

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA Xochimilco

División de ciencias biológicas y de la salud

Licenciatura en Química farmacéutica biológica

## INFORME DE SERVICIO SOCIAL

Proyecto de servicio social

***“Efecto del consumo moderado de cerveza sobre la citotoxicidad mediada por células NK contra células de glioblastoma humano.”***

**Priscila Peimbert Hernández**

**Matrícula: 2182036006**

**Fecha de inicio:** 13 de marzo de 2023

**Fecha de término:** 13 de septiembre de 2023



**Asesor externo**

Dr. Benjamín Pineda Olvera

4702540

Dirección de investigación



**Asesor interno**

Dra. Ana Laura Esquivel Campos

No. Eco. 33148

Departamento de Sistemas Biológicos



**Alumno**

Priscila Peimbert Hernández

2182036006

Pasante en servicio social

**Septiembre 2013**

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
3.1 Objetivo general	4
3.2 Objetivos específicos	4
<b>4. ANTECEDENTES</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
5.1 Administración de lúpulo en líneas celulares humanas de glioblastoma humano U87, A172, U373 y LN18	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
5.2 Administración alfa-isoácidos, temozolomida(TMZ) y dimetilsulfóxido(DMSO) en las líneas celulares humanas de glioblastoma humano U87 y A172	10
5.3 Aislamiento de células mononucleares por gradiente de Ficoll para enfrentamiento de las líneas celulares humanas de glioblastoma humano U87 y A172	14
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>17</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

A partir de los años 50-'s se inició el interés de la comunidad científica por investigar los efectos benéficos en la salud de personas que consumen moderadamente bebidas fermentadas. Desde entonces, se ha reportado que la cerveza contiene diversas sustancias con efectos antiinflamatorios, sedativos, antineoplásicos y de modulación del sistema inmune (MacGregor 1986). Respecto al sistema inmune, se sabe que el consumo moderado de cerveza altera al sistema inmune innato y adaptativo, específicamente, puede inducir un impacto positivo en los linfocitos T, B, células naturales (NK) y monocitos/macrófagos; así como, disminuir la producción de citocinas proinflamatorias (Szabo 1999; Bautista 2001). Las células NK son componentes esenciales de la inmunidad innata cuya función principal es impedir infecciones y el crecimiento tumoral (Abbas et al., 2009). En diversas neoplasias, la actividad de estas células es afectada, principalmente en tumores del sistema nervioso central, como el glioblastoma, en donde se observa una disminución de la actividad de NK's producto de una disminución del ligando del receptor activador de células NK grupo 2 NK2G que regula la función antineoplásica de estas células (Crane et al., 2014). Sin embargo, gracias a los efectos benéficos de ciertos componentes de la cerveza sobre la inmunidad innata, el consumo moderado de cerveza podría inducir un efecto positivo sobre la activación de células NK que llevarían a la lisis de células tumorales.

Se pretende determinar el efecto que tiene el consumo moderado de cerveza sobre la capacidad de inducción de muerte de células de glioblastoma por NK's provenientes de donadores saludables, así como la posible sensibilización e inducción de muerte de las células tumorales por un extracto de lúpulo.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor más agresivo y fatal del sistema nervioso central y la terapéutica actual es solo paliativa (Sepulveda and Puente 2000). Los tratamientos actuales más novedosos con anticuerpos humanizados y células T con receptores de antígeno quimérico (CAR T), son extremadamente elevados en costo y no han mostrado avances significativos en la sobrevivencia de los

