



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

PERFILES DE EXPRESIÓN DE
CÉLULAS INMUNES INFILTRADAS EN
GLIOBLASTOMA MULTIFORME:
¿FIRMA MOLECULAR O CELULAR?

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN INMUNOLOGÍA

JENNY KATHERINE BONIFACIO
MUNDACA

LIMA – PERÚ

2023

ASESOR

PHD. STÉPHANE BERTANI

CO-ASESOR

MG. JUAN JOSÉ CONTRERAS MANCILLA

JURADO DE TESIS

DR. MIRKO JUAN ZIMIC PERALTA

PRESIDENTE

DR. IVAN KARLOS BEST CUBA

VOCAL

MG. CESAR ANTONIO LOZA MUNARRIZ

SECRETARIO

DEDICATORIA

A mis padres, por su apoyo y confianza en cada decisión de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser mi fortaleza y mi paz.

A mi asesor, Stéphane, por sus innumerables consejos y su apoyo constante.

A Juan José Contreras, por apoyarme durante el trayecto de esta investigación.

A Ernesto, por alentarme día a día a continuar en este mundo apasionante de la
investigación.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

Tesis Autofinanciada

PERFILES DE EXPRESIÓN DE CÉLULAS INMUNES INFILTRADAS EN GLIOBLASTOMA MULTIFORME: ¿FIRMA MOLECULAR O CELULAR?

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	www.wjgnet.com Fuente de Internet	2%
2	es.biomedicalhouse.com Fuente de Internet	1%
3	pubmed.ncbi.nlm.nih.gov Fuente de Internet	1%
4	Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia Trabajo del estudiante	1%
5	zagan.unizar.es Fuente de Internet	1%
6	repositorio.upch.edu.pe Fuente de Internet	1%
7	patents.google.com Fuente de Internet	1%
8	repositorio.upao.edu.pe Fuente de Internet	<1%

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	10
II.	OBJETIVOS	14
	Objetivo general	14
	Objetivos específicos	14
III.	METODOLOGÍA.....	15
	(según objetivos específicos respectivamente)	15
	1. Diseño de estudio	15
	• Revisión sistemática cualitativa	15
	Búsqueda bibliográfica de artículos científicos seleccionados a partir los criterios de inclusión, sin análisis estadístico.....	15
	• Metaanálisis.....	15
	2. Población u objeto de estudio	15
	3. Procedimiento y técnicas.....	15
	4. Plan de análisis estadístico	20
	5. Consideraciones éticas	21
IV.	RESULTADOS	22
	1. Revisión sistemática.....	22
	a) Perfil de expresión de células inmunes infiltrantes: Firma molecular	25
	b) Perfil de expresión de células inmunes infiltrantes: Firma celular.....	32
	i. Infiltración de células inmunológicas y los subtipos de GBM.....	34
	ii. Infiltración de células inmunológicas y PDL-1.....	36
V.	DISCUSIÓN	40
VI.	LIMITACIONES DEL ESTUDIO	44
VII.	CONCLUSIONES	45
IX.	RECOMENDACIONES	47
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

RESUMEN

El glioblastoma multiforme es un tipo de glioma agresivo de grado IV, por lo cual, debido a su heterogeneidad molecular, celular, y de microambiente tumoral, es difícil de identificar dianas terapéuticas. Con el avance de las ciencias ómicas en estos últimos 10 años, se han asociado diversos perfiles de expresión genética relacionados a la inmunidad para determinar pronóstico, terapias basadas en los puntos de control inmunológico y agresividad del tumor, estableciendo firmas moleculares y celulares de células inmunes infiltrantes asociados a la supervivencia general. Sin embargo, no ha quedado claro la importancia de cada firma como biomarcador pronóstico por lo que es necesario hacer un estudio de profundidad. De esta manera, el objetivo principal del presente estudio fue describir e identificar las firmas moleculares y/o celulares pertenecientes a las células inmunes infiltradas en glioblastoma multiforme a partir de una revisión de la literatura mediante búsquedas en las bases de datos en línea como Dialnet, Scielo, APA PsycArticles, Scopus, Web of Science, PubMed, Redalyc y Elsevier. Asimismo, se realizó un análisis bioinformático para obtener estimaciones poblacionales de células inmunes infiltrantes, mediante CIBERSORT y se comparó con las firmas descritas en la literatura.

Finalmente se describió y amplió la importancia en el ámbito pronóstico y terapéutico, precisando que las firmas moleculares son base complementaria para el desarrollo de las firmas celulares, por lo que en conjunto ambas proporcionan información valiosa para el paciente.

Palabras claves: expresión genética, firma molecular, firma celular, células inmunes infiltrantes, glioblastoma multiforme.

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme is a type of aggressive grade IV glioma, therefore, due to its molecular, cellular, and tumor microenvironment heterogeneity, it is difficult to identify therapeutic targets. With the advancement of Omic sciences in the last 10 years, various gene expression profiles related to immunity have been associated to determine prognosis, therapies based on immune checkpoints and tumor aggressiveness, establishing molecular and cellular signatures of immune cells infiltrators associated with overall survival. However, the importance of each signature as a prognostic biomarker has not been clear, so it is necessary to carry out an in-depth study. In this way, the main objective of the present study was to describe and identify the molecular and/or cellular signatures belonging to the infiltrated immune cells in glioblastoma multiforme from a review of the literature through searches in online databases such as Dialnet, Scielo, APA PsycArticles, Scopus, Web of Science, PubMed, Redalyc, and Elsevier. Likewise, a bioinformatic analysis was performed to obtain population estimates of infiltrating immune cells using CIBERSORT and compared with the signatures described in the literature.

Finally, the importance in the prognostic and therapeutic field was described and expanded, specifying that molecular signatures are a complementary basis for the development of cellular signatures, so that together both provide valuable information for the patient.

Keywords: gene expression, molecular signature, cellular signature, infiltrating immune cells, glioblastoma multiforme.

I. INTRODUCCIÓN

El glioblastoma multiforme (GBM), es la neoplasia maligna más común que afecta al cerebro humano. Está clasificado como un glioma difuso de grado IV con una alta heterogeneidad celular y genética (1). Aunque se han incorporado a la práctica clínica diferentes estrategias de tratamientos avanzados, especialmente la resección quirúrgica, seguida de radioterapia y quimioterapia, la mediana de supervivencia de los pacientes es menor a 18 meses (2–4).

Los glioblastomas (GB) se clasifican en dos subtipos morfológicamente idénticos: primarios (GB1) y secundarios (GB2). La gran mayoría de los casos de GB son GB1, que suelen desarrollarse sin lesiones preexistentes, se manifiestan típicamente en pacientes de edad avanzada (promedio de 60 años) y tienen un curso breve debido al rápido desarrollo del tumor, como es el caso del GBM. Por otro lado, los GB2 representan menos del 10% de los GB, se desarrollan a partir de astrocitomas de bajo grado (astrocitoma difuso o anaplásico) y afectan sobre todo a personas jóvenes; en quienes, como consecuencia de la aparición más temprana y el rápido crecimiento tumoral, la tasa media de supervivencia es mayor y la enfermedad tarda más en progresar(1,5). No obstante, una tercera categoría incluye los tumores de glioblastoma que no pueden evaluarse completamente por la enzima isocitrato deshidrogenasa NADPH dependiente (IDH), por lo que se da un diagnóstico de “no especificado de otra manera (NOS)”(6).

Consecuentemente, el descubrimiento del sistema linfático en el sistema nervioso central ha despertado inspiración para proporcionar una base teórica novedosa y nuevas perspectivas para la inmunoterapia en tumores cerebrales, y la literatura previa ha demostrado las interacciones mutuas entre los gliomas y el sistema

inmunitario. Sin embargo, se conoce también que el microambiente inmunológico único, debido a la expresión de citocinas inmunosupresoras, como PD-1, TGF- β e IL-10, y la falta de células presentadoras de antígenos (CPA) en el SNC, presentan obstáculos para la eficacia de nuevas terapias (7).

Sin embargo, a pesar que la escasez de células T en el microambiente del glioma, “tumor frío”, algunos estudios han sugerido que las células mieloides asociadas al glioma (células inmunosupresoras con un fenotipo similar al macrófago tipo M2) podrían provocar una respuesta inmune frente al tumor mediadas por células dendríticas periféricas (CD) (8).

Con la finalidad de aumentar la sobrevivencia de los pacientes con GBM y con la llegada de técnicas moleculares para clasificar a los tumores de acuerdo a su expresión genética, los estudios de análisis genómico y transcriptómica de tumores en cerebro, han permitido enfoques terapéuticos personalizados, dando paso a la identificación de diversas firmas moleculares para diagnóstico y pronóstico (1,9).

Las firmas moleculares están basadas en la transcripción del código genético escrito en el ADN, desarrolladas por tecnologías como microarrays, secuenciamiento del ARN, Next Generation Sequencing e incluso algunas más precisas como Single-Cell Sequencing; quienes almacenan la información transcriptómica en repositorios virtuales como Gene Expression Omnibus (GEO) del National Center for Biotechnology Information (NCBI), The Cancer Genome Atlas Program (TCGA), entre otras. Las firmas moleculares en cáncer no se han limitado a la pesquisa de células tumorales, también han inferido marcas genéticas en células inmunes infiltrantes de tumores abriendo camino hacia enfoques terapéuticos inmunológicos

más precisos debido al conocimiento de los genes relacionados con la inmunidad (GRI) involucrados en el desarrollo del tumor (10).

