El análisis de supervivencia en función de la expresión de IL-10 también demostró que una mayor expresión de este gen se asocia con una menor tasa de supervivencia. La mediana de supervivencia en pacientes con alta expresión de IL-10 fue de 63 meses, mientras que en aquellos con baja expresión alcanzó los 79 meses. En este caso, se obtuvo un HR de 1.19 (1.06 – 1.34) con un Log-rank $p = 0.0041$ (Figura 8), indicando que IL-10 también podría estar implicado en la progresión de la enfermedad y en la reducción del tiempo de supervivencia de los pacientes.



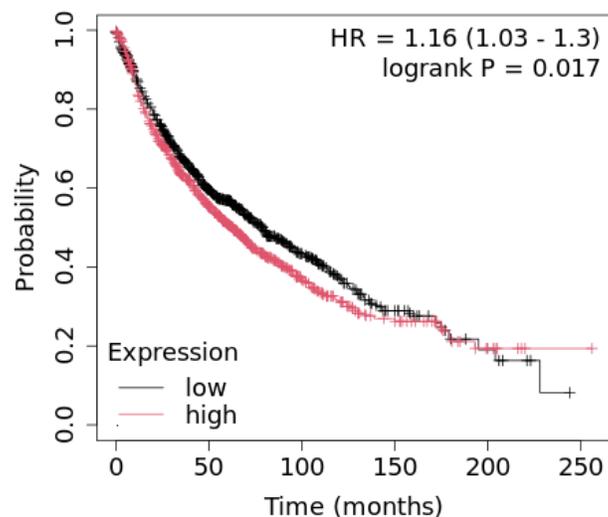
[Download plot as a PDF](#)

Median survival

| Low expression cohort (months) | High expression cohort (months) |
|--------------------------------|---------------------------------|
| 79 | 63 |

Figura 8. Análisis de Kaplan-Meier de la expresión de IL-10 en pacientes con cáncer de pulmón. Se observa que una alta expresión de IL-10 se asocia con una menor tasa de supervivencia (63 meses) en comparación con pacientes con baja expresión (79 meses).

Adicionalmente, se realizó un análisis multivariable para evaluar el efecto en conjunto de WT1 e IL-10 sobre la supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón. Los resultados demostraron que los pacientes con alta expresión de ambos genes presentan una mediana de supervivencia de 63 meses, mientras que aquellos con baja expresión tuvieron una mediana de 79 meses. Este análisis establece un HR de 1.16 (1.03 – 1.3) con un Log-rank $p = 0.0017$, lo que indica una asociación significativa entre la coexpresión de WT1 e IL-10 y un peor pronóstico en estos pacientes (Figura 9).



[Download plot as a PDF](#)

Median survival

| Low expression cohort (months) | High expression cohort (months) |
|--------------------------------|---------------------------------|
| 79 | 63 |

Figura 9. Análisis de Kaplan-Meier de la expresión conjunta de WT1 e IL-10 en pacientes con cáncer de pulmón. Se observa que los pacientes con alta expresión de ambos genes presentan una menor tasa de supervivencia (63 meses) en comparación con aquellos con baja expresión (79 meses). Los resultados sugieren que la coexpresión de WT1 e IL-10 está asociada a un peor pronóstico en cáncer de pulmón.

7.3. Modulación de la síntesis de IL-10 por WT1 en macrófagos RAW264.7

La línea celular de macrófagos RAW264.7 no expresa niveles detectables de WT1, por lo que se transfectaron con el plásmido p-WT1 para inducir su expresión y evaluar su modulación sobre el gen de la IL-10. Para ello se trabajó con bacterias *E. coli* DH5- α y se transformaron con el plásmido de expresión p-WT1, en la Figura 10A se observa el resultado de la transformación, indicando una ausencia de crecimiento de bacterias vírgenes en un medio con antibiótico, pero una proliferación de bacterias con el p-WT1 en un medio con ampicilina. Como control, las bacterias transformadas también se hicieron crecer en un medio sin antibiótico (Para corroborar la viabilidad de las bacterias después del experimento) y bacterias vírgenes se hicieron crecer en un medio sin ampicilina para comprobar la viabilidad de la cepa de *E. coli* DH5- α .

En la Figura 10B también se visualiza la caracterización del plásmido de expresión p-WT1, donde el plásmido fue digerido con la enzima de restricción EcoRI para la liberación del inserto que codifica para la isoforma pesada de WT1 (H+/+).

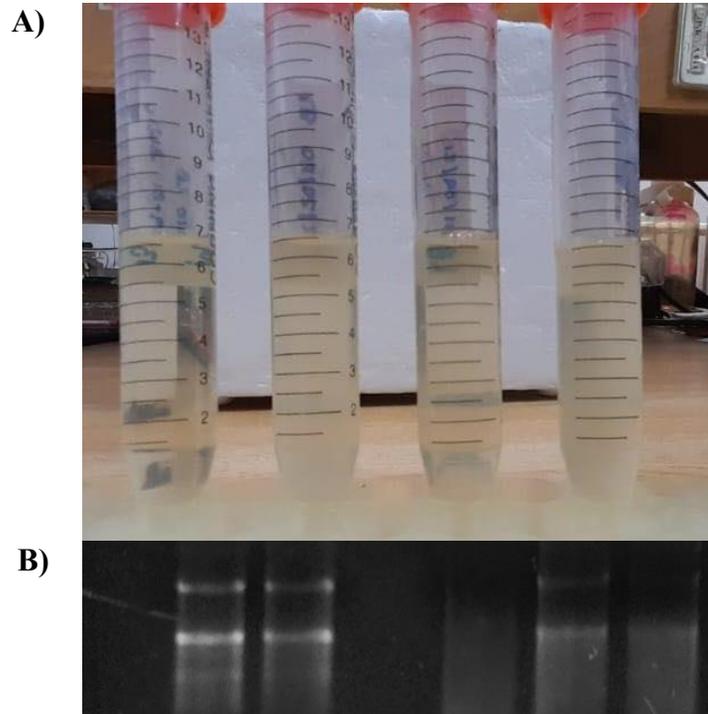


Figura 10. Crecimiento bacteriano y caracterización del plásmido codificante a WT1. (A) Bacterias *E. coli* DH5- α , de izquierda a derecha: Bacterias vírgenes en medio con ampicilina, bacterias vírgenes en medio sin ampicilina, bacterias transformadas con el p-WT1 en medio con ampicilina y bacterias transformadas con el p-WT1 en medio sin ampicilina. (B) caracterización del plásmido p-WT1 con la enzima de restricción EcoRI para la liberación del inserto que codifica a una isoforma pesada de la proteína WT1.

Los resultados en células RAW264.7 transfectadas con p-WT1 y tratadas con TNF- α , IL-1 β y LPS (Este último como control) indicaron una modulación de la función de WT1. La expresión basal de IL-10 en células RAW264.7 no aumentó significativamente tras la estimulación con TNF- α , IL-1 β o LPS; sin embargo, en células transfectadas con p-WT1 se indujo un incremento de 2.6 veces en la síntesis de IL-10. Al adicionar LPS, la síntesis de IL-10 aumentó hasta 12.9 veces (Figura 11).

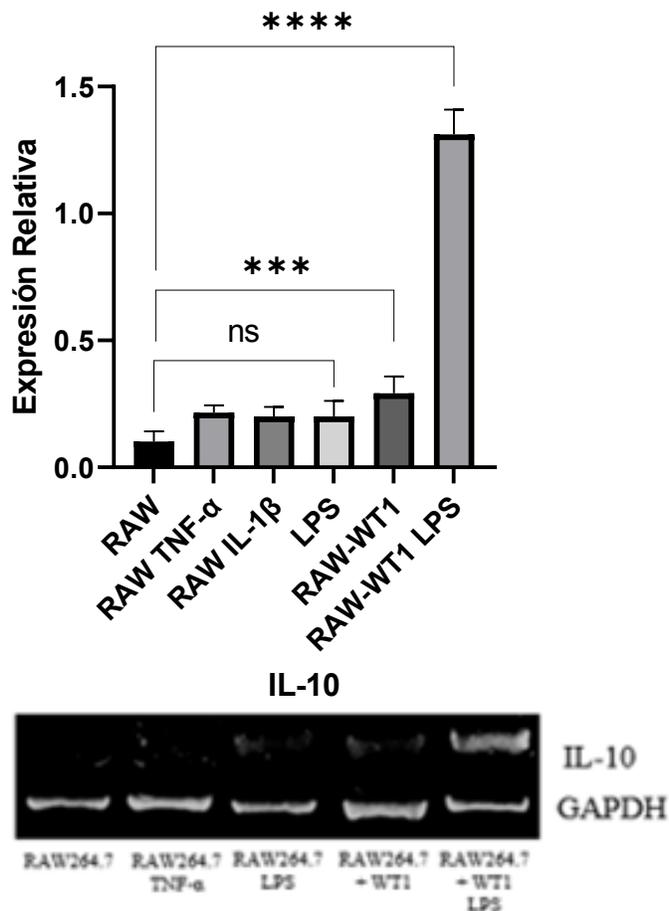


Figura 11. Análisis de expresión de IL-10 en células RAW264.7 transfectadas con el plásmido de expresión WT1. La síntesis basal de los transcritos de IL-10 aumentó significativamente cuando se indujo la expresión de WT1 en las células RAW264.7, observándose un incremento de 12.9 veces cuando la transfección se combinó con el tratamiento con LPS. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA y la prueba de Tukey ($****p < 0.0001$, $***p < 0.001$, $ns =$ no significativo). En la parte inferior se presentan imágenes representativas de geles de RT-PCR, con GAPDH como control endógeno.

La capacidad de WT1 como factor de transcripción se analizó mediante la expresión de *Bcl-2*, un gen modulado por WT1. En la Figura 12A se observa que las células RAW264.7 no presentan niveles detectables de *Bcl-2*, sin embargo, tras recibir la expresión exógena de WT1 se indujo la expresión de *Bcl-2*, al estimular estas células RAW264.7-p-WT1 con estímulos proinflamatorios como el LPS, se observa un incremento en la expresión de *Bcl-2* de forma altamente significativa. En macrófagos RAW264.7 transfectados con el p-WT1 se observó una alta expresión de *Bcl-2*, similar a los niveles de la línea celular MCF-7 pero menor que en las líneas 4T1 y B16-F10 (Figura 12B).