pacientes con GBM (Feins et al., 2019). La presente propuesta pretende conocer si el consumo moderado de cerveza tiene un impacto positivo sobre la respuesta inmune innata antitumoral. Los resultados que aquí se obtengan permitirán determinar la funcionalidad antitumoral de células NK provenientes de voluntarios que han tenido un consumo moderado de cerveza y si este consumo favorece la eliminación de células tumorales de glioblastoma por células NK. Además, se pretende determinar el papel sensibilizador y de inducción de apoptosis del lúpulo sobre células neoplásicas de glioblastomas humanos. El consumo moderado de cerveza podría impactar benéficamente a la respuesta inmune antitumoral por células NK, beneficiando no solo a pacientes con glioblastoma, si no también, a pacientes con diversos tipos de cáncer.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Se pretende determinar si el extracto de lúpulo impacta positivamente sobre la funcionalidad antitumoral de células NK entonces, aumentará la expresión del ligando NKG2D y la lisis de células de glioblastoma humano.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Determinar el efecto del extracto de lúpulo sobre la actividad antitumoral de células NK provenientes de donadores sanos.
- Evaluar la modulación de receptores de muerte y activación de células NK provenientes de donadores sanos haciendo un enfrentamiento de líneas celulares de glioblastoma humano.
- Evaluar las diferencias que existen en la modulación de la actividad de células NK sensibilizando a las células de glioblastoma humano con alfa-isoácidos.
- Determinar el posible efecto sensibilizador y promotor de apoptosis del extracto del lúpulo al inducir la apoptosis y modular la expresión de FAS y FAS-L en células de glioblastoma humano.

- Sensibilizar las células de glioblastoma humano con tratamientos como alfa-isoácidos, temozolomida (TMZ) y dimetilsulfóxido (DMSO) a diferentes concentraciones y tiempos para poder ver la expresión de NKG2D utilizando anticuerpos y citometría de flujo.

#### 4. ANTECEDENTES

A partir de los años 50 's se inició el interés de la comunidad científica por investigar los posibles efectos benéficos en la salud de personas que consumen moderadamente alcohol. Desde entonces, se han desarrollado diversos estudios enfocados a determinar esta relación. Es bien sabido que el consumo crónico y excesivo de bebidas alcohólicas puede ocasionar fallas multiorgánicas y aumento de la morbilidad y mortalidad de los consumidores crónicos (Messaoudi et al., 2014). Respecto al sistema inmune, se conoce que el alcohol puede suprimir diversas respuestas inmunes, y que su abuso se ha asociado con una mayor incidencia de desarrollar diversas enfermedades infecciosas y del tracto respiratorio especialmente de bacterias tales como *S. pneumoniae* y *M. tuberculosis* (Ahmed 1995; Szabo 1998; Zhang et al., 2008). Aunque el consumo agudo y crónico del alcohol es deletéreo para la salud y generalmente visto como inmunosupresor, aún en la actualidad no se ha documentado claramente si el consumo moderado de alcohol produce cambios en la función inmune que tengan relevancia clínica (MacGregor 1986). De hecho, el consumo moderado de alcohol se ha sugerido que tiene efectos benéficos en el sistema inmune (celular y humoral) al comparar contra personas que abusan de su consumo e incluso contra personas abstemias (Cohen et al., 1993; Mendenhall et al., 1997; Diaz et al., 2002; Romeo et al., 2007). Se sabe que el consumo de alcohol altera al sistema inmune innato y adaptativo tanto en humanos como en modelos animales. Específicamente, se ha demostrado una disminución en los niveles circulantes de mediadores inflamatorios. Mandrekar et al, 2006 demostraron la disminución de la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) en monocitos circulantes de una forma dosis-dependiente (Mandrekar et al., 2006). El consumo de alcohol también modula de forma dosis-dependiente la expresión de los Receptores tipo Toll (TLRs),

los cuales inician respuestas inflamatorias por una transducción de señales que incluyen la activación de factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) (Kawai and Akira 2006).

Existen diversos mecanismos por los cuales el alto consumo de alcohol afecta la inmunidad. Tal parece que puede disminuir la capacidad de migración de los leucocitos hacia los tejidos dañados o infectados, puede inducir anormalidades en los linfocitos T, B, células NK y monocitos/macrófagos; así como, disminuir la producción de citocinas (Szabo 1999; Bautista 2001). Sin embargo, a pesar del hecho de que la respuesta humoral y celular se ven afectadas en los consumidores de grandes cantidades de alcohol (Budec et al., 1992), estudios en humanos y animales experimentales sugieren que bajas dosis de alcohol aumentan la respuesta inmune innata y adaptativa (Mendenhall et al., 1997, Romeo et al., 2007). Este efecto benéfico sobre el sistema inmune es dependiente del tipo de bebida (si es fermentada o destilada), así como de la cantidad y duración del consumo de alcohol y del género.