Es el caso de un estudio en cáncer de estómago en el que se identificó una firma molecular derivada del microambiente inmunológico basado en la expresión genética de 27 genes específicos para evaluar la eficacia de inhibidores de puntos de control inmunitarios (ICI, por sus siglas en inglés) obtenidas del repositorio virtual GEO, avalando que la supervivencia de los pacientes enrolados se debía al alto contenido inmunológico en el microambiente tumoral (11).

Asimismo, en un estudio similar en cáncer de mama, se describió 146 tipos de células inmunitarias infiltrantes obtenidas de TCGA, GEO y METABRIC (Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium), el perfil de expresión de las células inmunes les sirvió para inferir una firma inmunológica la cual compararon con la supervivencia general de los pacientes, concluyendo que entre ambas había asociación significativa. Del mismo modo, varias investigaciones han descubierto que las nuevas huellas moleculares de las células inmunitarias que infiltran los tumores podrían predecir su agresividad o encontrar nuevas dianas inmunológicas terapéuticas (12).

En el estudio de Hu y col. descargaron perfiles de expresión genética de pacientes con GBM de los repositorios GEO, TCGA e Import para encontrar genes expresados diferencialmente (DEG, por sus siglas en inglés) relacionados con la inmunidad. Mediante pruebas de suma de rangos de Wilcoxon, hallaron una firma molecular de 7 genes y la asociaron con la supervivencia (13).

Por último, Yin y col. obtuvieron una firma molecular de 5 genes relacionados con el sistema inmunitario mediante un análisis ponderado de redes de coexpresión genética y la evaluaron con la herramienta Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) para determinar el pronóstico de la enfermedad (14). Sin embargo, no solo se ha planteado perfil de expresión molecular sino también la identificación de una firma basada en subpoblaciones de células inmunitarias infiltradas en el tumor, como pronóstico de supervivencia de pacientes con GBM especialmente en la transformación maligna del glioma de bajo grado al glioma de alto grado (15).

Continuando con la línea de trabajo de identificación de biomarcadores de pronóstico, se decidió realizar una revisión sistemática completa enfocada en la identificación de firmas moleculares y firmas celulares basadas en la expresión de genes diferenciales de células inmunes infiltradas en tumor de glioblastoma multiforme. Asimismo, con la finalidad de reproducir la estimación poblacional y la significancia estadística entre grupos de tumor y control, se realizó un metaanálisis de estudios transcriptómicos.

II. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Describir e identificar firmas moleculares y/o celulares pertenecientes a las células inmunes infiltradas en glioblastoma multiforme.

Objetivos específicos:

- Identificar la relación de la firma molecular y/o celular con la sobrevida general de pacientes con glioblastoma obtenida por la literatura.
- Describir el perfil de células inmunes infiltrantes de glioblastoma a partir de un análisis de estudios transcriptómicos.

III. METODOLOGÍA

(según objetivos específicos respectivamente)

1. Diseño de estudio

- Revisión sistemática cualitativa

Búsqueda bibliográfica de artículos científicos seleccionados a partir los criterios de inclusión, sin análisis estadístico.

- Metaanálisis

Búsqueda de estudios de análisis transcriptómicos y análisis de datos.

2. Población u objeto de estudio

- Artículos científicos seleccionados a partir de las palabras clave: infiltración inmune, perfil de expresión genética, firma molecular, células inmunes y glioblastoma multiforme, mediante la búsqueda en base de datos en línea.
- Datos de expresión genética del glioblastoma multiforme de pacientes identificados en la base de datos pública del portal Gene Expression Omnibus del National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

3. Procedimiento y técnicas

3.1. Definiciones conceptuales

- Firma molecular

Expresión de un grupo específico de genes que se encuentran en una célula o tejido.

- Firma celular

Grupo de células específicas con similar perfil de expresión de genes asociados a la inmunidad.

3.2.Revisión sistemática

Los estudios científicos publicados en revistas médicas se identificaron mediante búsquedas bibliográficas en ocho bases de datos diferentes: Dialnet, Scielo, APA PsycArticles, Scopus, Web of Science, PubMed, Redalyc y Elsevier, (fecha de acceso en diciembre del 2021 y posteriores actualizaciones). Los términos de búsqueda fueron en inglés y español con las siguientes combinaciones: “expresión genética” y “firma molecular”, combinados con “glioblastoma multiforme” y “células inmunes infiltradas”. Asimismo, “expresión genética”, “firma celular”. combinados con “glioblastoma multiforme”, “células inmunes infiltradas” e “inmunoterapia”. El límite especificado fue una fecha de publicación no anterior al 2019. Sin embargo, se seleccionó una publicación del 2011 por ser un artículo pionero en el tema. Finalmente, se realizaron búsquedas en páginas web para identificar estudios potenciales que no se habían publicado en revistas médicas pero que se habían revisado en Internet (Fig. 1).

La estrategia de búsqueda se basó en los operadores booleanos (AND, OR & NOT), consistiendo en combinar las palabras claves en la pesquisa relacionadas con el objetivo general.

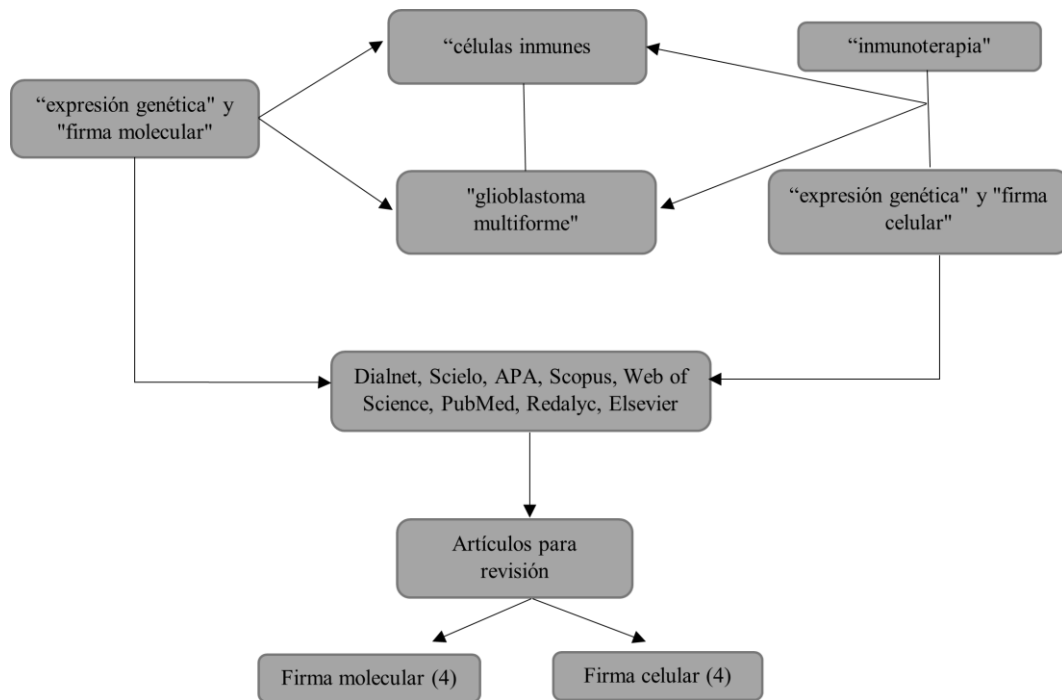


Figura 1. Representación esquemática de la conjugación de palabras clave para la búsqueda de artículos de revisión.

3.3. Metaanálisis

Asimismo, para describir a nivel global el perfil de células inmunes infiltrantes de GBM y compararlos con el análisis de los artículos revisados, se colectó datos de expresión genética del repositorio virtual *GEO*. Se inició la búsqueda con la palabra clave *Glioblastoma* y se seleccionó el tipo de organismo a partir de la palabra clave *Homo sapiens*. Para los datos de perfil de expresión genética se seleccionó el tipo de tecnología en la que fue desarrollada a partir de la palabra clave *Expression profiling by array*. Finalmente, se seleccionó los perfiles de expresión genética desarrollados en la plataforma Affymetrix, GeneChip® Human Genome U133 2.0 Arrays. Se seleccionó estudios de un solo país (Estados Unidos, USA). Finalmente, se recolectó el perfil de expresión genética de tejido cerebral normal de aquellos estudios seleccionados, como control de la expresión genética.

- Control de Calidad y Análisis de datos

El análisis del GeneChip U-133 se realizó utilizando el software R. La fluorescencia obtenida fue normalizada con sondas internas de control, mediante el algoritmo Robust Multichip Average (RMA), que consta de tres pasos: Corrección de fondo, normalización y sumarización. - La corrección de fondo está basada en el cambio de un nucleótido, es decir, por cada sonda con la secuencia deseada, de 25 nucleótidos normalmente (PM, secuencia perfecta), se coloca también una sonda con esa misma secuencia, pero con el nucleótido 13 cambiado al complementario (MM, secuencia cambiada), de tal manera que se identifique la hibridación no específica. - La normalización para datos no paramétricos, empleó genes

housekeeping que tienen una intensidad constante independientemente de las condiciones experimentales, se realiza dividiendo todas las intensidades del chip entre la expresión media de los genes housekeeping: GAPDH, beta-Actin, ISGF-3 (STAT1). La sumarización, es el proceso por el que se determinó la intensidad del transcrito a partir de la intensidad de las sondas, se realizados mediante el cálculo de medias mediante Median Polish.

Finalmente, se realizó la corrección por lote de muestra con el algoritmo de ComBat (paquete sva R), y luego los datos se colapsaron utilizando el algoritmo de collapse_genes-09 (Fred's Softwares).