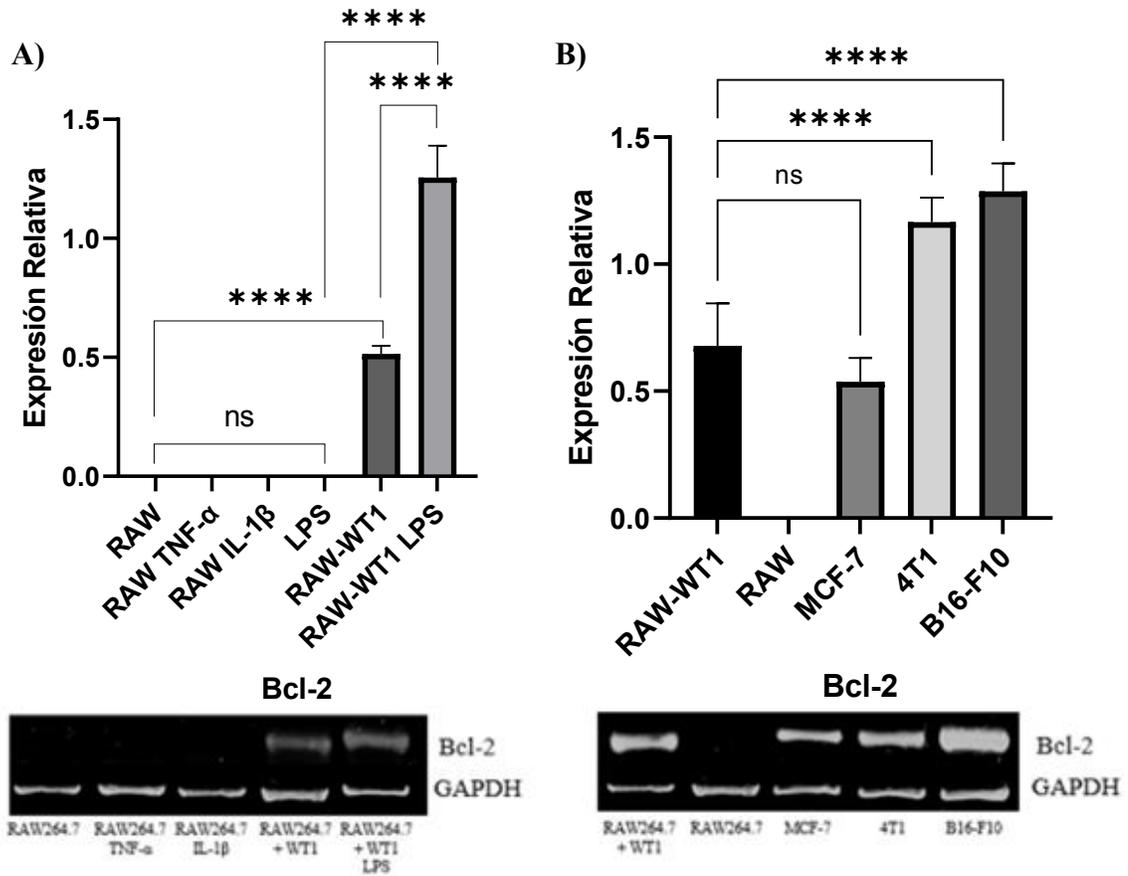


Figura 12. Análisis de expresión de Bcl-2 en células RAW264.7 transfectadas con el plásmido de expresión WT1. (A) Expresión relativa de Bcl-2 en células RAW264.7, donde la transfección con WT1 indujo la sobreexpresión de Bcl-2, efecto que se potenció con el tratamiento con LPS. **(B)** Inducción de la síntesis de Bcl-2 en células RAW264.7 transfectadas con WT1, con niveles de Bcl-2 similares a los de la línea celular MCF-7, pero inferiores a los observados en 4T1 y B16-F10. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA y la prueba de Tukey ($****p < 0.0001$, $***p < 0.001$, ns = no significativo). En la parte inferior se presentan imágenes representativas de geles de RT-PCR para cada condición, con GAPDH como control endógeno.

7.4. Modulación de la expresión de WT1 por TNF- α e IL-1 β en células tumorales y macrófagos

Se evaluó el efecto de las citocinas proinflamatorias en la modulación de WT1 en células tumorales (A549 y B16-F10) y macrófagos J774.2, cultivados en presencia de TNF- α , IL-1 β y LPS. La expresión de estos genes se cuantificó mediante RT-PCR y Western blot.

Los resultados indican que los diferentes tratamientos (TNF- α , IL-1 β y LPS) afectan significativamente la expresión de WT1 en células A549 y B16-F10. En A549, la

expresión de transcritos de WT1 disminuyó a las 6 h y se estabilizó tras 24 h de tratamientos (Figura 13A) los tratamientos con TNF- α e IL-1 β demostraron un mayor efecto en la disminución de los transcritos a las 6 y 12 h con respecto al efecto del LPS. Así mismo, el análisis de Western blot demuestra que la expresión de WT1 disminuye de manera significativa bajo la exposición de las células A549 a las citocinas TNF- α e IL-1 β , nuevamente, el LPS no muestra cambios significativos en la expresión de WT1 (Figura 13B-13C).

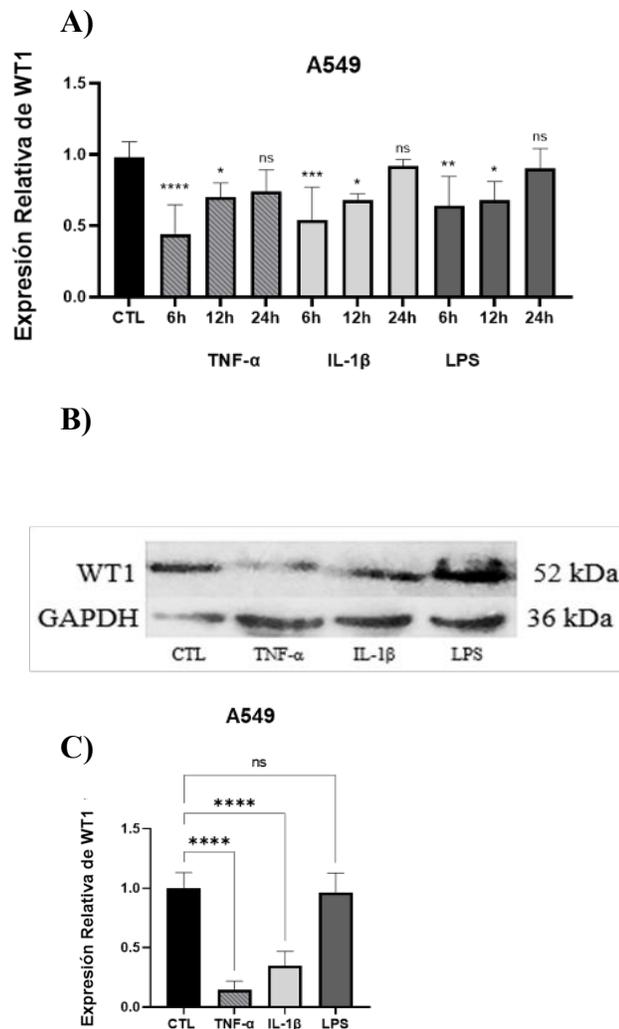


Figura 13. Modulación de la expresión de WT1 en respuesta a citocinas proinflamatorias en células A549. (A) Análisis por RT-PCR de la expresión de WT1 en células A549 tratadas con TNF- α , IL-1 β y LPS durante 6, 12 y 24 horas. (B) Análisis por western blot de la expresión de WT1 en células A549 después de 6 horas de tratamiento y (C) análisis densitométrico. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA y la prueba de Tukey con $p < 0.05$.

Al analizar la expresión de WT1 en la línea celular B16-F10, se observó reducción más marcada y continua, especialmente con TNF- α , como se muestra mediante el ensayo de RT-PCR (Figura 14A) y en el Western blot se observó la disminución en la expresión de WT1 bajo el efecto de los tres tratamientos a las 6 horas con respecto al control (Figura 14B-14C).

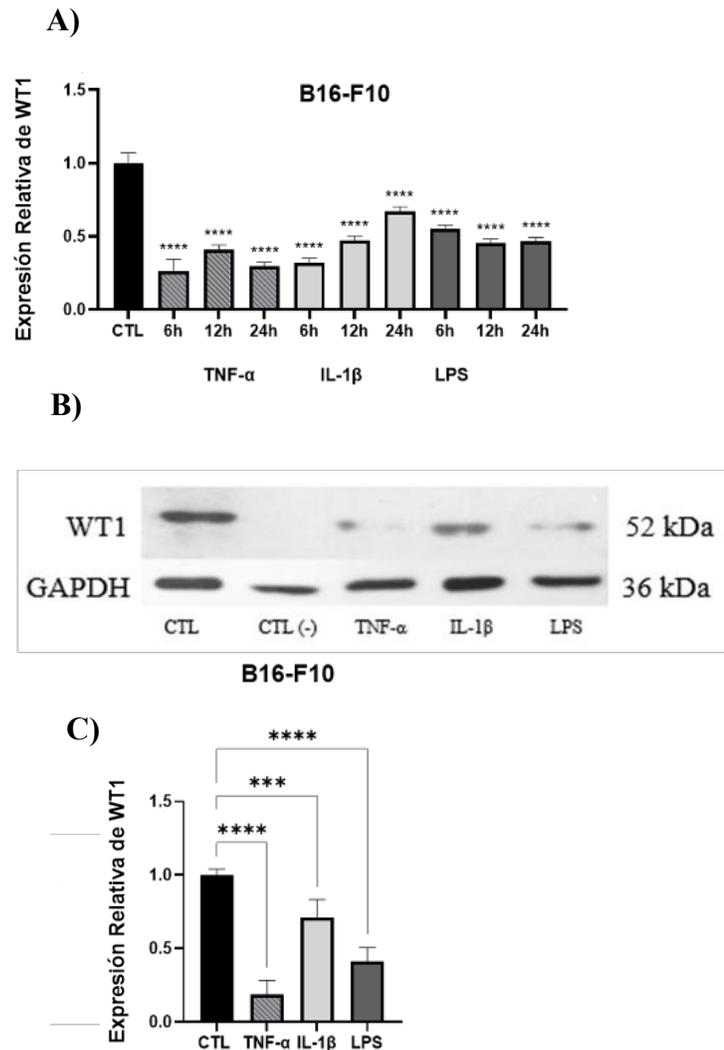


Figura 14. Modulación de la expresión de WT1 en respuesta a citocinas proinflamatorias en células B16-F10. (A) Expresión de WT1 por RT-PCR en células B16-F10 tras tratamientos con TNF- α , IL-1 β y LPS durante 6, 12 y 24 horas. (B) Expresión de WT1 analizada por western blot y (C) análisis densitométrico. GAPDH se utilizó como control endógeno. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA y la prueba de Tukey con $p < 0.05$.

En contraste, en macrófagos J774.2, la exposición a citocinas proinflamatorias incrementó la expresión de WT1, siendo TNF- α el que mayor efecto tuvo, aumentando hasta 7.8 veces

tras 6 horas de exposición, la IL-1 β también lo incrementó de forma significativa, pero en menor medida en comparación con TNF- α y con el control con LPS (Figura 15A-15B).