Respecto a la cerveza como bebida alcohólica, es necesario considerar que además de la cantidad de alcohol, esta contiene otros componentes interesantes tales como carbohidratos, fibra soluble, minerales (fósforo, silicio, magnesio, potasio) y vitaminas (niacina, riboflavina, piridoxina, folatos y vitamina B12), así como polifenoles que pudiesen modular el sistema inmune (Boscolo et al., 2003, Vinson et al., 2003, Nardini et al, 2006). Romeo et al, 2007 demostró que el consumo moderado de cerveza aumenta la capacidad de eliminación de patógenos por macrófagos debido a un incremento en su capacidad de producir estallido respiratorio tanto en mujeres como en hombres, de igual manera describen que en general la respuesta inmune innata se vio mejorada con respecto a su situación basal y que este incremento fue aún mayor en mujeres (Romeo et al., 2007).

El sistema inmune innato como primera línea de defensa contra enfermedades infecciosas y desarrollo de enfermedades neoplásicas, juega un papel preponderante en el control y eliminación de estas (Cooper et al., 2001). En la actualidad se sabe que para que un tumor pueda establecerse requiere escapar del reconocimiento inmune, e inicialmente evadir la destrucción por el sistema inmune innato (Khong and Restifo 2002). Particularmente, las células asesinas naturales

(NK) son mediadores centrales de la inmunidad innata que pueden impedir el crecimiento tumoral a través del proceso de vigilancia inmune (Iannello and Raulet 2014). La activación de las células NK ocurre a través de la ligación de receptores celulares específicos, tales como el receptor miembro D del grupo 2 de NK (NKG2D) (Raulet et al. 2013), lo que conlleva a la producción de citocinas proinflamatorias tales como IFN- $\gamma$  y la liberación de gránulos citotóxicos que causan la lisis de las células tumorales (Orr and Lanier 2010). Existen nueve ligandos para NKG2D [ej., secuencia relacionada al polipéptido A del MHC clase I, (MICA), secuencia relacionada al polipéptido B del MHC clase I (MICB) y las proteínas de unión 1-6 UL16] que pueden ser expresadas por cualquier tipo celular bajo condiciones de estrés (Champsaur and Lanier 2010). La importancia de NKG2D en la vigilancia inmune de los tumores es resaltada por la observación de que ratones deficientes en NKG2D son más susceptibles a desarrollar tumores inducidos por oncogenes (Guerra et al. 2008).

Los gliomas son los tumores primarios más comunes en el cerebro y se encuentran divididos en cuatro grados clínicos basados en sus características histológicas y de pronóstico (Komori 2017). Diversas alteraciones cromosomales y genéticas son comúnmente encontradas en gliomas y generalmente estas se correlacionan con el grado clínico (Meyer 2008). Particularmente en el glioblastoma diversos oncogenes son activados y se ha observado que estos pacientes expresan cantidades disminuidas de NKG2D en sus células NK, comparados con sujetos sanos y esta disminución en la expresión es debida, en parte, al aumento en la producción del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) que favorece la regulación negativa del receptor NKG2D (Crane et al. 2014).

Dado que existen muy pocas referencias del papel que juega el consumo moderado de cerveza en la modulación del sistema inmune innato y no hay estudios referentes al impacto que tiene este consumo en el desarrollo de tumores cerebrales nosotros pretendemos determinar el efecto que tiene el consumo moderado de cerveza por 30 días sobre la capacidad de inducción de muerte de células de glioblastoma por células NK provenientes de donadores saludables, tomando en cuenta posibles diferencias asociadas con el género, contribuyendo al conocimiento de la relación

que existe entre el consumo moderado de cerveza y la capacidad citotóxica de células NK como primera línea de defensa contra células de glioblastoma humano.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Administración de lúpulo en líneas celulares humanas de glioblastoma humano U87, A172, U373 y LN18

Se realizó el sembrado de placas de 96 pozos con 8,000 células por pozo en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 (DMEM/F12 + 10% SFB), estas placas se utilizaron para aplicación de tratamiento de extracto de lúpulo (*HopHaze*) a un volumen de 1:10 o 10  $\mu\text{L}/\text{ml}$ , es decir, por cada pozo existe un volumen de 2  $\mu\text{L}$  de lúpulo y 98  $\mu\text{L}$  de medio DMEM/F12.