Se aplicó un enfoque centrado en las vías metabólicas utilizando Sample Enrichment Score (SES) con cuatro bases de datos: KEGG, Reactome (reactome_2018803), Gene Ontology-Cellular Component (C5_CC) y MSigDB Hallmarks (H), de acuerdo con el flujo de trabajo recomendado por Fred's Softwares (prueba t de dos colas con valor $p < 1.7E-05$ como nivel de significación, y cambio, fold change, < 0.7 y > 1.5 veces como umbral). Los códigos fuente y las bases de datos de Fred's Software están disponibles en: <https://sites.google.com/site/fredsoftwares/products/databases>.

A partir de los resultados de Fred's Software, se analizaron los genes más relevantes para obtener las líneas celulares inmunológicas basadas en el algoritmo de CIBERSORT, de la cual se tomó las células inmunes basados en 7 subconjuntos de células inmunitarias (LM7). Finalmente, las células inmunológicas fueron analizadas mediante el software DeepTIL.

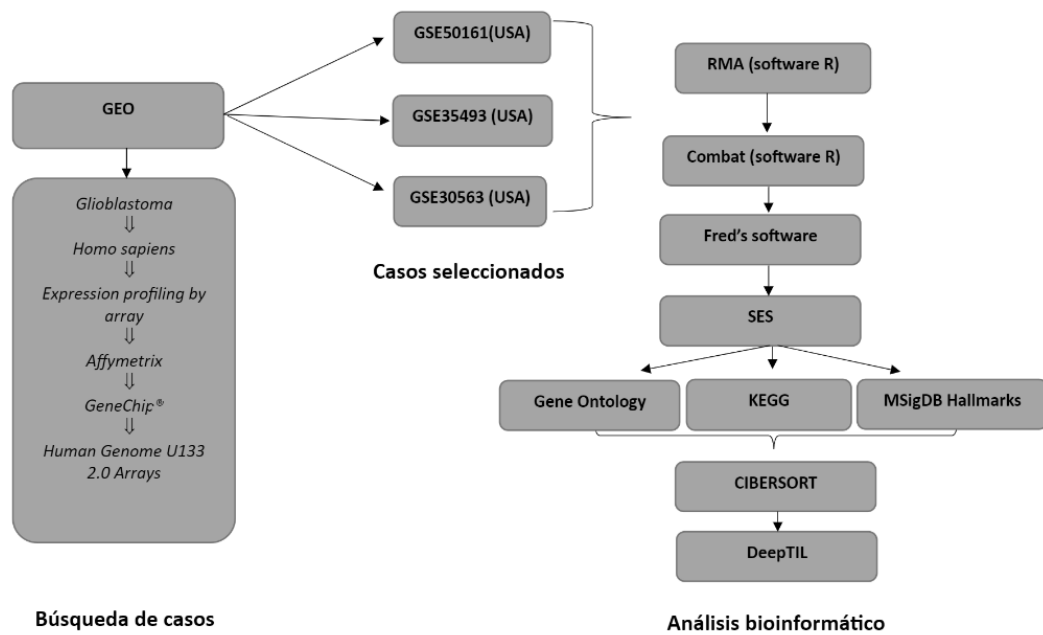


Figura 2. Flujo de trabajo del análisis de datos de casos seleccionados a partir de GEO. $n(\text{GBM})=47$, $n(\text{Control})=25$.

4. Plan de análisis estadístico

4.1.Revisión sistemática

Se seleccionó los artículos científicos basados en la búsqueda bibliográfica con las palabras clave perfil de expresión genética, firma molecular, células inmunes infiltradas y glioblastoma multiforme.

Se separó los artículos en dos partes: 1. Firma molecular: artículos científicos basados en el análisis de firmas moleculares determinadas por procedimientos bioinformáticos relacionados con la sobrevida del paciente con GBM; 2. Firma celular: artículos científicos basados en el análisis de firmas celulares inmunes determinadas por procedimiento de CIBERSORT relacionados a la sobrevida del paciente con GBM.

Se seleccionó los artículos y con ellos se realizó un análisis deductivo y lógico de cada uno exponiendo puntos remarcables de cada firma y relacionándolos a la sobrevivencia de los pacientes. Asimismo, se realizó un compendio de la información seleccionada y se expuso la opinión crítica para cada ítem. Se utilizó las figuras más representativas, acorde al objetivo, de cada artículo científico discutido, ello como ayuda visual para la interpretación.

Finalmente, se expuso las conclusiones respondiendo a los objetivos, basándonos en las firmas identificadas.

4.2. Metaanálisis de estudios transcriptómicos

Se seleccionó los estudios GSE50161, GSE35493, GSE30563, debido a que la población compartía el mismo origen demográfico: estadounidense (USA), y además incluía datos de controles perteneciente a tejido cerebral sin GBM (Fig.2).

Después del pretratamiento de los datos para realizar la deconvolución explicada en procedimiento y técnicas, y esquematizado en la Fig. 2, se unificó los 3 estudios seleccionados, y posteriormente se separó en dos grupos: grupo GBM (tejido tumoral, n=47) y grupo Control (Tejido cerebral sin GBM, n=25), para finalmente comparar las medias y estimar la significancia estadística mediante la prueba *t de student* en el programa de Stata/SE versión 18.0.

5. Consideraciones éticas

El trabajo de investigación, no contempló ningún procedimiento experimental, por lo que no requirió consentimiento informado de ningún participante. Asimismo, los artículos seleccionados y la recolección de la base de

datos de transcriptomas a partir del repositorio virtual GEO, no mostraron datos personales.

Además, se obtuvo la autorización y aprobación del Comité de Investigación y del Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

IV. RESULTADOS

1. Revisión sistemática

Se seleccionaron todos los estudios experimentales de los que fue posible extraer información sobre la metodología, las firmas moleculares basados en genes inmunes, firmas celulares basados en células inmunológicas y datos de asociación con la supervivencia general y el pronóstico de la enfermedad. Si bien algunas publicaciones proporcionaban importantes resultados sobre las características clínicas de la enfermedad, tratamientos innovadores con medicamentos no inmunológicos y vías de transcripción de genes no relacionados a la inmunidad, no se tomaron en consideración para el análisis puesto que estos datos excedían el objetivo propuesto.

Se unificó la información y se la dividió en dos tablas (Tabla 1 y Tabla 2). En las tablas se incluyó el título de la investigación, los autores, el año de publicación, los genes relacionados a la inmunidad (Tabla 1), las células inmunes (Tabla 2) y la cita bibliográfica. Asimismo, por cada artículo revisado se identificó genes relacionados a la supervivencia general distinguiéndolos como genes de buen pronóstico y mal pronóstico (Tabla 3).

Se identificaron 9 trabajos publicados entre 2019 al 2022, excepto un solo trabajo del 2011, que proporcionó información válida para la discusión posterior.

Tabla 1: Firma molecular: artículos científicos basados en el análisis de firmas moleculares determinadas por procedimientos bioinformáticos relacionados con la sobrevida del paciente con GBM

N°	Título del artículo científico	Autores	Año	doi	Genes inmunes	Cita bibliográfica
1	Expression Profile Analysis Identifies a Novel Seven Immune-Related Gene Signature to Improve Prognosis Prediction of Glioblastoma	Hu L, Cheng X, Wang S, Feng, Lin Z.	2021	10.3389/fgene.2021.638458	BMPR1A, CTSB, NFKBIZ, TNFSF14, CXCL2, SEMA4F, OSMR	13
2	Predictive Analyses of Prognostic-Related Immune Genes and Immune Infiltrates for Glioblastoma. Diagnostics	Liang P, Chai Y, Zhao H, Wang G	2020	10.3390/diagnostics10030177	CCL1, DEFA3, NOD2, LPA, FABP5, CHIT1, BMP1, TNFSF14, OSMR	16
3	Prognostic value and immune relevancy of a combined autophagy-, apoptosis- and necrosis-related gene signature in glioblastoma	Bi Y, Wu ZH, Cao F	2022	10.1186/s12885-022-09328-3	CCL2, LIF, FAS, IL1B, CXCL10, CCL20, TNFSF13, IL6, IL1R2, IL10RA e IL13RA, BMP2	17
4	Construction of an immune-related gene signature for the prognosis and diagnosis of glioblastoma multiforme	Yu Z, Yang H, Song K, Fu P, Shen J, Xu M, Xu H	2022	10.3389/fonc.2022.938679	PTX3, BMP2 y TNFSF9	18

Tabla 2: Firma celular: artículos científicos basados en el análisis de firmas celulares determinadas por procedimientos bioinformáticos relacionados con la sobrevida del paciente con GBM

N°	Título de artículo científico	Autores	Año	doi	Células inmunes	Cita bibliográfica
1	Identification of 3 subpopulations of tumor-infiltrating immune cells for malignant transformation of low-grade glioma	Lu J, Li H, Chen Z, Fan L, Feng S, Cai X	2019	10.1186/s12935-019-0972-1	M0 Linfocito CD4+ NK activado Monocito	15
2	Immune cell gene expression signatures in diffuse glioma are associated with IDH mutation status, patient outcome and malignant cell state, and highlight the importance of specific cell subsets in glioma biology	Mehani B, Asanigari S, Chung HJ, Dazelle K, Singh A, Hannenhalli S	2022	10.1186/s40478-022-01323-w	M0 M2 Monocito	19
3	Expression Profile Correlates with T-Cell Infiltration and Relative Survival in Glioblastoma Patients Vaccinated with Dendritic Cell Immunotherapy	Robert MP, Horacio S, Vera K, Sylvia KO, Ascia E, William HY	2011	10.1158/1078-0432.CCR-10-2563	Disminución de linfocitos infiltrantes de tumores	20
4	PD-L1-Mediated Immunosuppression in Glioblastoma Is Associated With the Infiltration and M2-Polarization of Tumor-Associated Macrophages	Zhu Z, Zhang H, Chen B, Liu X, Zhang S, Zong Z	2020	10.3389/fimmu.2020.588552	M2	21

a) Perfil de expresión de células inmunes infiltrantes: Firma molecular

Algunas investigaciones han construido modelos predictivos de GBM basados en genes relacionados con la inmunidad (IRG, por sus siglas en inglés); para ello, se requirió descubrir los genes clave involucrados y posteriormente vincularlos con los factores de transcripción de genes inmunológicos para de ese modo, producir modelos de pronóstico, análisis de supervivencia y curvas de riesgo.