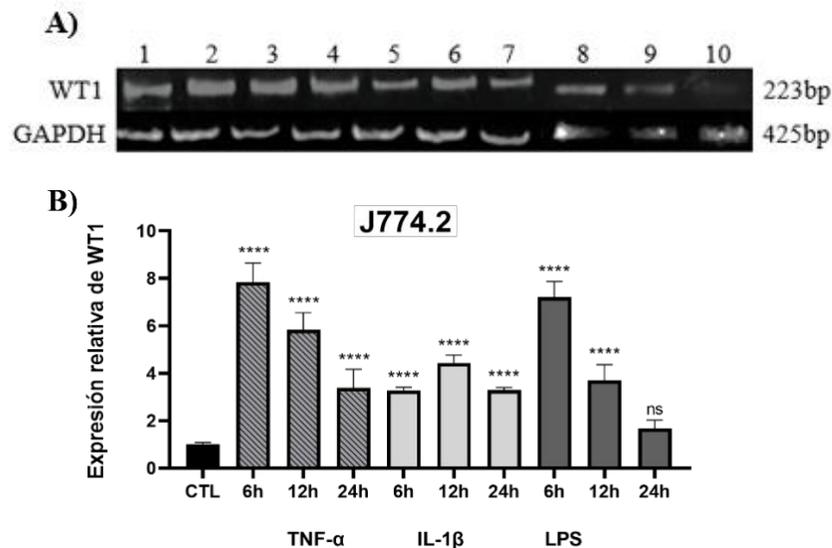


Figura 15. Modulación de la síntesis de WT1 en células J774.2. (A) Ensayo de RT-PCR para la expresión de WT1; el carril 1 representa el control sin tratamientos, las líneas 2, 3 y 4 representan la expresión de WT1 en células J774.2 tratadas con TNF- α durante 6, 12 y 24 horas, respectivamente. Los carriles 5, 6 y 7 representan la expresión en células tratadas con IL-1 β durante 6, 12 y 24 horas, respectivamente, y los carriles 8, 9 y 10 bajo los tratamientos con LPS que representa al control de inflamación. (B) Análisis densitométrico de la expresión de WT1 en células J774.2, con la amplificación de GAPDH como control endógeno, Los análisis estadísticos fueron realizados vía ANOVA seguidos de la prueba de Tukey, con un valor de $p < 0.05$.

7.5. Efecto de las citocinas proinflamatorias sobre la síntesis de IL-10 en células A549, B16-F10 y macrófagos J774.2

Se analizó el efecto de TNF- α e IL-1 β en la expresión de IL-10 en células tumorales y macrófagos mediante un ensayo de ELISA. En la línea celular A549, el tratamiento con TNF- α disminuyó la expresión de IL-10 a las 12 y 24 horas, mientras que IL-1 β y LPS no tuvieron efecto significativo (Figura 16A). En las células B16-F10, los tratamientos con TNF- α , IL-1 β y LPS redujeron significativamente la expresión de IL-10 a las 24 horas, pero no a los tiempos de 6 ni 12 horas (Figura 16B), mientras que en los macrófagos J774.2 tratados con LPS, se observó un aumento significativo de IL-10 a las 12 horas, pero a las 24 horas solo TNF- α mantuvo el incremento en la síntesis de IL-10 (Figura 16C).

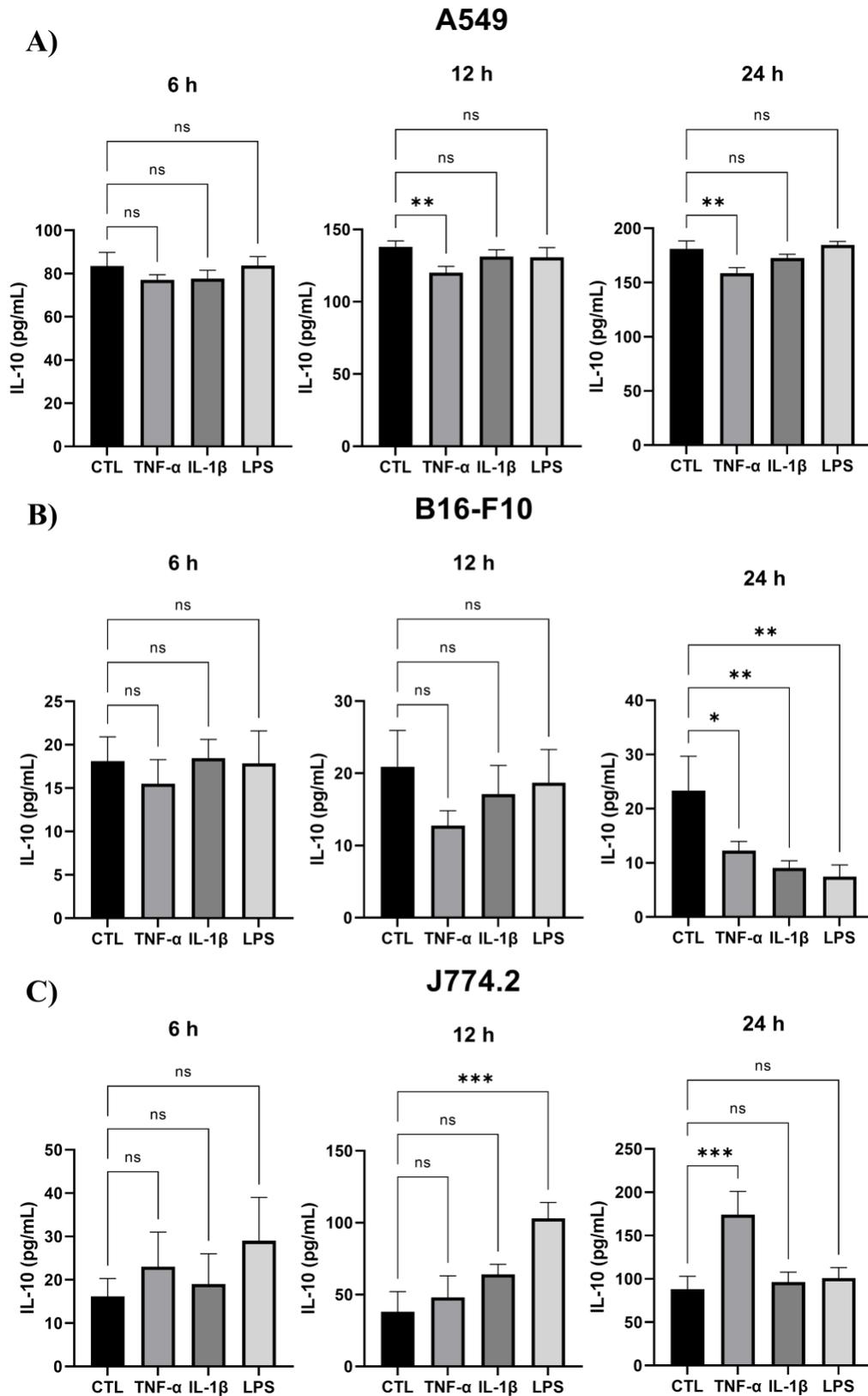


Figura 16. Expresión de IL-10 en células tumorales y de macrófagos. (A) Síntesis de IL-10 en células A549, (B) B16-F10 y (C) J774.2 tratadas con TNF- α , IL-1 β y LPS durante 6, 12 y 24 horas. Los análisis estadísticos se realizaron vía ANOVA y con la prueba de Tukey, con un valor de $p < 0.05$.

7.6. Localización subcelular de WT1 en células tumorales y macrófagos tras exposición a citocinas proinflamatorias

Se realizó un ensayo de inmunofluorescencia para evaluar si la actividad biológica de WT1 depende exclusivamente de su expresión o también de su localización subcelular. En la línea celular A549, WT1 se localizó principalmente en la región nuclear (43.6%) y perinuclear (40.3%), pero tras el tratamiento con TNF- α e IL-1 β se identificó una localización predominantemente citoplasmática (61.6% y 50.1% respectivamente, como se puede visualizar en la Tabla 1). En la Figura 17 se muestran también imágenes representativas del ensayo de inmunofluorescencia.

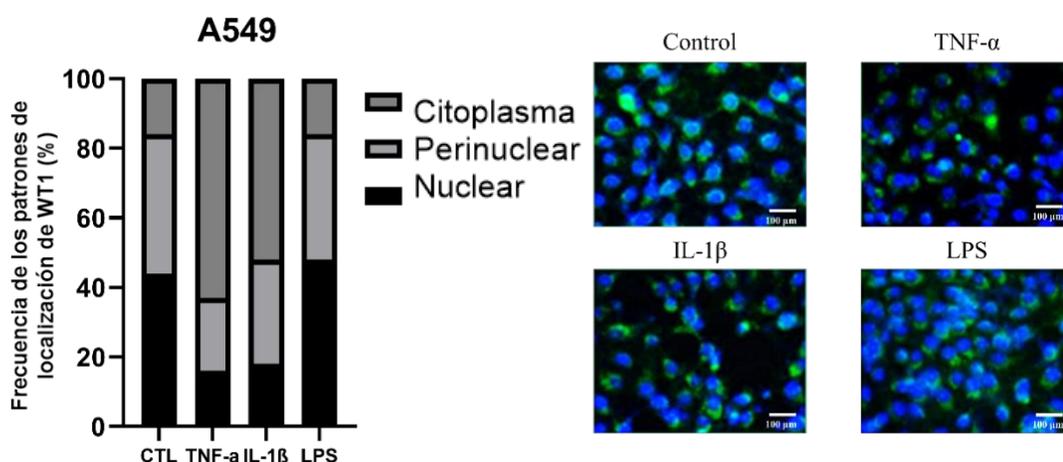


Figura 17. Localización de WT1 en células A549 bajo los tratamientos con TNF- α , IL-1 β y LPS. Las células fueron tratadas con TNF- α , IL-1 β y LPS durante 6 horas, después, se midió la expresión de WT1 (En verde) con respecto al marcaje del DAPI (Azul). Los análisis de localización se llevaron a cabo mediante el cálculo del Coeficiente de Correlación de Pearson.

Tabla 1. Patrones de localización de WT1 en células A549. Los tratamientos con TNF- α e IL-1 β inducen la presencia de WT1 en el citoplasma de las células A549.

| <i>Tratamiento</i> | <i>Nuclear</i> | <i>Perinuclear</i> | <i>Citoplasmática</i> |
|--------------------|----------------|--------------------|-----------------------|
| Control | 43.6% | 40.3% | 16.1% |
| TNF- α | 13.3% | 25.1% | 61.6% |
| IL-1 β | 16.6% | 33.3% | 50.1% |
| LPS | 50.0% | 37.5% | 12.5% |

En las células B16-F10, WT1 se encontró mayormente en el núcleo (64.7%), pero tras el tratamiento con las citocinas TNF- α e IL-1 β , se observó un desplazamiento hacia el citoplasma (64.2% y 67.7% respectivamente), el tratamiento con el control de inflamación (LPS) presentó la localización de WT1 en la región citoplasmática del 69.6% (Tabla 2 y Figura 18), se presentan también imágenes representativas de los ensayos de inmunofluorescencia.

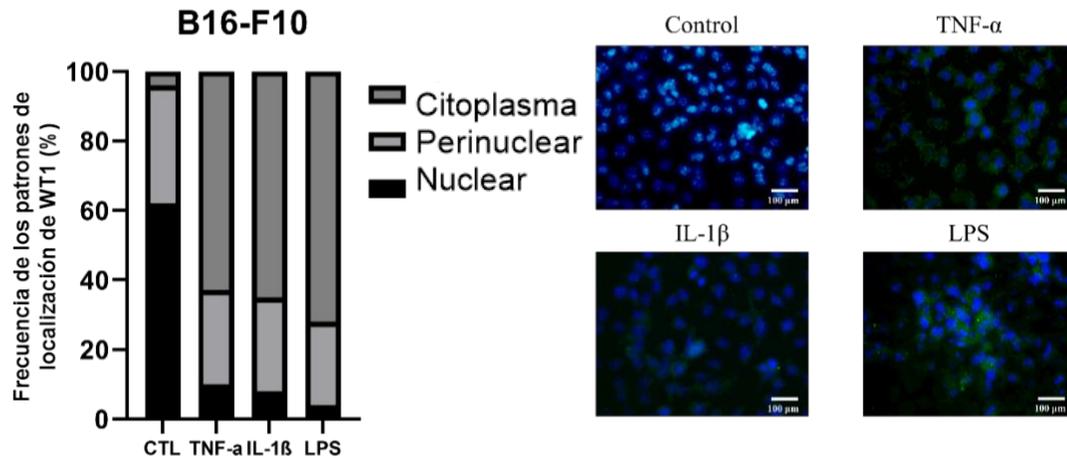


Figura 18. Localización de WT1 en células B16-F10 bajo los tratamientos con TNF- α , IL-1 β y LPS. Las células fueron tratadas con TNF- α , IL-1 β y LPS durante 6 horas, después, se midió la expresión de WT1 (En verde) con respecto al marcaje del DAPI (Azul). Los análisis de localización se llevaron a cabo mediante el cálculo del Coeficiente de Correlación de Pearson.