- Para la preparación de extracto de lúpulo se hicieron los siguientes cálculos:

Solución A (solución stock):

$$10 \mu\text{L de lúpulo} + 90 \mu\text{L de medio DMEM/F12} = 100 \mu\text{L volumen final}$$

Posteriormente, para la preparación de la solución B debemos tener en cuenta que por cada pozo debe existir una concentración de 2  $\mu\text{L}$  de extracto de lúpulo + 98  $\mu\text{L}$  medio DMEM/F12, entonces:

$$\begin{aligned} \text{Si se usa 18 pozos: } 18 \text{ pozos} * 2 \mu\text{L de lúpulo} \\ = 36 \mu\text{L de la solución A (solución stock)} \end{aligned}$$

$$\text{Si se usa 18 pozos: } 18 \text{ pozos} * 98 \mu\text{L} = 1764 \mu\text{L de medio DMEM/F12}$$

A continuación, se prepara la solución B:

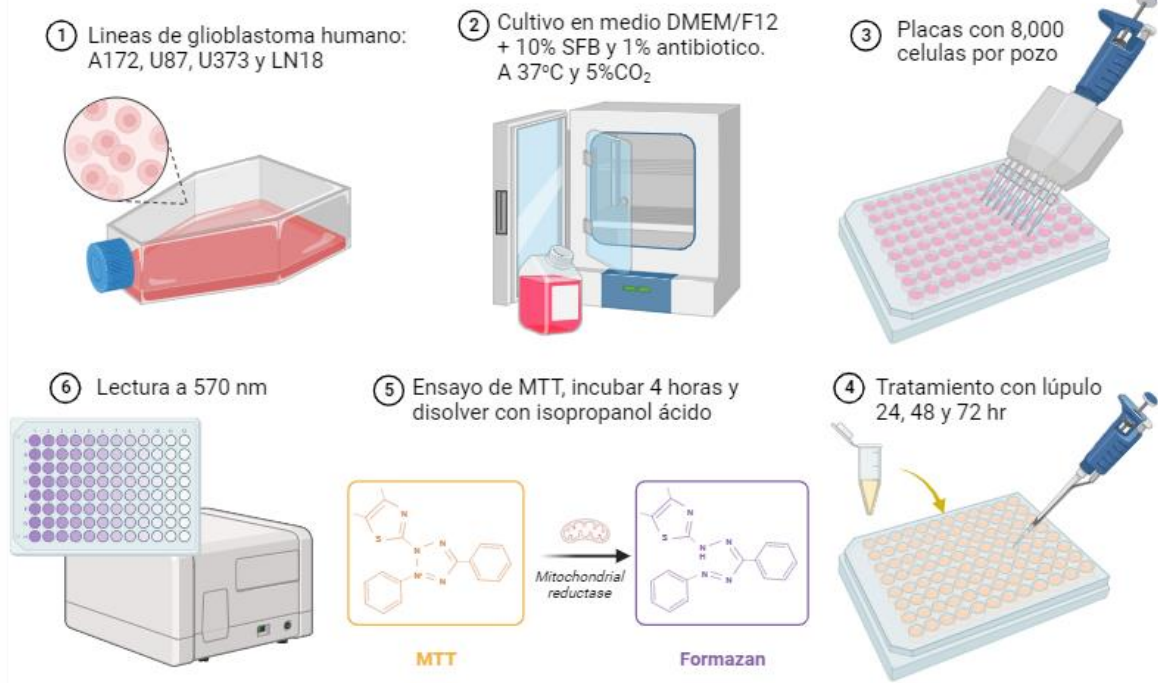
$$36 \mu\text{L de la solución A} + 1764 \mu\text{L de medio DMEM/F12} = 1800 \mu\text{L volumen final}$$