En el primer estudio analizado (Tabla 1), los autores consiguen una firma molecular basada en siete genes inmunoenlazados, enfatizando que su importancia recae en la búsqueda de conexión entre la expresión genética y el pronóstico de GBM. Se realizó un análisis de DEG, utilizando el paquete limma del software R el cual permite identificar genes que se expresan significativamente diferente. Posteriormente, para poder determinar la firma molecular, se seleccionó mediante la regresión de Cox univariante y la regresión de LASSO a siete IRG: BMPR1A, CTSB, NFKBIZ, TNFSF14, CXCL2, SEMA4F, OSMR (Fig. 3), para dar una explicación general a la aparición y desarrollo de GBM, comprendiendo así, la relación con los puntos de control inmunitarios, la vía de la oncogénesis y al estudio de la sensibilidad a los fármacos, considerados limitantes en el pronóstico de GBM (13).

Los genes CTSB, NFKBIZ, TNFSF14, CXCL2, SEMA4F y OSMR se caracterizaron como genes de alto riesgo estimando un mal pronóstico, mientras que BMPR1A se identificó como un gen de bajo riesgo por lo que es considerado como factor protector.

Este estudio fue muy preciso en cuanto a la evaluación pronóstica, pues los investigadores agruparon a los pacientes de acuerdo a la puntuación de riesgo hallada y lo relacionaron con los factores clínicos. Asimismo, la puntuación de riesgo fue relacionada con los puntos de control inmunitarios centrales del GBM como CD28, TIM-3, B7-H3, PD-1, LAG3, B7-H4, CD40, y PD-L1, siendo estas 3 últimas vinculadas fuertemente a ella. Por último, esta firma fue validada en la base de datos de TCGA mediante curvas de Kaplan-Meier, haciendo ver que la supervivencia se relacionaba fuertemente a los genes de mal pronóstico.

Gene	Coef	HR	Low. 95%CI	Upp. 95%CI	p-value
BMPR1A	-0.194	0.691	0.556	0.859	8.86E-4
CTSB	0.011	1.280	1.104	1.484	1.06E-3
NFKBIZ	0.050	1.442	1.200	1.731	9.10E-5
TNFSF14	0.081	1.320	1.138	1.532	2.58E-4
CXCL2	0.090	1.350	1.152	1.583	2.11E-4
SEMA4F	0.217	1.490	1.199	1.852	3.25E-3
OSMR	0.250	1.475	1.239	1.757	1.30E-5

Figura 3. Genes pronósticos relacionados con el sistema inmunitario analizados por la regresión de LASSO(13). (Figura tomada de Hu y col.)

Por otro lado, en un estudio similar al descrito anteriormente, se confirma la relevancia y utilidad de los genes inmunitarios relacionados con el GBM en calidad de genes pronóstico. Como se muestra en la Fig. 4, se identificó 24 genes inmunitarios (Fig. 4a) de los cuales solo 9 genes (CCL1, DEFA3, NOD2, LPA, FABP5, CHIT1, BMP1, TNFSF14, OSMR) fueron adecuados para establecer un modelo de predicción pronóstico, se utilizó el análisis de Cox univariado para filtrar

los genes que afectaban la supervivencia general de los pacientes y el Cox multivariado para identificar genes pronósticos independientes.

De los 9 genes, se discutió los más relevantes, por ejemplo: FABP5, estaba asociado a células tumorales altamente proliferantes, BMP1 asociado con mal pronóstico, OSMR a la regulación del crecimiento de GBM y CCL1 como un mediador inflamatorio estimulante de la migración de monocitos, por lo que se lo consideró un regresor del tumor asociado a buen pronóstico. Asimismo, se realizó un análisis de la red reguladora de factores de transcripción inmune y genes inmunes relacionados con el pronóstico y se evidenció que la familia BATF (Fig. 4b) regula, controla y apoya a la diferenciación de las células inmunitarias (16).

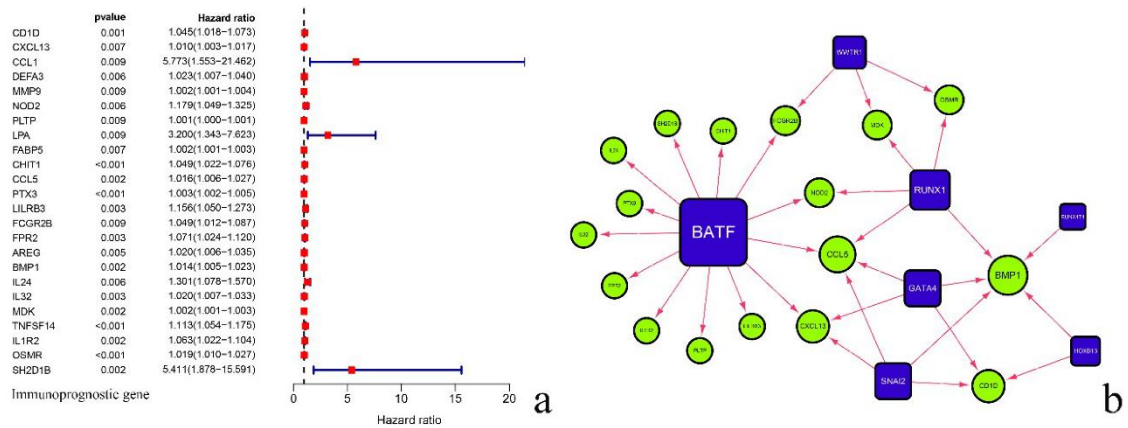


Figura 4. (A) Tabla de datos de los 24 genes inmunitarios de pronóstico obtenidos de la búsqueda que están relacionados con el GBM. (B) Asimismo, se muestra la construcción de las redes reguladoras entre los factores de transcripción inmunitarios y el gen inmunitario pronóstico (16). (Figura tomada de Liang y col.)

En otro estudio, una firma de IRG se asoció a la autofagia, la apoptosis y la necrosis en GBM, destacando su importancia en la formación de bases específicas para el desarrollo de terapias inmunológicas personalizadas.

Se seleccionaron firmas genéticas significativas de vías de muerte celular individuales para construir modelos de pronóstico combinados con la finalidad de crear el índice de muerte celular (CDI), agrupando a los pacientes en CDI alto y CDI bajo. Con base en las características del CDI, usando la base de datos TCGA, análisis de Cox univariante y multivariante, y regresión LASSO, se concluyó que el número total de índices característicos fue de 16 genes como se muestra en la Fig. 5, donde 4 pertenecían a la firma apoptótica, 8 pertenecían a la firma de autofagia y 4 pertenecían a la señal de necrosis, lo que mostró importancia pronóstica en GBM, y confirma que las firmas genéticas ayudan a predecir y guiar la selección de pacientes para un mejor uso de la inmunoterapia de GBM (17).

Poniendo énfasis en lo que resaltan los autores, en el grupo CDI, los niveles de expresión de los genes CCL2, LIF, FAS, IL1B, CXCL10, CCL20, TNFSF13, IL6, IL1R2, IL10RA e IL13RA fueron más altos en pacientes con CDI alto y el nivel de expresión de BMP2 fue más alto en CDI bajo, haciendo entrever que el BMP2 se encontraba en pacientes con mejor tasa de supervivencia. Por último, es destacable mencionar que para dar precisión al trabajo el CDI fue asociado con las características clínicas, la sobrevida y enfermedad libre de progresión y validado con la base de datos de CGGA.

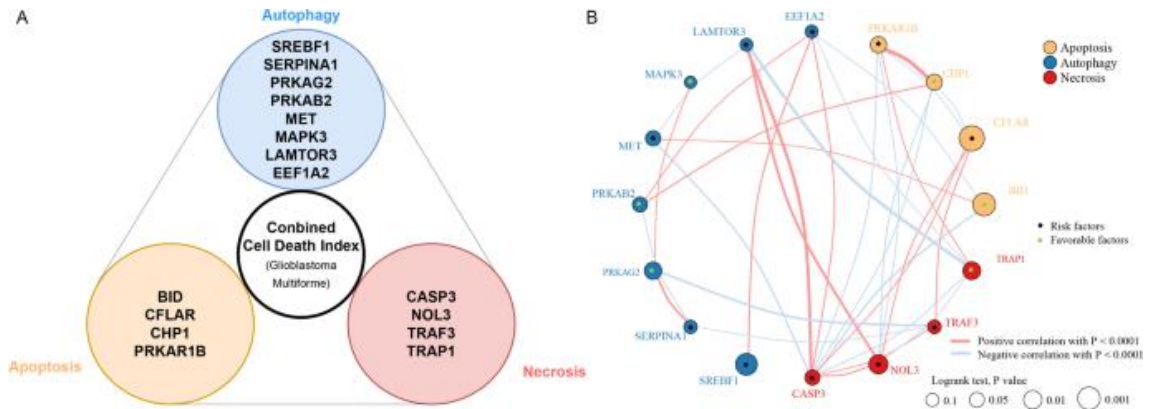


Figura 5. Índice de muerte celular (CDI), incluye genes implicados en la autofagia, apoptosis y necrosis. (A) Se muestra el CDI generado, incluyendo la mayor expresión de genes implicados en la autofagia, apoptosis y necrosis. (B) Se presenta la interacción entre genes característicos de CDI en GBM, donde el gen característico de autofagia, apoptosis y necrosis se marca de azul, amarillo y rojo respectivamente, y el tamaño del círculo representa el efecto de cada gen sobre el pronóstico(17). **(Figura tomada de Bi y col.)**