Tabla 2. Patrones de localización de WT1 en células B16-F10. Los tratamientos con TNF- α , IL-1 β y LPS inducen la presencia de WT1 en el citoplasma de las células B16-F10.

| <i>Tratamiento</i> | <i>Nuclear</i> | <i>Perinuclear</i> | <i>Citoplasmática</i> |
|--------------------|----------------|--------------------|-----------------------|
| Control | 64.7% | 29.4% | 5.9% |
| TNF- α | 11.5% | 24.3% | 64.2% |
| IL-1 β | 8.7% | 23.6% | 67.7% |
| LPS | 3.4% | 27.0% | 69.6% |

Por otro lado, en los macrófagos J774.2 la expresión de WT1 se encontró principalmente en la región nuclear (81.9%), pero tras el tratamiento con TNF- α e IL-1 β , se observó un desplazamiento hacia la región perinuclear 56.6% y citoplasmática 57.2% respectivamente, el tratamiento con LPS presentó la localización de WT1 en la región

perinuclear (87.1%), en la Tabla 3 se muestran los datos de localización completos y en la Figura 19 se presentan imágenes representativas de los ensayos de inmunofluorescencia.

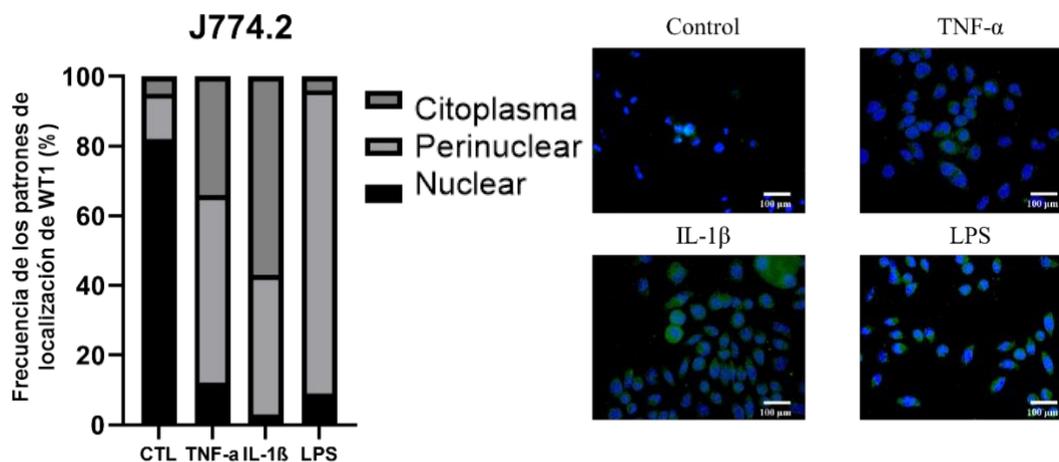


Figura 19. Localización de WT1 en células J774.2 tras la exposición a los tratamientos con TNF- α , IL-1 β y LPS. Las células fueron tratadas con TNF- α , IL-1 β y LPS durante 6 horas, después, se midió la expresión de WT1 (En verde) con respecto al marcaje del DAPI (Azul). Los análisis de localización se llevaron a cabo mediante el cálculo del Coeficiente de Correlación de Pearson.

Tabla 3. Patrones de localización de WT1 en células J774.2. Los tratamientos con TNF- α y LPS inducen la presencia de WT1 en la región perinuclear, mientras que el tratamiento con IL-1 β presenta a WT1 en el citoplasma de las células J774.2.

| <i>Tratamiento</i> | <i>Nuclear</i> | <i>Perinuclear</i> | <i>Citoplasmática</i> |
|--------------------|----------------|--------------------|-----------------------|
| Control | 81.9% | 12.3% | 5.8% |
| TNF- α | 10.1% | 56.6% | 33.3% |
| IL-1 β | 4.3% | 38.5% | 57.2% |
| LPS | 8.5% | 87.1% | 4.4% |

7.7. Inducción de fosforilación de WT1 por TNF- α e IL-1 β

Se analizó la relación entre la fosforilación de WT1 y su localización subcelular en células tratadas. En la figura 20 se puede observar que las células A549 muestran un nivel de expresión de WT1 fosforilado en las serinas 363 y 393 de 3.92 y 2.21 unidades relativas de expresión, respectivamente, sin embargo, al tratar las células con TNF- α e IL-1 β se identificó un incremento significativo en la detección de WT1 en su estado fosforilado hasta el nivel de 7.48 y 7.35 unidades de relativas de expresión

respectivamente para la posición de la serina 363, el tratamiento con LPS no demostró inducir la fosforilación de WT1 significativamente en esta posición, pero lo incrementó al nivel de 4.18 unidades relativas de expresión (Figura 20A). Para la posición de la serina 393, se identificó un incremento en la expresión de WT1 fosforilado altamente significativo para los tratamientos con TNF- α , IL-1 β y LPS, siendo de 10.81, 7.59 y 6.74 unidades relativas de expresión respectivamente (Figura 20D). Al analizar la localización de este WT1 fosforilado en la serina 363, para el control y los tratamientos, se identificó a WT1 predominantemente en la región citoplasmática, con un porcentaje en el control del 57.8%, 53.2% para TNF- α , 73.5% para IL-1 β y del 40.1% para el LPS (Figura 20B). En el caso de WT1 fosforilado en la serina 393, la localización fue nuevamente en la región citoplasmática, siendo para el control del 59.6%, para TNF- α del 64.3%, para la IL-1 β del 37.2% y para el LPS del 62.6% (Figura 20E). Se presentan también imágenes representativas del ensayo de inmunofluorescencia en las figuras 20C-20F).

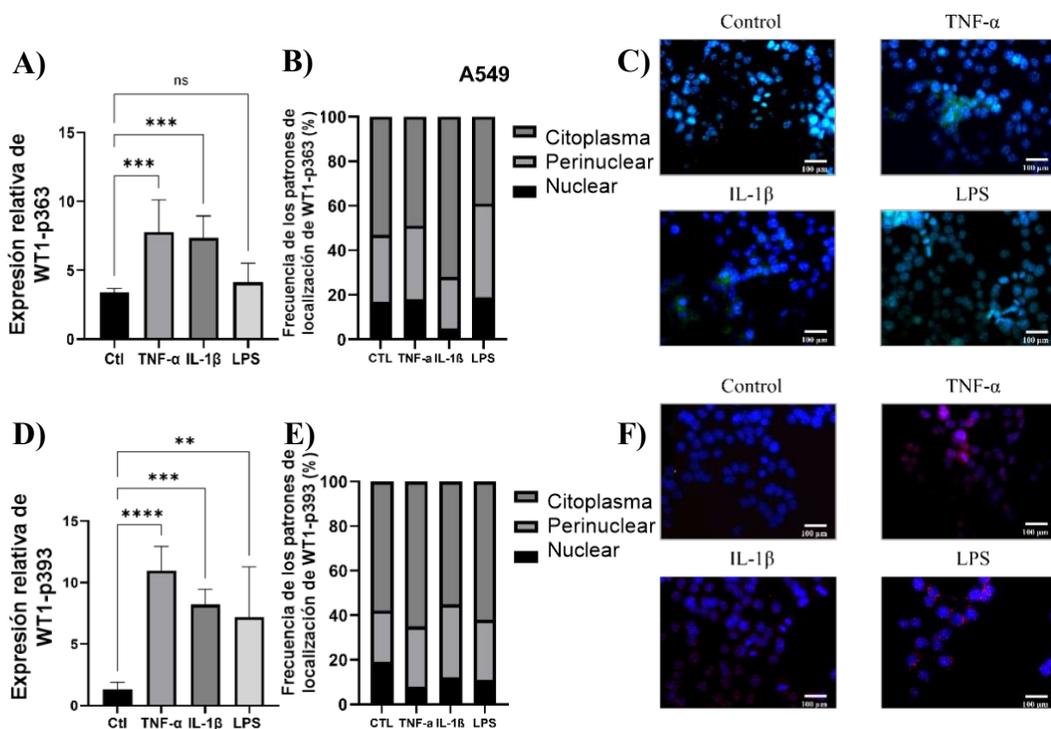


Figura 20. Detección de WT1-p363 y p393 en células A549 tratadas con TNF- α , IL-1 β y LPS mediante inmunofluorescencia. (A) Detección de WT1-p363 en células A549 mediante inmunofluorescencia, (B) localización subcelular de WT1-p363 y (C) sus imágenes representativas. (D) Detección de WT1-p393, (E) localización subcelular de WT1-p393 y (F) sus imágenes representativas, WT1-p363 (Verde) y WT1-p393 (Rojo) utilizando como contratinción DAPI (Azul), los tratamientos fueron aplicados durante 6 horas. Los cambios en la expresión de WT1 fosforilado fueron analizados vía ANOVA y la prueba post hoc de Tukey, con un valor de $p < 0.05$. La localización se determinó mediante un análisis de correlación Pearson.

El análisis de WT1-p363 y p393 en células B16-F10 se identificó un nivel de expresión de 2.78 y 2.11 unidades relativas de expresión, respectivamente, al tratar las células con TNF- α , IL-1 β y LPS se identificó un incremento significativo en la detección de WT1 en su estado fosforilado en la posición S363 hasta los niveles de 19.83, 18.57 y 9.92 respectivamente (Figura 21A). Para la posición de la serina 393, se identificó un incremento significativo en la expresión de WT1 fosforilado para los tratamientos con TNF- α , IL-1 β y LPS, siendo de 9.84, 14.63 y 17.34 unidades relativas de expresión respectivamente (Figura 21D). Al analizar la localización de este WT1 fosforilado en la serina 393, para el control se identificó a WT1 predominantemente en la región citoplasmática con un porcentaje en el control del 43.9%, para los tratamientos con TNF- α e IL-1 β la localización fue predominantemente en la región perinuclear, siendo del 68.3% y 48.7% respectivamente, el tratamiento con LPS mantuvo una localización de WT1-p393 citoplasmática con un valor del 60.2% (Figura 21B). WT1 fosforilado en la S393, la localización del control y de la IL-1 β fue predominantemente citoplasmática, siendo para el control del 60.1% y para IL-1 β del 72.8%, el tratamiento con TNF- α mantuvo una localización perinuclear del 45.6% y el LPS del 84.4% (Figura 21E). Se presentan imágenes representativas del ensayo de inmunofluorescencia en las figuras 21C-21-F).