A partir de la solución B, se filtró con un filtro de jeringa esteril (COBETTER PES) con un tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  y se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de la solución en los pozos designados (exceptuando los controles), posteriormente se realiza una dilución seriada 1:2 utilizando la multicanal para después poder evaluar la citotoxicidad; esto se realizó a tiempos de 72, 48 y 24 horas para ver el efecto que produce el extracto de lúpulo (*HopHaze*) en las diferentes líneas celulares (**figura 1**).



## Tratamiento con extracto de lúpulo

### Ensayo de viabilidad de células tumorales



**Figura 1.** Administración de extracto de lúpulo (*HopHaze*) y ensayo de viabilidad de células tumorales A172, U87, U373 y LN18 (Biorender,2023).

Para evaluar el efecto citotóxico, después del tiempo de incubación del tratamiento se realizó la prueba de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Esta prueba se utiliza para estimar la viabilidad celular, en donde las células que son viables son capaces de reducir el MTT de color amarillo soluble en agua a un producto de formazán de color purpura insoluble en agua (Siewerts et al. 1995). La cantidad de producto de formazán que se forma es proporcional a la actividad metabólica y al número de células en la muestra, lo cual es determinado espectrofotométricamente por un lector de placas que después de disolver los cristales violetas de formazán en alcohol ácido (isopropanol acidificado con ácido clorhídrico 1 N) se obtienen los datos de las absorbancias que posteriormente se analizaron en el programa estadístico Excel y después se graficó en el programa Prism8. Por último, se tomaron fotografías de las 4 líneas celulares de glioblastoma U87, A172 U373 y LN18 con el extracto de lúpulo (*HopHaze*) ya administrado y se

tomaron las fotografías con un microscopio de fluorescencia con cámara digital a color (*Media Cybernetics Evolution VF-F-CLR-12-C*) (**tablas 1,2,3 y 4**).

## **5.2 Administración alfa-isoácidos, temozolomida(TMZ) y dimetilsulfóxido(DMSO) en las líneas celulares humanas de glioblastoma humano U87 y A172**

Se realizó el sembrado de placas de 24 pozos con 100,000 células en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 (DMEM/F12 + 10% SFB), estas placas se utilizaron para aplicación de tratamiento con alfa-isoácidos a una concentración de 20 µg/mL, temozolomida(TMZ) a una concentración de 500µM y dimetilsulfóxido(DMSO) al 1% a continuación se explican los cálculos:

- Para la preparación de alfa-isoácidos se hicieron los siguientes cálculos:

Solución A (solución stock):

$$3.74 \mu\text{L de isoácidos} + 996.26 \mu\text{L de medio DMEM/F12} = 1000 \mu\text{L volumen final}$$

Posteriormente, para la preparación de la solución B debemos tener en cuenta la cantidad de pozos a preparar, en este caso se preparan 22 pozos, entonces:

$$\begin{aligned} \text{Si se usa 22 pozos: } & 22 \text{ pozos} * 500 \mu\text{L de medio DMEM/F12} \\ & = 11000 \mu\text{L medio DMEM/F12} \end{aligned}$$

A continuación, se prepara la solución B:

$$\begin{aligned} & 224 \mu\text{L de la solución A} + 11000 \mu\text{L de medio DMEM/F12} \\ & = 11224 \mu\text{L volumen final} \end{aligned}$$

A partir de la solución B, se filtró con un filtro de jeringa esteril (COBETTER PES) con un tamaño de poro de 0.22 µm y se colocan 500 µL por pozo (exceptuando los controles); esto se realizó a tiempos de 48 y 24 horas para ver el efecto que produce los iso-ácidos en las diferentes líneas celulares (A172 y U87) (**figura 2**).