Con respecto a la aparición, desarrollo y pronóstico de GBM, propio de la búsqueda en bases de datos como TCGA, GTEx, CGGA y GEO, en el estudio presentando, tres genes PTX3, BMP2 y TNFSF9 se seleccionaron y utilizaron para construir firmas IRG diferencialmente expresados en función de su expresión en coeficientes de regresión obtenidos a partir de análisis de regresión de Cox multivariados (Fig. 6), para se posicionen como factor pronóstico independiente, se agrupó a los pacientes de acuerdo a la puntuación de riesgo alto y bajo, aseverando que los pacientes con puntuación riesgo alto tienen peor pronóstico que las de riesgo bajo, además estuvo validada mediante una curva de riesgo de Kaplan Meier en un conjunto de datos de CGGA. Para adicionar, se analizó la diferencia en la infiltración de 15 células inmunitarias entre los grupos de alto y bajo riesgo y se confirmó que estaba fuertemente asociada con los genes modelo. Por ejemplo,

TNFSF9 y PTX3 se asociaron principalmente con macrófagos, y BMP2 se asoció principalmente con células T CD8.

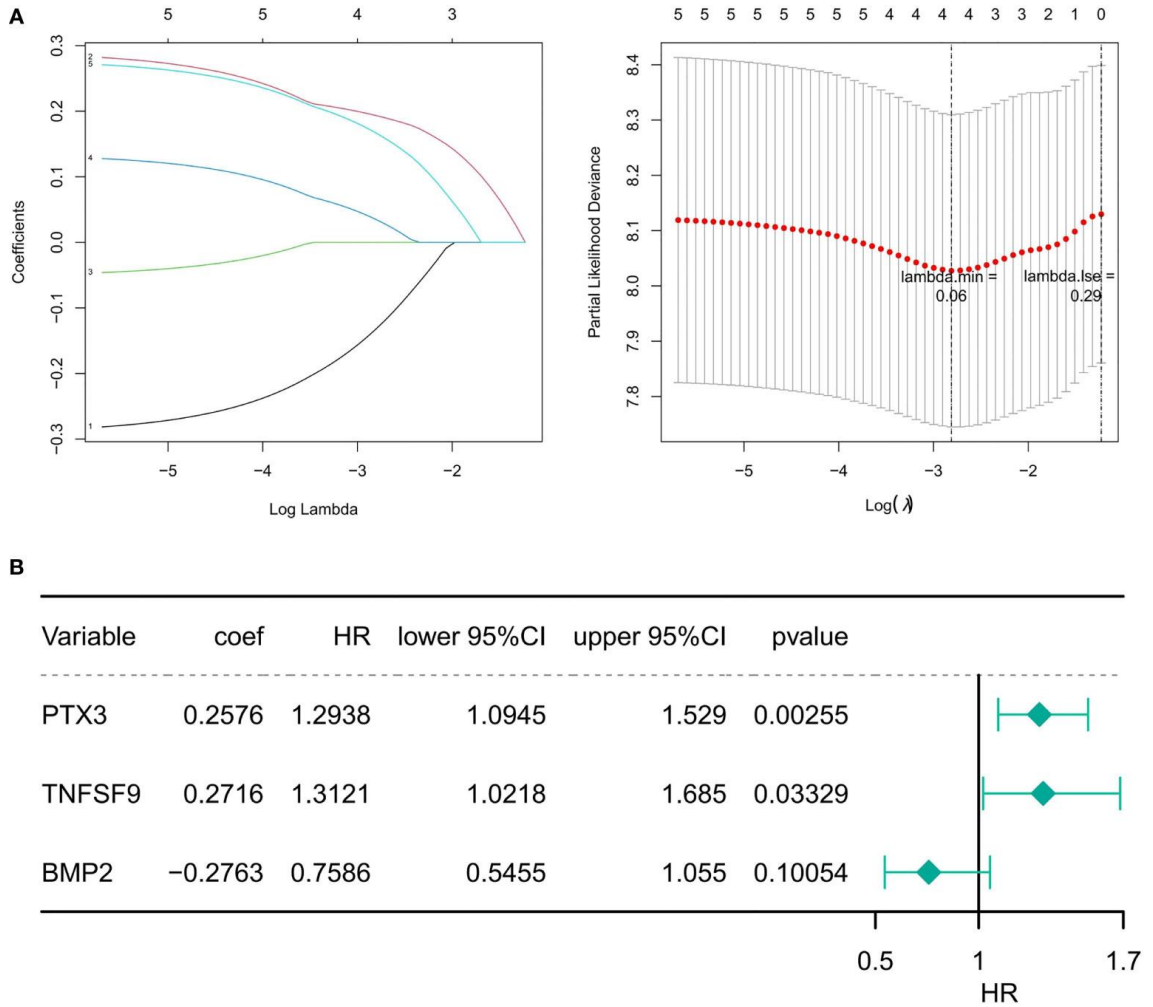


Figura 6. Genes seleccionados para elaboración de firma genética. (A) Al lado izquierdo se muestra el diagrama del coeficiente del gen, y al lado derecho el diagrama de error de la validación cruzada en la regresión de LASSO Cox. (B) Se presenta el diagrama de bosque del modelo de riesgo construido por el análisis de regresión de Cox multivariado, donde HR es el cociente de riesgos instantáneos y IC es intervalos de confianza del 95% (18). (Figura tomada de Yu y col.)

Tabla 3: Firma molecular: Genes asociados a pronóstico de sobrevida general.

N°	Título del artículo científico	Genes asociados a buen pronóstico	Genes asociados a mal pronóstico
1	Expression Profile Analysis Identifies a Novel Seven Immune-Related Gene Signature to Improve Prognosis Prediction of Glioblastoma	BMP1A	CTSB, NFKBIZ, TNFSF14, CXCL2, SEMA4F, OSMR
2	Predictive Analyses of Prognostic-Related Immune Genes and Immune Infiltrates for Glioblastoma. Diagnostics	CCL1	FABP5, BMP1, OSMR,
3	Prognostic value and immune relevancy of a combined autophagy-, apoptosis- and necrosis-related gene signature in glioblastoma	BMP2	CCL2, LIF, FAS, IL1B, CXCL10, CCL20, TNFSF13, IL6, IL1R2, IL10RA, IL13RA
4	Construction of an immune-related gene signature for the prognosis and diagnosis of glioblastoma multiforme	BMP2	PTX3, TNFSF9

b) Perfil de expresión de células inmunes infiltrantes: Firma celular

Los diversos estudios presentados en el párrafo anterior se basan en genes para identificar marcadores predictivos de cáncer. Sin embargo, estudios descritos a continuación han utilizado otras herramientas bioinformáticas para determinar el grado, porcentaje y el tipo de células inmunitarias infiltrantes en tumores asociadas al riesgo y la supervivencia del paciente. Las células inmunes infiltrantes de tumores (TIIC) están estrechamente relacionadas a la aparición y desarrollo de cáncer, por lo que son ampliamente utilizadas como biomarcadores clínicos de tumores malignos.

Analizamos el estudio de Lu y col. con el objetivo de verificar las firmas celulares involucradas en la progresión del glioma de bajo grado (LGG) a alto grado (HGG), se obtuvieron perfiles genómicos de bases de datos como TCGA y CGGA, y mediante el algoritmo CIBERSORT, herramienta analítica que utiliza datos de expresión genética para estimar la abundancia de tipos de células en poblaciones mixtas, se analizó la diferencia entre los grupos de LGG y HGG, en la infiltración de células inmunes basados en 22 subconjuntos de células inmunitarias (LM22) la cual mostró mayor porcentaje de macrófagos M0 y Linfocitos T helper asociados a HGG, mientras que el mayor porcentaje de células NK activadas y monocitos estuvo asociado a LGG (Fig. 7) (15).

Es necesario presentar que los autores contaron con un método de validación del CIBERSORT mediada por una técnica inmunohistoquímica, para determinar la densidad de las cuatro células mencionadas en tumores de LGG y HGG, corroborando lo descrito. Finalmente, es importante señalar que las células inmunes

desempeñan un papel importante en la tumorigénesis, en tal sentido, conociendo el porcentaje mayoritario de células inmunes no solo podrían involucrarse como predictores independientes de la progresión del glioma sino también permitiría mejorar los diseños de inmunoterapia en GBM. Por ejemplo, los pacientes con GBM con una alta presencia de células inmunitarias infiltradas en el tumor y un perfil molecular asociado con una respuesta inmunitaria fuerte podrían ser candidatos para terapias inmunológicas. Por otro lado, los pacientes con un perfil molecular asociado con una mayor resistencia al tratamiento y una baja presencia de células inmunitarias infiltradas en el tumor podrían destruir terapias dirigidas a las vías moleculares específicas del tumor.