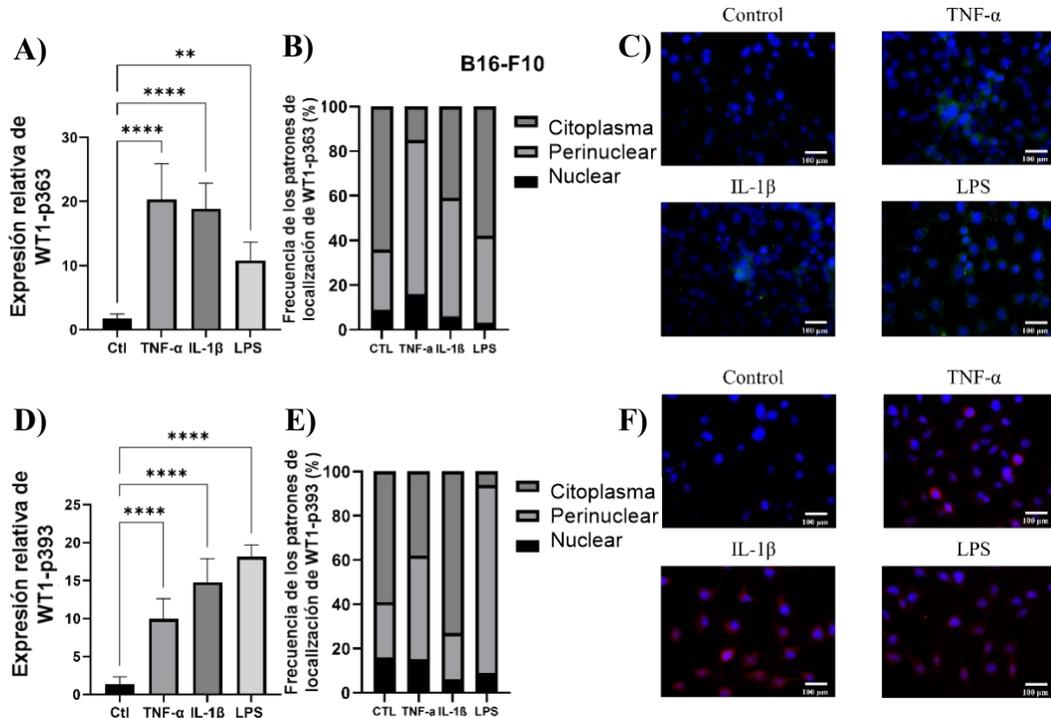


Figura 21. Detección de WT1-p363 y p393 en células B16-F10 tratadas con TNF- α , IL-1 β y LPS mediante inmunofluorescencia. (A) Detección de WT1-p363 en células B16-F10 mediante inmunofluorescencia, (B) localización subcelular de WT1-p363 y (C) sus imágenes representativas. (D) Detección de WT1-p393, (E) localización subcelular de WT1-p393 y (F) sus imágenes representativas, WT1-p363 (Verde) y WT1-p393 (Rojo) utilizando como contraindicación DAPI (Azul), los tratamientos fueron aplicados durante 6 horas. Los cambios en la expresión de WT1 fosforilado fueron analizados vía ANOVA y la prueba post hoc de Tukey, con un valor de $p < 0.05$. La localización se determinó mediante un análisis de correlación Pearson.

Se realizó un análisis sobre la fosforilación de WT1 en las S363 y S393 en la línea celular J774.2, se determinó que el control muestra un nivel de expresión de WT1 fosforilado en las S363 y S393 de 0.32 y 0.92 unidades relativas de expresión, respectivamente, sin embargo, al tratar las células con TNF- α , IL-1 β y LPS se encontró un incremento altamente significativo en la detección de WT1 en su estado fosforilado hasta el nivel de 6.57, 3.89 y 3.97 unidades de relativas de expresión respectivamente para la posición S363 (Figura 22A). En la S393, se encontró un incremento en la expresión de WT1 fosforilado altamente significativo para los tratamientos con TNF- α , IL-1 β y LPS, obteniendo valores de 13.21, 4.84 y 6.93 unidades relativas de expresión respectivamente (Figura 22D). Mientras tanto, la localización de WT1 fosforilado en la serina 363, para el control y el tratamiento con IL-1 β se identificó en la región citoplasmática, con un

porcentaje en el control del 94.7% y para la IL-1 β del 75.8%. Los tratamientos con TNF- α y LPS presentaron a WT1-p393 en la región perinuclear con valores del 44.7% y del 83.8% respectivamente (Figura 22B). WT1 fosforilado en S393, la localización fue nuevamente en la región citoplasmática, siendo para el control del 44.8%, para TNF- α del 62.6%, para la IL-1 β del 38.1% y para el LPS del 81.9% (Figura 22E). Se presentan imágenes representativas del ensayo de inmunofluorescencia en las figuras 22C-22F).

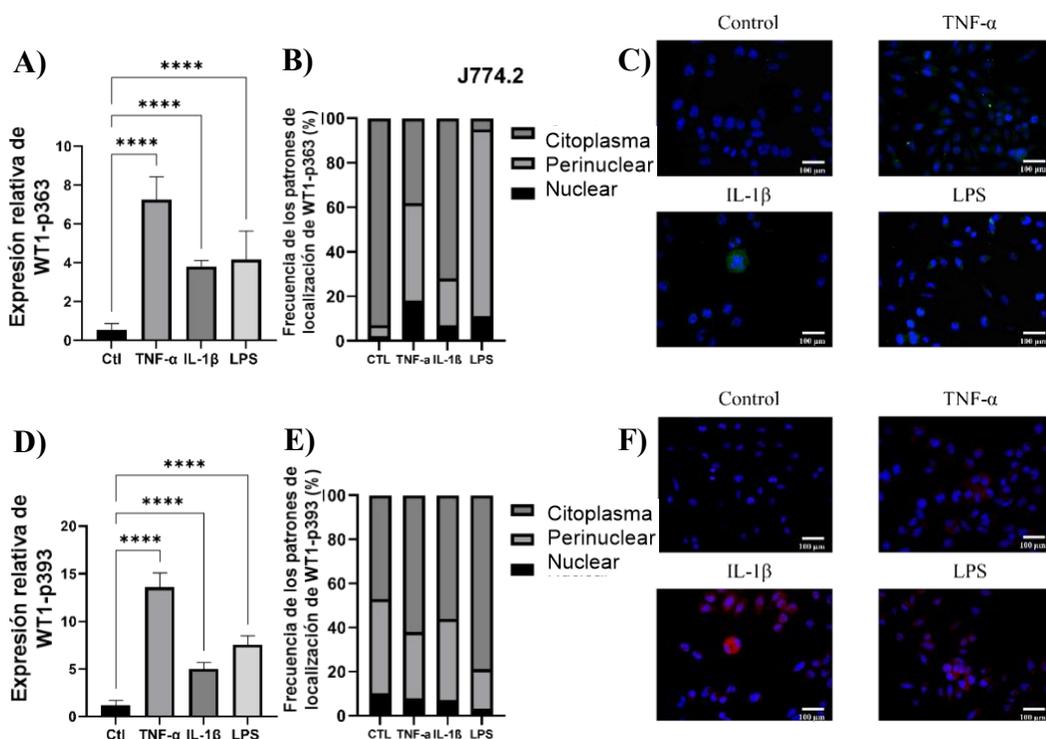


Figura 22. Detección de WT1-p363 y p393 en células J774.2 tratadas con TNF- α , IL-1 β y LPS mediante inmunofluorescencia. (A) Detección de WT1-p363 en células J774.2 mediante inmunofluorescencia, (B) localización subcelular de WT1-p363 y (C) sus imágenes representativas. (D) Detección de WT1-p393, (E) localización subcelular de WT1-p393 y (F) sus imágenes representativas, WT1-p363 (Verde) y WT1-p393 (Rojo) utilizando como contraindicación DAPI (Azul), los tratamientos fueron aplicados durante 6 horas. Los cambios en la expresión de WT1 fosforilado fueron analizados vía ANOVA y la prueba post hoc de Tukey, con un valor de $p < 0.05$. La localización se determinó mediante un análisis de correlación Pearson.

7.8. Correlación clínica entre WT1 e IL-10 en pacientes con cáncer de pulmón

El análisis por inmunohistoquímica de la expresión de WT1 en 27 muestras de pacientes con cáncer de pulmón reveló un aumento en la expresión de WT1 en los estadios

III y IV (19.66 y 45.00, respectivamente) en comparación con los estadios I y II (11.83 y 8.66, respectivamente). Por otro lado, la expresión de IL-10 fue menor en el estadio II en comparación con el estadio I (22.00 y 29.33, respectivamente), pero presentó un incremento en los estadios III y IV (31.17 y 41.17, respectivamente) (Figura 23A–23C). El análisis de correlación de Pearson mostró una correlación positiva entre WT1 e IL-10 en los estadios II (0.73), III (0.37) y IV (0.48) (Figura 23D).

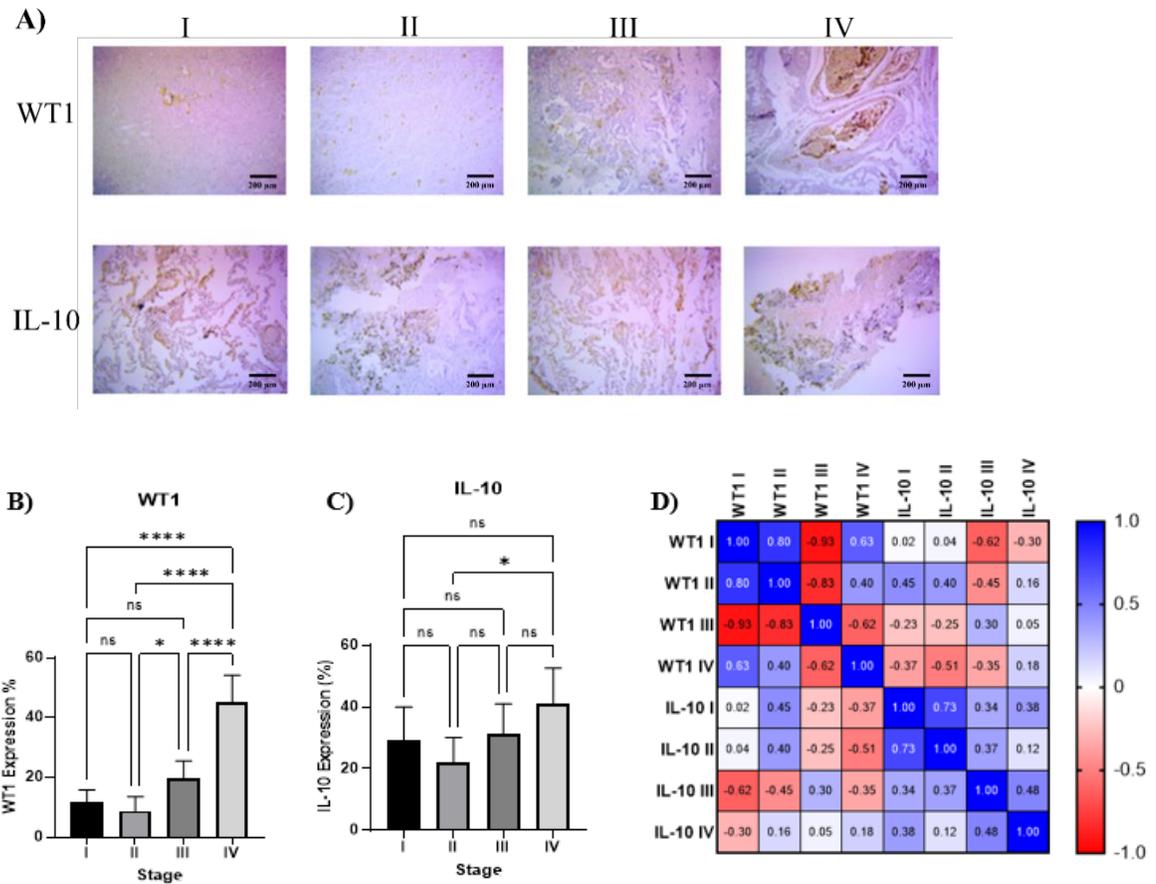


Figura 23. Expresión de WT1 e IL-10 en pacientes con cáncer pulmonar. (A) Ensayo de inmunohistoquímica para la detección de WT1 e IL-10 en muestras de pacientes categorizadas en los estadios I, II, III y IV. (B) Análisis de expresión de WT1, el cual muestra tendencia a incrementar del estadio I al estadio IV. (C) Expresión de la IL-10, la cual disminuye de forma significativa en el estadio II de la enfermedad. (D) Análisis de correlación de Pearson, que revela una correlación positiva entre WT1 e IL-10 en los estadios II, III y IV.