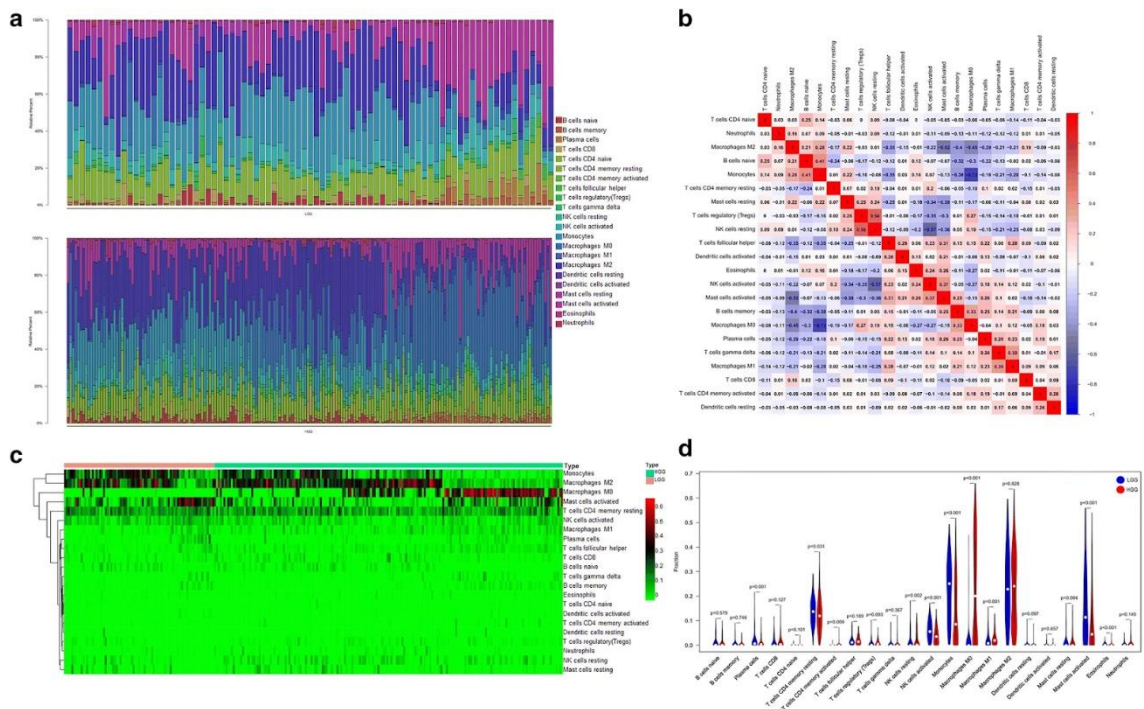


Figura 7. Panorama de la infiltración inmune en el glioma. (A) Diferencia de la infiltración inmune entre el LGG y el HGG. (B) Matriz de correlación de la proporción de 22 células inmunitarias en conjunto de datos TCGA y CGGA. (C) Mapa de calor de la proporción de 22 células inmunitarias, donde el eje horizontal muestra la información de agrupación de las muestras que se dividieron en dos grupos principales. (D) Distribución de las mismas células inmunitarias entre LGG y el HGG (15). (Figura tomada de Lu y col.)

En otro estudio, Behani y col. mostraron que la proporción y el patrón de expresión de las células inmunes infiltrantes variaron significativamente con el estado mutacional del gen IDH, lo que se reflejó en la supervivencia del paciente. Esto se demostró al vincular las firmas de células inmunitarias con los resultados de la terapia de puntos de control inmunitarios proporcionados por dos firmas establecidas por CIBERSORT: LM22 y LM10 (matriz enriquecida de 10 y 22 subtipos de células inmunes, respectivamente). La abundancia de cada subtipo celular varió según el subtipo de glioma y sobrevida general (19).

La población de macrófagos estuvo bastante bien distribuida, los M2, ocupaban la mayor parte del microambiente del GBM; los M0 específicos estaban enriquecidos en los gliomas IDH-WT, mientras que los monocitos eran relativamente más abundantes en los gliomas IDH-MUT. Además, se observó que los niveles más altos de M2 estaban asociados con un mal pronóstico. Esta distribución diferencial de los monocitos/macrófagos enfatizaron el papel de marcadores pronóstico del tumor. Además, los hizo más atractivos como dianas terapéuticas en el desarrollo de inmunoterapias.

i. Infiltración de células inmunológicas y los subtipos de GBM

A lo largo del trabajo de investigación, se ha señalado el papel importante que cumplen las células inmunes en la progresión del tumor, sin embargo, modulando la respuesta aletargada del sistema inmunológico hacia una respuesta activa, la inmunoterapia sería una estrategia atractiva debido a la capacidad de estas para destruir tumores. Las células dendríticas (DC por sus siglas en inglés) son importantes para el sistema inmunitario puesto que

desempeñan un papel protagónico en la regulación de la tolerancia y la inmunidad; por lo que vacunación activa con DC mediante inyección pulsada de lisados tumorales o péptidos sintéticos ha sido evaluado durante más de una década para inducir inmunidad antitumoral en pacientes con glioblastoma.

En este estudio de Prins et. al demuestran la correlación existente entre el perfil de expresión genética y la infiltración de células T en pacientes con GBM de subtipo proneural, proliferativo y mesenquimatoso, basados en terapias inmunológicas con DC pulsadas con lisado tumoral autólogo, más vacunas de refuerzo adyuvante., evidenciándose la prolongación de supervivencia en aquellos pacientes cuyos tumores tenían firmas de expresión de genes mesenquimales, asociados a que estos presentaron mayor número de linfocitos infiltrantes de tumores CD3⁺ y CD8⁺ en comparación con los GBM de otras firmas (Fig.8)(20). La baja tasa de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL, por sus siglas en inglés), en cerebro es la principal limitante para el éxito de terapias innovadoras frente a otros tipos de cáncer, sin embargo, el tumor de cerebro por su naturaleza de

Zhu y col. afirmaron que el PD-L1 se expresa frecuentemente en gliomas con un patrón dependiente del grado de GBM, por lo que ante una mayor expresión de PD-L1 la supervivencia es más corta. Además, tienen una correlación positiva con células inmunosupresoras como macrófagos, neutrófilos y DC inmaduras, además de una correlación altamente significativa con M2, pero tienen una correlación negativa con células inmunes como las células T CD8⁺, por lo que este artículo expresa que los macrófagos M2 son prevalentes en los GBM y asimismo se asocian negativamente con el pronóstico favorable (21).

Si bien es cierto, actualmente se cuenta con la disponibilidad de diferentes terapias, pero debido a que se ha demostrado que muchas de ellas son agresivas para el paciente, se considera que no son tratamientos efectivos; ante ello se recurre al desarrollo de firmas celulares que buscan investigar la seguridad y eficacia de las células inmunes infiltrantes en el GBM, y de esa manera mejorar los pronósticos y terapias para los pacientes (22).

2. Metaanálisis de estudios transcriptómicos

Con la finalidad de reproducir las firmas celulares de los artículos de la tabla 2, se realizó un análisis de deconvolución parcial de estimación de proporciones celulares, conforme al flujo de trabajo descrito en la Fig.2. Debido a que no se contó con el acceso a TCGA y a la información clínica de los casos seleccionados en GEO, los datos a continuación muestran las medias de la estimación poblacional de la firma LM7 de cada población celular inmune inferidas a partir de los IRG en pacientes con GBM y Control (Tejido cerebral sin GBM), mediante el algoritmo de CIBERSORT (Tabla 4).

Tabla 4. Media de la estimación poblacional de células inmune por cada grupo: GBM (n=47) y Control (n=25).

Población celular inmune	\bar{X} GBM	\bar{X} Control
LB	0.82	0.12
LCD4	1.22	1.21
LCD8	0.09	0.02
LT $\gamma\delta$	1.34	0.70
NK	0.06	0.02
Mo-Ma-DC	11.12	1.97
Granulocitos	0.25	0.11

LB: linfocitos B, LCD4: linfocitos T CD4+, LCD8: linfocitos T CD8+, LT $\gamma\delta$: Linfocitos t gamma delta, NK: natural killer, Mo-Ma-DC: monocitos, macrófagos, células dendríticas.

Para comparar los dos grupos celulares, se realizó la prueba estadística t de student de variables independientes en el software Stata/SE versión 18.0 (Fig.9). De este modo, se determinó que la población de monocitos, macrófagos y células dendríticas; los linfocitos T gamma delta, y los linfocitos B eran estadísticamente

significativos ($p < 0.05$). Las medias en las tres poblaciones fueron significativamente mayores en el grupo GBM respecto al grupo control. Mientras que, la población de linfocitos CD4, CD8 y granulocitos; no mostraron diferencias significativas (Fig. 9).

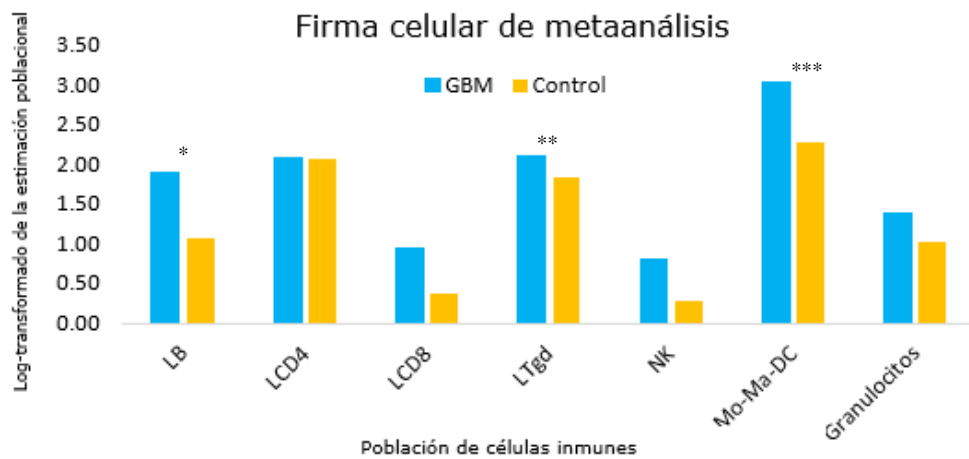


Figura 9. Esquema asociado a una firma celular. Log-transformado de la media de la estimación poblacional de células inmune por cada grupo: tumoral ($n=47$) y no tumoral ($n=25$). (\bar{X} por factor 100, para mejor entendimiento). LB: linfocitos B, LCD4: linfocitos T CD4+, LCD8: linfocitos T CD8+, LTgd: Linfocitos t gamma delta, NK: natural killer, Mo-Ma-DC: monocitos, macrófagos, células dendríticas. * $p= 0.035$, ** $p= 0.0002$, *** $p=0.0001$

V. DISCUSIÓN

En los últimos diez años, la bioinformática y la tecnología de secuenciación de alto rendimiento han ayudado a identificar biomarcadores clínicamente importantes asociados al pronóstico y sobrevida de los pacientes con GBM (23).

Los estudios de la Tabla 1, identificaron firmas moleculares pronósticas de GBM, manteniendo la misma metodología de análisis para su construcción. Sin embargo, fue notorio que no todos llegaron al consenso de una firma molecular idéntica. Unas de las razones de esta diferencia, se debe al origen poblacional y a la variabilidad biológica de cada estudio, por ejemplo, en los estudios presentados, se obtuvo información de la base de datos de TCGA (origen estadounidense) y del CGGA (origen chino). Adicionalmente a los tipos de microarrays utilizados por los autores en cada estudio obtenido de los repositorios virtuales. Incluso, al tipo de análisis estadístico empleado, aun cuando el denominador común fue el cox univariado y la regresión de LASSO. Por lo que es necesario estandarizar una metodología que determine firmas moleculares aplicables a diferentes poblaciones.

Uno de los genes que se identificó en todos los análisis de la tabla 1, fue el gen BMP, descrito en los estudios como BMP2, BMPR1A y BMP, perteneciente a la superfamilia del TGF β . Una investigación reciente demuestra que este gen actúa como señales de diferenciación en el mantenimiento de la autorrenovación y la angiogénesis en el GBM, por lo que su relación con la puntuación de riesgo alto son congruentes con el mal pronóstico (24). Sin embargo, en el estudio de Yu y col. mostraron que el BMP2 estuvo catalogado como gen protector, esto debido a su estrecha relación con la presencia genética de los linfocitos T CD8, asociado a la

diferenciación del linaje T (25). El segundo gen identificado común a todos los estudios en la tabla 1, pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral: TNFSF. En los artículos estuvo representado por TNFSF9, TNFSF13, TNFSF14; el cual afecta a diversos procesos biológicos, incluida la apoptosis, la defensa inmune, la inflamación y la autoinmunidad, congruentes con el mal pronóstico (24).

En adición, la identificación de genes para la construcción de la firma molecular, mostró una estrecha relación con la falla de los puntos de control inmunitario, principalmente PD-L1 y CD40. Es importante abarcar esta información debido a que se asocia con la eficacia y la modulación de los tratamientos inmunológicos. Aunque se sabe que el bloqueo de los puntos de control PD-1/PD-L1 no ha traído ningún progreso en el tratamiento del glioblastoma a causa de la respuesta inmunogénica baja y al microambiente inmunosupresor (26). Se podría estimular la activación con intervención inmunoterapéutica, como en el caso de estudios con CD40 (27–29).

Por otro lado, la firma celular basada en la infiltración de células inmunes presentada en la tabla 2, mostró un abanico de células inmunológicas relacionadas al pronóstico de GBM. Los macrófagos tipo M2 se han descrito en todos los estudios analizados y su expresión fue asociada a mal pronóstico. Los macrófagos asociados a tumores (TAM) representan el 30% de todo el microambiente tumoral del GBM. Su presencia se asocia con un mayor crecimiento tumoral, mayor invasión y una menor supervivencia. Entre los distintos tipos funcionales de macrófagos destacan el fenotipo M1 y el fenotipo M2. Generalmente, los TAM presentan un fenotipo M2 y muestran acciones oncogénicas, facilitando la supervivencia, la proliferación y la diseminación de las células malignas. A

diferencia de las células cancerosas, los TAM son genéticamente estables, lo que los convierte en objetivos terapéuticos favorables. Sin embargo, al no ser un grupo celular unificado, sus aplicaciones terapéuticas no siempre son concluyentes (30). Teniendo en cuenta todas estas evidencias, la modulación del fenotipo M1 a M2 podría ser una estrategia terapéutica en los casos de GBM.

Además, para comparar el análisis de las firmas obtenidas a partir de la literatura analizada, se decidió hacer un análisis bioinformático donde se determinó las estimaciones poblacionales de las células inmunes infiltradas en pacientes con GBM y sin GBM. Los macrófagos, monocitos y células dendríticas, fueron predominantes en el grupo con GBM, similar a las firmas descritas en la revisión bibliográfica.

Sin embargo, resalta en el análisis, la significancia estadística de la población de linfocitos T $\gamma\delta$ infiltrados en el grupo con GBM. Los LT $\gamma\delta$ juegan un papel particularmente importante en el control del estrés y la inmunidad frente a la carcinogénesis; reconocen y eliminan las células transformadas independientemente de la restricción HLA y expresan receptores asesinos naturales activadores que se unen a moléculas de superficie inducibles por estrés que están presentes en células malignas (31). Por lo que, la infiltración de estas células en los tumores podría ser favorable y funcional como terapia inmunológica.

Asimismo, la relación entre el grupo con GBM y linfocitos B fueron mayor respecto al grupo sin GBM, a pesar que la estimación poblacional en ambos grupos no fue alta.

En base a todo lo descrito, es importante discutir que, aunque la identificación de genes relacionados a la inmunidad proporciona basta información, la inferencia de células inmunológicas a partir de estos genes, proporcionan y amplían las bases para proponer nuevas terapias personalizadas. A menudo, los pacientes con glioblastoma tienen un mal pronóstico y una baja tasa de supervivencia. Sin embargo, la medicina personalizada y la terapia dirigida se están convirtiendo en herramientas importantes para mejorar los resultados del tratamiento. Por lo tanto, la caracterización de las firmas celulares puede ayudar a identificar subgrupos de pacientes con diferentes pronósticos y respuestas a los tratamientos y en conjunto con las firmas moleculares, incrementar sobrevida general de los pacientes con GBM.

A pesar de ello, no cabe duda que los autores buscaron posicionar sus firmas halladas como medida pronóstica e innovadora para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas; por ello, se espera que los métodos analíticos mejoren la identificación de biomarcadores para reducir las limitaciones del pronóstico oportuno.

VI. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El presente estudio muestra resultados que dan solidez a la investigación, sin embargo, es de conocimiento que existen algunas limitaciones que se detallan a continuación:

- **El país de origen de los estudios GSE:** Los estudios colectados son de origen estadounidense, si bien se tomaron datos de un solo país para disminuir la variabilidad biológica, esta decisión podría ser una limitación en la representación de la población mundial, especialmente a países europeos y asiáticos. Se podría replicar un estudio similar en diferentes grupos poblacionales para corroborar si es aplicable a ellos.
- **Información clínica:** El criterio de inclusión fue restrictivo a estudios transcriptos en el chip U133 de Affymetrix. Esto, disminuyó la posibilidad que todos los estudios tuvieran información clínica, por lo que no se pudo realizar análisis sobrevida, como en otras investigaciones.
- **Tamaño muestral:** El n poblacional fue reducido debido a los criterios de inclusión, sin embargo, la estadística en *Stata* permitió un análisis de confianza para el grupo tumoral y control.
- **Firma LM7:** Se realizó el análisis de deconvolución con la firma de acceso LM7. Esto, repercutió que no se realizara un análisis individual de subpoblaciones más inmaduras, involucradas en otras firmas. Sin embargo, las principales células inmunes se encontraron en la firma LM7. Se podría considerar realizar un análisis con otras firmas para una mejor discusión.

VII. CONCLUSIONES

Como demuestra la investigación, los estudios de expresión genética han identificado varios genes sobreexpresados o subexpresados en GBM en comparación con el tejido cerebral normal. Por lo que, la identificación de estos puede proporcionar información valiosa para el diagnóstico, clasificación, pronóstico y/o tratamiento.

El análisis bibliográfico evidenció diferentes genes involucrados al pronóstico y supervivencia general de pacientes con GBM, aunque no todas las publicaciones analizadas en este estudio determinaron los mismos genes, debido a la variabilidad biológica asociados a los transcriptomas descargados de TCGA y/o CGGA.

En los estudios presentados, IRG diferencialmente expresados desempeñaron un papel importante en el descubrimiento de nuevas funciones relacionadas con el pronóstico y los objetivos terapéuticos, principalmente basados en la identificación de dos genes pronóstico BMP y TNFSF.

Por otro lado, las células inmunitarias que se infiltraron en GBM como los macrófagos con fenotipo M2, se correlacionaron inversamente con la supervivencia general y la respuesta a la terapia. A pesar de la asociación inversa, la inmunoterapia sigue siendo una alternativa terapéutica prometedora, por lo que mediante el análisis conjunto de las características moleculares y celulares de las células inmunitarias infiltrantes de GBM, se puede obtener información valiosa sobre el desarrollo del tumor y la respuesta inmunitaria al mismo. Esto puede ayudar a identificar subgrupos de pacientes con distintas características moleculares y/o

celulares que se pueden distinguir de diferentes tratamientos. Asimismo, la identificación de linfocitos $\gamma\delta$, como parte de una firma celular, podrían ser dianas terapéuticas novedosas por su naturaleza inmunológica distinta.