DISCUSIÓN

Esta investigación busca resalta la asociación entre WT1 y el proceso inflamatorio en la progresión del cáncer de pulmón. Se demostró que la expresión de WT1 aumenta significativamente desde el estadio I al IV, correlacionándose con la expresión de IL-10 en los estadios II y IV. La modulación de WT1 por citocinas inflamatorias como TNF- α e IL-1 β presentó efectos variables en células tumorales y macrófagos, indicando un papel diferencial de WT1 en distintos entornos celulares. Nuestros experimentos *in vitro* también revelaron que WT1 actúa como un regulador positivo de IL-10, particularmente bajo condiciones inflamatorias, lo que podría favorecer un microambiente tumoral inmunosupresor que podría favorecer la progresión del cáncer.

Los análisis de muestras de pacientes con cáncer pulmonar y su asociación con la experimentación *in vitro* proporcionan una visión integral del papel de WT1 en el cáncer de pulmón. El uso de diversas estrategias experimentales como RT-PCR, Western blot, ELISA e inmunohistoquímica, permitió confirmar la correlación entre WT1 e IL-10 en la progresión del cáncer pulmonar. Sin embargo, aunque nuestra investigación se centra en TNF- α e IL-1 β , es posible que otras citocinas inflamatorias también contribuyan a la regulación de WT1, por lo que se requieren estudios adicionales para esclarecer estos mecanismos.

El análisis de muestras de pacientes con cáncer de pulmón obtenidas del The Human Protein Atlas reveló una disminución en la expresión de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β conforme avanza el estadio tumoral, sugiriendo una respuesta inflamatoria reducida en estos pacientes. Esto podría estar relacionado con la generación de un microambiente que favorece la inmunosupresión. Este hallazgo concuerda con estudios previos que reportan que la disminución de citocinas proinflamatorias favorece la progresión tumoral y la evasión del sistema inmune en estadios avanzados (Li et al. 2020, Tauriello et al. 2022).

La alta expresión de WT1 en estadios avanzados del cáncer de pulmón podría estar asociada con procesos como resistencia a la apoptosis (Chen et al. 2022), angiogénesis (Dohi et al. 2010) y metástasis (Fraizer et al. 2016)). En este estudio, identificamos un aumento en la expresión de WT1 en pacientes en estadio IV y una correlación positiva

entre WT1 e IL-10 en los estadios II y IV del cáncer de pulmón. La IL-10, una citocina antiinflamatoria, desempeña un papel crucial en la respuesta antiinflamatoria (Fang y Zhu, 2020) y la generación de un microambiente tumoral tolerogénico (Batchu et al. 2021). El aumento en la expresión de IL-10 y WT1 en pacientes en estadio IV podría revelar un mecanismo mediante el cual el tumor evade la respuesta inmune, promoviendo un entorno inmunosupresor (Mirlekar y Pylaveva-Gupta, 2021). Este hallazgo concuerda con estudios que sugieren que las oncoproteínas pueden inducir la síntesis de IL-10 para facilitar la evasión del sistema inmunológico por parte del tumor (Nishida, 2021, Fan et al. 2022).

Para determinar si WT1 actúa como promotor o represor de IL-10, utilizamos células RAW264.7 transfectadas para expresar WT1 como modelo de expresión exógena. Nuestros resultados mostraron un incremento de 2.6 veces en la expresión de IL-10 en células RAW264.7 transfectadas con p-WT1 en comparación con células no transfectadas. Sin embargo, tras el tratamiento con LPS, las células RAW264.7 transfectadas con p-WT1 presentaron un aumento de hasta 12.9 veces en comparación con el control, lo que indica que WT1 podría actuar como un regulador positivo de IL-10. Estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos en las muestras de pacientes con cáncer de pulmón. Se ha descrito que los macrófagos tienen una mayor sensibilidad que otras líneas celulares hacia la exposición al LPS (Marroco y Ortiz, 2022), en función de una mayor cantidad de receptores de tipo TLR-4 (Olona et al. 2021), estos receptores inducen una cascada de señalización que permiten la activación de genes codificantes a citocinas proinflamatorias por la vía de NF-kB (Zhang et al. 2024), en respuesta al proceso inflamatorio, los macrófagos pueden inducir la síntesis de citocinas anti-inflamatorias para la resolución del proceso inflamatorio, entre ellas la IL-10 (Kafo et al. 2024), explicando el incremento de esta citocina, sobre todo tras la exposición al LPS.

Para confirmar la modulación transcripcional de WT1, analizamos su efecto en la expresión de Bcl-2, un gen cuya regulación transcripcional por WT1 ha sido descrita en ciertas líneas celulares (Karakas et al. 2002), lo que refuerza su papel oncogénico al promover un microambiente favorable para la supervivencia y mantenimiento tumoral (Mayo et al. 1999).

Los efectos de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β sobre WT1 son distintos entre células tumorales y macrófagos. En las líneas tumorales A549 y B16-F10, la exposición a TNF- α e IL-1 β resultó en una disminución de la expresión de WT1, lo que sugiere que el proceso inflamatorio en los tumores podría suprimir oncogenes. En contraste, en macrófagos J774.2, la expresión de WT1 aumentó en respuesta a los tratamientos con TNF- α e IL-1 β , posiblemente como parte de la respuesta de los macrófagos para promover la reparación tisular y resolver la inflamación. Se ha descrito que WT1 promueve la proliferación celular (Wang et al. 2023) e induce la síntesis de IL-10 para modular el perfil inflamatorio (Sciesielski et al. 2010). Al analizar la expresión de WT1 en células tumorales A549 y B16-F10 en respuesta específicamente al LPS, no se encontró una disminución tan marcada, posiblemente a la ausencia de receptores de tipo TLR-4 con respecto a las células de macrófagos J774.2 y RAW264.7 (Chang y Zhang, 2022. Caisová et al. 2016).

Las células tumorales y los macrófagos también mostraron diferencias en la modulación de IL-10 en respuesta a los tratamientos con citocinas. En las células A549 y B16-F10 tratadas con TNF- α , la expresión de IL-10 disminuyó entre las 12 y 24 horas, lo que sugiere que TNF- α podría reducir los niveles de IL-10 en células tumorales, contribuyendo a un microambiente proinflamatorio que inhibe el crecimiento tumoral en etapas tempranas (Donnelly et al. 1995). En contraste, los macrófagos J774.2 presentaron aumento en la síntesis de IL-10 tras 6 horas de exposición, con TNF- α manteniendo la sobreexpresión de IL-10 por más de 24 horas. Esto resalta el papel modulador de TNF- α en la inducción de una respuesta antiinflamatoria sostenida en macrófagos, un paso crucial para la resolución de la inflamación y la promoción de un microambiente que facilita la progresión del cáncer (Jang et al. 2021).

Existen diversas formas de modular la función de un factor transcripcional, una de las cuales es la fosforilación (Tang et al. 2020), en este estudio evaluamos si los cambios en la función de WT1 eran producto del incremento o disminución de esta proteína y también si dichas modulaciones en los genes regulados por WT1 era producto de las alteraciones en la actividad como factor transcripcional. Se evaluó la inducción de la fosforilación de WT1 en las serinas S363 y S393, sitios que se ha descrito podrían ser esenciales para la

actividad transcripcional de WT1 (Arellano et al. 2021). Se evaluó la inducción de la fosforilación en las líneas celulares tumorales A549 y B16-F10, y en los macrófagos J774.2, encontrando comportamientos bastante similares entre las líneas, donde los tratamientos pueden inducir la fosforilación de WT1 y un subsecuente arresto en la región citoplasmática. Esto representa un efecto biológico de alteraciones en genes que solían ser regulados por WT1, al ser un factor transcripcional, su localización tiende a ser nuclear, actuando en la región promotora de los genes que modulará (Larsson et al. 1995). Se identificó que WT1 es fosforilado en ambos sitios S363 y S393, en las tres líneas celulares evaluadas, también se encontró que el LPS no tiene un efecto tan marcado en las células tumorales como lo tuvo en macrófagos, posiblemente por la diferencia en la presencia de receptores TLR-4 que se menciona previamente.

El análisis de WT1 e IL-10 en pacientes con cáncer de pulmón mediante inmunohistoquímica corrobora nuestros resultados *in vitro*, revelando un incremento en la expresión de WT1 en los estadios III y IV, lo que concuerda con reportes previos sobre su presencia en la progresión tumoral avanzada (Fang y Zhu, 2020). De manera similar, la IL-10 disminuye en el estadio II comparado con el estadio I, pero vuelve a aumentar en los estadios III y IV. Este patrón sugiere una relación dinámica entre IL-10 y la progresión del cáncer de pulmón, con un posible papel inmunosupresor en etapas avanzadas (Mirlekar, 2022). Además, los resultados en las muestras por inmunohistoquímica correlacionan con los datos obtenidos en The Human Protein Atlas, indicando que el ensayo obtenido de las 27 muestras puede ser extrapolable a lo que ocurre en la población a nivel global, aun así, se sugiere un análisis masivo y con una mayor cantidad de muestras para corroborar la regulación propuesta sobre estas 27 muestras de pacientes utilizadas para este estudio.

Nuestros resultados sugieren que WT1 e IL-10 pueden contribuir a la evasión inmunológica y progresión tumoral, resaltando su potencial como blancos terapéuticos. La correlación entre WT1 e IL-10 en estadios avanzados sugiere que WT1 podría estimular la producción de IL-10, favoreciendo la evasión del sistema inmune. Además, la modulación de WT1 por citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β refuerza el papel del microambiente inflamatorio en la regulación de factores oncogénicos.

La vía de WT1—IL-10 representa una oportunidad para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en el cáncer de pulmón. Inhibidores de WT1 o antagonistas de IL-10 podrían potenciar la respuesta inmune antitumoral. Sin embargo, se requieren ensayos clínicos para evaluar la seguridad y eficacia de estos enfoques en pacientes con cáncer de pulmón.

CONCLUSIONES

Este estudio ha proporcionado nuevos conocimientos sobre la relación entre la inflamación y la progresión del cáncer de pulmón a través de la modulación de WT1 y la síntesis de IL-10. Nuestros hallazgos muestran que: WT1 desempeña un papel clave en la regulación de IL-10, especialmente en las etapas avanzadas de la enfermedad, lo que sugiere que la vía WT1—IL-10 podría contribuir a la creación de un microambiente inmunosupresor. Este entorno favorece la evasión del sistema inmunológico y la progresión tumoral. Además, las diferencias observadas en la modulación de WT1 entre células tumorales y macrófagos resaltan la complejidad de la interacción entre citocinas proinflamatorias y factores oncogénicos. Los resultados sugieren que establecer terapias que consideren a WT1 desde la perspectiva del proceso inflamatorio podría ser una estrategia terapéutica prometedora para interferir con la progresión del cáncer de pulmón.

PERSPECTIVAS

- Determinar si otras citocinas proinflamatorias tienen efecto sobre la expresión de WT1 y si este modula distintas citocinas anti-inflamatorias.
- Utilizar un ARNi en células que expresen WT1 para evaluar los cambios en la expresión de IL-10 en respuesta a estímulos inflamatorios.
- Evaluar el perfil inflamatorio en un modelo murino de cáncer pulmonar con tratamientos que modulen el proceso inflamatorio.
- Analizar la expresión de citocinas inflamatorias en muestras de suero de pacientes con cáncer pulmonar para correlacionar el perfil inflamatorio sistémico con la expresión de WT1 en diferentes estadios de cáncer pulmonar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arellano-Rodriguez, M., Zapata-Benavides, P., Arellano-Rodriguez, N. C., Izaguirre-Alvarez, J. M., Franco-Molina, M. A., Del Muro, F. D. J. T., & Rodriguez-Padilla, C. **2021**. The inflammatory process modulates the expression and localization of WT1 in podocytes leading to kidney damage. *in vivo*. 35(6), 3137-3146.
- Batchu, R. B., Gruzdyn, O. V., Kolli, B. K. **2021**. IL-10 signaling in the tumor microenvironment of ovarian cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 51-65.
- Bethune, G., Bethune, D., Ridgway, N., & Xu, Z. **2010**. Epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung cancer: an overview and update. *Journal of thoracic disease*. 2(1), 48.
- Borrello, M. G., Degl'Innocenti, D., & Pierotti, M. A. **2008**. Inflammation and cancer: the oncogene-driven connection. *Cancer letters*. 267(2), 262-270.
- Caisová, V., Vieru, A., Kumžáková, Z., Glaserová, S., Husníková, H., Vácová, N., & Ženka, J. **2016**. Innate immunity based cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *BMC cancer*. 16, 1-11.
- Carus, A., Ladekarl, M., Hager, H., Pilegaard, H., Nielsen, P. S., & Donskov, F. **2013**. Tumor-associated neutrophils and macrophages in non-small cell lung cancer: no immediate impact on patient outcome. *Lung Cancer*. 81(1), 130-137.
- Chang, J., & Zhang, W. **2022**. Remifentanyl modulates the TLR4-mediated MMP-9/TIMP1 balance and NF- κ B/STAT3 signaling in LPS-induced A549 cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 25(2), 79.
- Chen, B., Hu, B., Li, W., & Xue, J. **2015**. Transformation from NSCLC to SCLC: when did it happen?. *The Lancet Oncology*. 16(7), e309.
- Chen, X., Lin, S., Lin, Y., **2022**. BRAF-activated WT1 contributes to cancer growth and regulates autophagy and apoptosis in papillary thyroid carcinoma. *J. Transl. Med.* 20(1): 79.

Chevallier, M., Borgeaud, M., Addeo, A., & Friedlaender, A. **2021**. Oncogenic driver mutations in non-small cell lung cancer: Past, present, and future. *World Journal of Clinical Oncology*. 12(4), 217.

Cho, W. C., Kwan, C. K., Yau, S., So, P. P., Poon, P. C., & Au, J. S. **2011**. The role of inflammation in the pathogenesis of lung cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*. 15(9), 1127-1137.

Collins, B. J., Kleeberger, W., & Ball, D. W. **2004**. Notch in lung development and lung cancer. *In Seminars in cancer biology*. (Vol. 14, No. 5, pp. 357-364). Academic Press.

Conway, E. M., Pikor, L. A., Kung, S. H., Hamilton, M. J., Lam, S., Lam, W. L., & Bennewith, K. L. **2016**. Macrophages, inflammation, and lung cancer. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 193(2), 116-130.

Dao, T., Yan, S., Veomett, N., Pankov, D., Zhou, L., Korontsvit, T. & Scheinberg, D. A. **2013**. Targeting the intracellular WT1 oncogene product with a therapeutic human antibody. *Science translational medicine*. 5(176), 176ra33-176ra33.

Das, C., Mukhopadhyay, M., Maity, N., Parvin, T., Mukhopadhyay, B., & Mukhopadhyay, B. **2022**. Spectrum of pediatric kidney tumours with special references to WT1 immunostain at a tertiary care hospital. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 18(1), 209-213.

Dinakar, Y. H., Kumar, H., Mudavath, S. L., Jain, R., Ajmeer, R., & Jain, V. **2022**. Role of STAT3 in the initiation, progression, proliferation and metastasis of breast cancer and strategies to deliver JAK and STAT3 inhibitors. *Life Sciences*. 309, 120996.

Dohi, S., Ohno, S., Ohno, Y., **2010**. WT1 expression correlates with angiogenesis in endometrial cancer tissue. *Anticancer Res*. 30(8): 3187-3192.

Donnelly, R. P., Freeman, S. L., & Hayes, M. P. **1995**. Inhibition of IL-10 expression by IFN-gamma up-regulates transcription of TNF-alpha in human monocytes. *J. Immunol*. 155(3): 1420-1427.

Fan, C. S., Chen, C. C., Chen, L. L., **2022**. Extracellular HSP90 α Induces MyD88-IRAK Complex-Associated IKK α/β - NF- κ B/IRF3 and JAK2/TYK2- STAT-3 Signaling in Macrophages for Tumor-Promoting M2-Polarization. *Cells*. 11(2): 229.

Fang, D., & Zhu, J. **2020**. Molecular switches for regulating the differentiation of inflammatory and IL-10-producing anti-inflammatory T-helper cells. *Cell. Mol. Life. Sci.* 77(2): 289-303.

Fraizer, G. C., Eisermann, K., Pandey, S., **2016**. Functional role of WT1 in prostate cancer. *Exon Publications*. 235-259.

Ganti, A. K., Klein, A. B., Cotarla, I., Seal, B., & Chou, E. **2021**. Update of incidence, prevalence, survival, and initial treatment in patients with non-small cell lung cancer in the US. *JAMA oncology*. 7(12), 1824-1832.

Garinet, S., Wang, P., Mansuet-Lupo, A., Fournel, L., Wislez, M., & Blons, H. **2022**. Updated prognostic factors in localized NSCLC. *Cancers*. 14(6), 1400.

Gessler, M., König, A., & Bruns, G. A. P. **1992**. The genomic organization and expression of the WT1 gene. *Genomics*. 12(4), 807-813.

Gomes, M., Teixeira, A. L., Coelho, A., Araujo, A., & Medeiros, R. **2014**. The role of inflammation in lung cancer. *Inflammation and cancer*. 1-23.

Graidist, P., Nawakhanitworakul, R., Saekoo, J., Dechsukhum, C., & Fujise, K. **2010**. Anti-apoptotic function of T-KTS⁺, T-KTS⁻, WT1^{+/+} and WT1^{+/-}-isoforms in breast cancer. *Asian Biomed*. 4, 711-720.

Gritsko, T., Williams, A., Turkson, J., Kaneko, S., Bowman, T., Huang, M. & Jove, R. **2006**. Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clinical cancer research*. 12(1), 11-19.

Hanson, J., Gorman, J., Reese, J., & Fraizer, G. **2007**. Regulation of vascular endothelial growth factor, VEGF, gene promoter by the tumor suppressor, WT1. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 12, 2279.

- Hatanaka, H., Abe, Y., Kamiya, T., Morino, F., Nagata, J., Tokunaga, T. & Ueyama, Y. **2000**. Clinical implications of interleukin (IL)-10 induced by non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*. 11(7), 815-819.
- Ito, K., Oji, Y., Tatsumi, N., Shimizu, S., Kanai, Y., Nakazawa, T. & Sugiyama, H. **2006**. Antiapoptotic function of 17AA (+) WT1 (Wilms' tumor gene) isoforms on the intrinsic apoptosis pathway. *Oncogene*. 25(30), 4217-4229.
- Jang, D. I., Lee, A. H., Shin, H. Y., **2021**. The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* 22(5): 2719.
- Kafo, A. S. K., Elsalami, R. M., & Hassan, M. **2024**. *Mitragyna speciosa* Korth. downregulates macrophage inflammatory responses by inhibiting TLR-4 and increasing IL-10 production. *Istanbul Journal of Pharmacy*. 54(3), 350-358.
- Karakas, T., Miething, C. C., Maurer, U., **2002**. The coexpression of the apoptosis-related genes bcl-2 and wt1 in predicting survival in adult acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 16(5): 846-854.
- Kaye, F. J. **2002**. RB and cyclin dependent kinase pathways: defining a distinction between RB and p16 loss in lung cancer. *Oncogene*. 21(45), 6908-6914.
- Krug, L. M., Dao, T., Brown, A. B., Maslak, P., Travis, W., Bekele, S. & Scheinberg, D. A. **2010**. WT1 peptide vaccinations induce CD4 and CD8 T cell immune responses in patients with mesothelioma and non-small cell lung cancer. *Cancer immunology. immunotherapy*, 59, 1467-1479.
- Lafuente-Sanchis, A., Zúñiga, Á., Estors, M., Martínez-Hernández, N. J., Cremades, A., Cuenca, M., & Galbis, J. M. **2017**. Association of PD-1, PD-L1, and CTLA-4 gene expression and clinicopathologic characteristics in patients with non-small-cell lung cancer. *Clinical lung cancer*. 18(2), e109-e116.
- Larsson, S. H., Charlier, J. P., Miyagawa, K., Engelkamp, D., Rassoulzadegan, M., Ross, A., & Hastie, N. D. **1995**. Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell*. 81(3), 391-401.

Li, D., Xu, X., Liu, J., Liang, D., Shi, J., Li, S. & He, Y. **2020**. Small cell lung cancer (SCLC) incidence and trends vary by gender, geography, age, and subcategory based on population and hospital cancer registries in Hebei, China (2008–2017). *Thoracic cancer*. 11(8), 2087-2093.

Li, L., Yu, R., Cai, T., **2020**. Effects of immune cells and cytokines on inflammation and immunosuppression in the tumor microenvironment. *Int. Immunopharmacol.* 88: 106939.

Li, Q., Anderson, C. D., & Egilmez, N. K. **2018**. Inhaled IL-10 suppresses lung tumorigenesis via abrogation of inflammatory macrophage–th17 cell axis. *The Journal of Immunology*. 201(9), 2842-2850.

Liang, J., Liu, X., Bi, Z., Yin, B., Xiao, J., Liu, H., & Li, Y. **2013**. Relationship between gene polymorphisms of two cytokine genes (TNF- α and IL-6) and occurring of lung cancers in the ethnic group Han of China. *Molecular biology reports*. 40, 1541-1546.