Si bien, ciertos artículos están basados solo en la determinación de los IRG como marcadores pronósticos, se ha podido notar que identificar las células inmunes infiltradas abre un panorama más específico para entender la distribución de la infiltración y la relación de los genes en el microambiente tumoral.

Algunos autores, como es el caso de Hu (13) y Yin (14) han combinado estas dos estrategias como forma de validar la otra, sin embargo, conviene determinar ambas firmas en conjunto para obtener resultados más específicos.

En resumen, los estudios revisados destacan la importancia de los genes relacionados con la inmunidad en la identificación de firmas moleculares y celulares que puedan ser utilizadas como herramientas para el pronóstico y la evaluación de la respuesta al tratamiento en pacientes con GBM. La identificación de genes pronósticos y factores de transcripción inmunes relacionados con GBM puede ayudar a entender la relación entre la expresión genética y el pronóstico, así como la sensibilidad a los fármacos y la aparición de resistencia. Además, estos hallazgos podrían ayudar en el desarrollo de terapias inmunológicas personalizadas y en la mejora de la supervivencia y calidad de vida de los pacientes con GBM.

IX. RECOMENDACIONES

En base a estos resultados, se recomiendan realizar más estudios que correlacionen las firmas moleculares y celulares predefinidas con la supervivencia general, la terapia de puntos de control inmunológico y la progresión del tumor para garantizar una selección más precisa y consistente de los marcadores de pronóstico. También se recomienda una validación experimental mejorada de tejido fresco y/o congelado con GBM para que el contenido desarrollado con métodos bioinformáticos pueda transferirse a ensayos clínicos en estos pacientes.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castañeda CA, Casavilca S, Orrego E, García-Corrochano P, Deza P, Heinike H, et al. Glioblastoma: Análisis molecular y sus implicancias clínicas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. abril de 2015;32(2):316-25.
2. Rodríguez MPT, Garcia KAM, Baquero CAC, Cruz A del PI. Inmunopatología del Glioblastoma Multiforme y su importancia en el ámbito clínico. *Rev Cienc Bioméd*. 15 de abril de 2022;11(2):163-78.
3. Coasaca-Torres J, Alzamora-Jiménez Á. Glioblastoma multiforme de larga sobrevida sin recurrencia, reporte de caso: Glioblastoma multiforme of long survival without recurrence, case report. *Rev Fac Med Humana [Internet]*. 17 de abril de 2018 [citado 4 de marzo de 2023];18(2). Disponible en: <https://revistas.urp.edu.pe/index.php/RFMH/article/view/1290>
4. Méndez-Aguilar P, Vera-Ponce VJ, Méndez-Aguilar P, Vera-Ponce VJ. Factores pronóstico de supervivencia en adultos por gliomas de alto grado en un Hospital de Lima, Perú. *Rev Fac Med Humana*. julio de 2020;20(3):452-63.
5. Ohgaki H, Kleihues P. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 14 de febrero de 2013;19(4):764-72.
6. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1 de junio de 2016;131(6):803-20.
7. Arango Prado M del C, Rodríguez-Padilla C. Protagonismo del sistema inmune en el microambiente de los tumores malignos de la mama. *Rev Cuba Hematol Inmunol Hemoter*. junio de 2016;32(2):0-0.
8. Greter M, Heppner FL, Lemos MP, Odermatt BM, Goebels N, Laufer T, et al. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med*. marzo de 2005;11(3):328-34.
9. Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, Reifenberger G, von Deimling A. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1 de junio de 2015;129(6):829-48.
10. Virtuoso A, Giovannoni R, De Luca C, Gargano F, Cerasuolo M, Maggio N, et al. The Glioblastoma Microenvironment: Morphology, Metabolism, and Molecular Signature of Glial Dynamics to Discover Metabolic Rewiring Sequence. *Int J Mol Sci*. 24 de marzo de 2021;22(7):3301.

11. Palacios Paredes LF, Silva C, García Matamoros EK. Gliomas de Alto Grado del Adulto: Biología Molecular (Parte I): Revisión Narrativa. *Oncol Ecuad.* 31 de diciembre de 2020;30(3):249-79.
12. Wiendl H, Mitsdoerffer M, Hofmeister V, Wischhusen J, Bornemann A, Meyermann R, et al. A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 de mayo de 2002;168(9):4772-80.
13. Hu L, Han Z, Cheng X, Wang S, Feng Y, Lin Z. Expression Profile Analysis Identifies a Novel Seven Immune-Related Gene Signature to Improve Prognosis Prediction of Glioblastoma. *Front Genet [Internet].* 2021 [citado 10 de marzo de 2022];12. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2021.638458>
14. Yin W, Tang G, Zhou Q, Cao Y, Li H, Fu X, et al. Expression Profile Analysis Identifies a Novel Five-Gene Signature to Improve Prognosis Prediction of Glioblastoma. *Front Genet [Internet].* 2019 [citado 4 de marzo de 2023];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2019.00419>
15. Lu J, Li H, Chen Z, Fan L, Feng S, Cai X, et al. Identification of 3 subpopulations of tumor-infiltrating immune cells for malignant transformation of low-grade glioma. *Cancer Cell Int.* 11 de octubre de 2019;19(1):265.
16. Liang P, Chai Y, Zhao H, Wang G. Predictive Analyses of Prognostic-Related Immune Genes and Immune Infiltrates for Glioblastoma. *Diagnostics.* 24 de marzo de 2020;10(3):177.
17. Bi Y, Wu ZH, Cao F. Prognostic value and immune relevancy of a combined autophagy-, apoptosis- and necrosis-related gene signature in glioblastoma. *BMC Cancer.* 3 de marzo de 2022;22(1):233.
18. Yu Z, Yang H, Song K, Fu P, Shen J, Xu M, et al. Construction of an immune-related gene signature for the prognosis and diagnosis of glioblastoma multiforme. *Front Oncol [Internet].* 2022 [citado 4 de marzo de 2023];12. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.938679>
19. Mehani B, Asanigari S, Chung HJ, Dazelle K, Singh A, Hannenhalli S, et al. Immune cell gene expression signatures in diffuse glioma are associated with IDH mutation status, patient outcome and malignant cell state, and highlight the importance of specific cell subsets in glioma biology. *Acta Neuropathol Commun.* 10 de febrero de 2022;10(1):19.

20. Prins RM, Soto H, Konkankit V, Odesa SK, Eskin A, Yong WH, et al. Gene Expression Profile Correlates with T-Cell Infiltration and Relative Survival in Glioblastoma Patients Vaccinated with Dendritic Cell Immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 15 de marzo de 2011;17(6):1603-15.
21. Zhu Z, Zhang H, Chen B, Liu X, Zhang S, Zong Z, et al. PD-L1-Mediated Immunosuppression in Glioblastoma Is Associated With the Infiltration and M2-Polarization of Tumor-Associated Macrophages. *Front Immunol [Internet].* 2020 [citado 4 de marzo de 2023];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.588552>
22. Lim J, Park Y, Ahn JW, Sim J, Kang SJ, Hwang S, et al. Autologous adoptive immune-cell therapy elicited a durable response with enhanced immune reaction signatures in patients with recurrent glioblastoma: An open label, phase I/IIa trial. *PLOS ONE.* 10 de marzo de 2021;16(3):e0247293.
23. Zhou L, Tang H, Wang F, Chen L, Ou S, Wu T, et al. Bioinformatics analyses of significant genes, related pathways and candidate prognostic biomarkers in glioblastoma. *Mol Med Rep.* 1 de noviembre de 2018;18(5):4185-96.
24. Bayin NS, Modrek AS, Placantonakis DG. Glioblastoma stem cells: Molecular characteristics and therapeutic implications. *World J Stem Cells.* 26 de abril de 2014;6(2):230-8.
25. Hager-Theodorides AL, Outram SV, Shah DK, Sacedon R, Shrimpton RE, Vicente A, et al. Bone Morphogenetic Protein 2/4 Signaling Regulates Early Thymocyte Differentiation1. *J Immunol.* 15 de noviembre de 2002;169(10):5496-504.
26. Wang X, Guo G, Guan H, Yu Y, Lu J, Yu J. Challenges and potential of PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy for glioblastoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 18 de febrero de 2019;38(1):87.
27. Morrison AH, Diamond MS, Hay CA, Byrne KT, Vonderheide RH. Sufficiency of CD40 activation and immune checkpoint blockade for T cell priming and tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci.* 7 de abril de 2020;117(14):8022-31.
28. van Hooren L, Vaccaro A, Ramachandran M, Vazaios K, Libard S, van de Walle T, et al. Agonistic CD40 therapy induces tertiary lymphoid structures but impairs responses to checkpoint blockade in glioma. *Nat Commun.* 5 de julio de 2021;12(1):4127.

29. Yang F, He Z, Duan H, Zhang D, Li J, Yang H, et al. Synergistic immunotherapy of glioblastoma by dual targeting of IL-6 and CD40. *Nat Commun.* 8 de junio de 2021;12(1):3424.
30. Andersen RS, Anand A, Harwood DSL, Kristensen BW. Tumor-Associated Microglia and Macrophages in the Glioblastoma Microenvironment and Their Implications for Therapy. *Cancers.* 24 de agosto de 2021;13(17):4255.
31. Kabelitz D, Serrano R, Kouakanou L, Peters C, Kalyan S. Cancer immunotherapy with $\gamma\delta$ T cells: many paths ahead of us. *Cell Mol Immunol.* septiembre de 2020;17(9):925-39.