Lee, G., Walser, T. C., & Dubinett, S. M. **2009**. Chronic inflammation, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer. *Current opinion in pulmonary medicine*. 15(4), 303-307.

López-Bojórquez, L. N., Arechavaleta-Velasco, F., Vadillo-Ortega, F., Montes-Sanchez, D., Ventura-Gallegos, J. L., & Zentella-Dehesa, A. **2004**. NF- κ B translocation and endothelial cell activation is potentiated by macrophage-released signals co-secreted with TNF- α and IL-1 β . *Inflammation Research*. 53, 567-575.

Marrocco, A., & Ortiz, L. A. **2022**. Role of metabolic reprogramming in pro-inflammatory cytokine secretion from LPS or silica-activated macrophages. *Frontiers in immunology*. 13, 936167.

Mayo, M. W., Wang, C. Y., Drouin, S. S., Madrid, L. V., Marshall, A. F., Reed, J. C. & Baldwin, A. S. **1999**. WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene. *The EMBO journal*. 43, 435-452.

Miranda, A., Hamilton, P. T., Zhang, A. W., Pattnaik, S., Becht, E., Mezheyski, A. & Nelson, B. H. **2019**. Cancer stemness, intratumoral heterogeneity, and immune response across cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 116(18), 9020-9029.

Mirlekar, B. **2022**. Tumor promoting roles of IL-10, TGF- β , IL-4, and IL-35: Its implications in cancer immunotherapy. *SAGE open medicine*. 10, 20503121211069012.

Mirlekar, B., & Pylayeva-Gupta, Y. **2021**. IL-12 family cytokines in cancer and immunotherapy. *Cancers*. 13(2): 167.

Mittal, V., El Rayes, T., Narula, N., McGraw, T. E., Altorki, N. K., & Barcellos-Hoff, M. H. **2016**. The microenvironment of lung cancer and therapeutic implications. *Lung cancer and personalized medicine: novel therapies and clinical management*. 75-110.

Naldini, A., & Carraro, F. **2005**. Role of inflammatory mediators in angiogenesis. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*. 4(1), 3-8.

Nishida, N. **2021**. Role of oncogenic pathways on the cancer immunosuppressive microenvironment and its clinical implications in hepatocellular carcinoma. *Cancers*. 13(15): 3666.

Oka, Y., Tsuboi, A., Oji, Y., Kawase, I., & Sugiyama, H. **2008**. WT1 peptide vaccine for the treatment of cancer. *Current opinion in immunology*. 20(2), 211-220.

Oka, Y., Tsuboi, A., Taguchi, T., Osaki, T., Kyo, T., Nakajima, H. & Sugiyama, H. **2004**. Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101(38), 13885-13890.

Oji, Y., Miyoshi, S., Maeda, H., Hayashi, S., Tamaki, H., Nakatsuka, S. I. & Sugiyama, H. **2002**. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. *International Journal of Cancer*. 100(3), 297-303.

Olona, A., Hateley, C., Muralidharan, S., Wenk, M. R., Torta, F., & Behmoaras, J. **2021**. Sphingolipid metabolism during Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated macrophage activation. *British journal of pharmacology*. 178(23), 4575-4587.

Ortiz, M. L., Lu, L., Ramachandran, I., & Gabrilovich, D. I. **2014**. Myeloid-derived suppressor cells in the development of lung cancer. *Cancer immunology research*. 2(1), 50-58.

- Purohit, M., Gupta, G., Afzal, O., Altamimi, A. S. A., Alzarea, S. I., Kazmi, I. & Dua, K. **2023**. Janus kinase/signal transducers and activator of transcription (JAK/STAT) and its role in Lung inflammatory disease. *Chemico-biological interactions*. 371, 110334.
- Raso, M. G., Bota-Rabassedas, N., & Wistuba, I. I. **2021**. Pathology and classification of SCLC. *Cancers*. 13(4), 820.
- Riely, G. J., Marks, J., & Pao, W. **2009**. KRAS mutations in non–small cell lung cancer. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 6(2), 201-205.
- Riley, J. K., Takeda, K., Akira, S., & Schreiber, R. D. **1999**. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway: requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *Journal of Biological Chemistry*. 274(23), 16513-16521.
- Rosenfeld, C., Cheever, M. A., & Gaiger, A. **2003**. WT1 in acute leukemia, chronic myelogenous leukemia, and myelodysplastic syndrome: therapeutic potential of WT1 targeted therapies. *Leukemia*. (08876924), 17(7).
- Royer-Pokora, B., Busch, M., Beier, M., Duhme, C., de Torres, C., Mora, J. & Royer, H. D. **2010**. Wilms tumor cells with WT1 mutations have characteristic features of mesenchymal stem cells and express molecular markers of paraxial mesoderm. *Human molecular genetics*. 19(9), 1651-1668.
- Sarode, P., Schaefer, M. B., Grimminger, F., Seeger, W., & Savai, R. **2020**. Macrophage and tumor cell cross-talk is fundamental for lung tumor progression: we need to talk. *Frontiers in oncology*. 10, 324.
- Sciesielski, L. K., Kirschner, K. M., Scholz, H., & Persson, A. B. **2010**. Wilms' tumor protein Wt1 regulates the Interleukin-10 (IL-10) gene. *FEBS letters*. 584(22), 4665-4671.
- Shames, D. S., & Wistuba, I. I. **2014**. The evolving genomic classification of lung cancer. *The Journal of pathology*. 232(2), 121-133.
- Steven, A., Fisher, S. A., & Robinson, B. W. **2016**. Immunotherapy for lung cancer. *Respirology*. 21(5), 821-833.

- Tang, S., Li, X., Wu, X., & Gong, Y. **2022**. WT1 suppresses follicle-stimulating hormone-induced progesterone secretion by regulating ERK1/2 pathway in chicken preovulatory granulosa cells. *Gene*. 812, 146097.
- Tao, M. H. **2019**. Epidemiology of lung cancer. *Lung Cancer and Imaging*. 4-1.
- Tauriello, D. V., Sancho, E., & Batlle, E. **2022**. Overcoming TGF β -mediated immune evasion in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 22(1): 25-44.
- Sharma, A., Merritt, E., Hu, X., Cruz, A., Jiang, C., Sarkodie, H. & De, S. **2019**. Non-genetic intra-tumor heterogeneity is a major predictor of phenotypic heterogeneity and ongoing evolutionary dynamics in lung tumors. *Cell reports*. 29(8), 2164-2174.
- Tsuboi, A., Oka, Y., Osaki, T., Kumagai, T., Tachibana, I., Hayashi, S. & Sugiyama, H. **2004**. WT1 peptide-based immunotherapy for patients with lung cancer: report of two cases. *Microbiology and immunology*. 48(3), 175-184.
- Vahl, J. M., Friedrich, J., Mittler, S., Trump, S., Heim, L., Kachler, K. & Finotto, S. **2017**. Interleukin-10-regulated tumour tolerance in non-small cell lung cancer. *British journal of cancer*. 117(11), 1644-1655.
- Viktorsson, K., De Petris, L., & Lewensohn, R. **2005**. The role of p53 in treatment responses of lung cancer. *Biochemical and biophysical research communications*. 331(3), 868-880.
- Wang, R., Lu, M., Chen, H., Chen, S., Luo, X., Qin, Y., & Zhang, J. **2011**. Increased IL-10 mRNA expression in tumor-associated macrophage correlated with late stage of lung cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 30, 1-9.
- Wang, R., Zhang, J., Chen, S., Lu, M., Luo, X., Yao, S. & Chen, H. **2011**. Tumor-associated macrophages provide a suitable microenvironment for non-small lung cancer invasion and progression. *Lung cancer*. 74(2), 188-196.
- Wang, X., Zhao, J., Zhang, Y., **2023**. Molecular mechanism of Wilms' tumor (Wt1)(+/-KTS) variants promoting proliferation and migration of ovarian epithelial cells by bioinformatics analysis. *J. Ovarian. Res*. 16(1): 46.

World Health Organization. **2020**. GLOBOCAN. *IARC*. New Global Cancer Data. Accessed on 17 July 2024.

Yang, L., Han, Y., Saurez Saiz, F., & Minden, M. **2007**. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia*. 21(5), 868-876.

Zajac-Kaye, M. **2001**. Myc oncogene: a key component in cell cycle regulation and its implication for lung cancer. *Lung cancer*. 34, S43-S46.

Zamora-Avila, D. E., Zapata-Benavides, P., Franco-Molina, M. A., Saavedra-Alonso, S., Trejo-Avila, L. M., Resendez-Perez, D. & Rodriguez-Padilla, C. **2009**. WT1 gene silencing by aerosol delivery of PEI–RNAi complexes inhibits B16-F10 lung metastases growth. *Cancer gene therapy*. 16(12), 892-899.

Zhang, L., Zhao, S., & Wang, Y. **2024**. Diannexin alleviates myocardial ischemia–reperfusion injury by orchestrating cardiomyocyte oxidative damage, macrophage polarization and fibrotic process by TLR4-NF- κ B-mediated inactivation of NLRP3 inflammasome. *International Immunopharmacology*. 130, 111668.

RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Juan Manuel Izaguirre Alvarez

Candidato para el grado de: Doctorado en Ciencias con Orientación en Inmunobiología.

Tesis: “Efecto de citocinas proinflamatorias sobre WT1 y sus implicaciones en la IL-10 en cáncer pulmonar”.

Campo de Estudio: Ciencias Biológicas.

Datos Personales: Nacido en El Mante, Tamaulipas el 24 de Febrero de 1995, hijo de Juan Manuel Izaguirre Hernández y Enriqueta Araceli Álvarez Martínez.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciado en Biotecnología Genómica en 2018 y Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunobiología en 2020.

Experiencia Profesional:

- Catedrático en la Facultad de Ciencias Biológicas desde agosto del 2022 de las asignaturas de:
 - Virología Molecular.
 - Virología Clínica.
 - Virología Médica.
 - Diagnóstico Molecular.
- Asistente de investigación en la Unidad de Biología Molecular del Cáncer del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas desde 2015.

Participación en artículos de investigación:

- Arellano-Rodríguez, N. C., Alvarez-Quezada, O. A., Benavides, P. Z., Vargas-Alanís, G., Franco-Molina, M., Zamora-Ávila, D., Arellano-Rodríguez, M., Saavedra-Alonso, S., **Izaguirre-Alvarez, J. M.**, & Rodríguez-Padilla, C. 2022. Curcumin sensitizes 4T1 murine breast cancer cells to cisplatin through PAR4 secretion. *in vivo*. 36: 2767-2773.
- Arellano-Rodríguez, M., Zapata-Benavides, P., Arellano-Rodríguez, N. C., **Izaguirre-Alvarez, J. M.**, Franco-Molina, M. A., Del Muro, F. D. J. T., & Rodríguez-Padilla, C. (2021). The inflammatory process modulates the expression and localization of WT1 in podocytes leading to kidney damage. *in vivo*, 35(6), 3137-3146.

Participación en congresos:

- IX SIMPOSIO NACIONAL DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOMEDICINA. Octubre del 2024. Modalidad cartel.
- IV SIMPOSIO NACIONAL DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS. Septiembre del 2018. Modalidad cartel.