- Para la preparación de temozolomida (TMZ) se hicieron los siguientes cálculos:

Solución A (solución stock):

$$776.6 \mu\text{L de TMZ} + 223.4 \mu\text{L de PBS}$$

$$= 1000 \mu\text{L volumen final a una concentración de } 4000 \mu\text{M}$$

Posteriormente, para la preparación de la solución B partimos de la solución stock a una concentración de  $4000 \mu\text{M}$ , anteriormente se ha calculado la concentración inhibitoria 50 (IC50) para TMZ que es a una concentración aproximadamente de  $500 \mu\text{M}$  (Zhou et al. 2017), entonces:

$$C1V1 = C2V2$$

$$\text{Despejando la fórmula anterior: } V2 = C1V1/C2$$

$$\begin{aligned} \text{Y al sustituir los valores: } & 500\mu\text{M}(500\mu\text{L}) / 4000 \mu\text{M} \\ & = 62.5 \mu\text{L de la solución A por pozo} \end{aligned}$$

A continuación, se prepara la solución B por pozo:

$$\begin{aligned} & 62.5 \mu\text{L de la solución A} + 437.5 \mu\text{L de medio DMEM/F12} \\ & = 500 \mu\text{L volumen final por pozo} \end{aligned}$$

A partir de la solución B, se colocan  $500 \mu\text{L}$  por pozo (exceptuando los controles); esto se realizó a tiempos de 48 y 24 horas para ver el efecto de IC50 de la TMZ en las diferentes líneas celulares (A172 y U87) (**figura 2**).

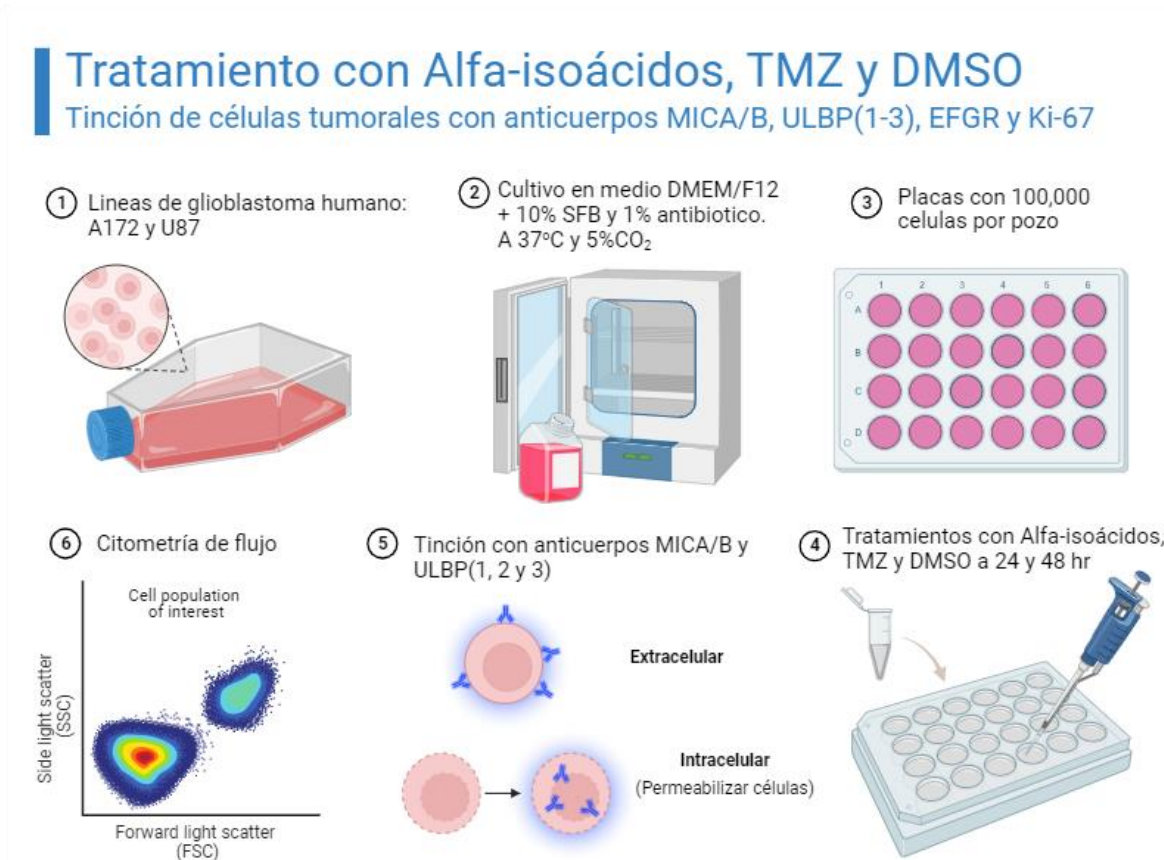
- Para la preparación de dimetilsulfóxido (DMSO) se hicieron los siguientes cálculos:

Se parte de la premisa en la que usamos TMZ  $500 \mu\text{M}$ , entonces en su mayoría el uso del DMSO es como vehículo para administrar fármacos (Perez et al. 2003), el DMSO se absorbe rápidamente y se metaboliza por oxidación a dimetilsulfona y mediante reducción a sulfuro de dimetilo (Gaspar et al. 2012). Para el tratamiento con DMSO se utiliza al 1% y se realizan los siguientes cálculos:

$$500 \mu\text{M de TMZ} * 0.01 \mu\text{L de DMSO} = 5 \mu\text{L volumen final de DMSO por pozo}$$

A partir de este cálculo, se colocan  $5 \mu\text{L}$  de DMSO concentrado más  $495 \mu\text{L}$  de medio DMEM/F12 por pozo (exceptuando los controles); esto se realizó a tiempos

de 48 y 24 horas para ver el efecto del DMSO y el IC50 de la TMZ en las diferentes líneas celulares (A172 y U87) (figura 2)



**Figura 2.** Administración de alfa-isoácidos, temozolomida(TMZ) y dimetilsulfóxido(DMSO) y ensayo de tinción con anticuerpos de células tumorales U87 y A172 que pasan a citometría de flujo (Biorender,2023).

Posterior a los tratamientos se realizó el procedimiento de tinción con anticuerpos,el cual fue intracelularmente permeabilizando la membrana celular y extracelularmente sin permeabilizar la membrana, para comprobar la unión que existe de los anticuerpos. Se recolectaron las células con previo tratamiento de las placas de las líneas celulares humanas de glioblastoma humano A172 y U87; la recolección de células se realiza al lavar cada pozo con PBS tres veces, a continuación, se coloca tripsina para ayudar a estas células adherentes a despegarse de la placa y se colocan en tubos para citometría de flujo etiquetados (figura 2). A continuación, se colocan los anticuerpos a elección, en este caso son:

- Anti-EGFR (A11351, ABClonal, USA): se ha demostrado que el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) existe una amplificación y mutación que se encuentra con mayor frecuencia en glioblastoma (Kasenda et al. 2022), y existe una unión extracelular y se usa como control.
- Anti-MICA/B (F-6) (sc-137242, Santa Cruz, USA): Es un ligando para el receptor NKG2D, la unión conduce a la lisis celular. y se encuentra extracelularmente (Jin et al. 2021)
- Anti-ULBP1 (3F-1) (sc-53131, Santa Cruz, USA): Es una proteína para el receptor NKG2D que se expresa en células bajo estrés, incluidas aquellas que están infectadas o transformadas por virus (Crane et al. 2010).
- Anti-ULBP2 (6F6) (sc-53135, Santa Cruz, USA): Es una proteína para el receptor NKG2D que se expresa en células bajo estrés, incluidas aquellas que están infectadas o transformadas por virus (Crane et al. 2010).
- Anti-ULBP3 (D-1) (s-c390844, Santa Cruz, USA): Es una proteína para el receptor NKG2D que se expresa en células bajo estrés, incluidas aquellas que están infectadas o transformadas por virus (Crane et al. 2010).
- Anti-Ki-67 (350513, Biolegend, USA): es una proteína nuclear y nucleolar, cuya función general es la regulación de la proliferación celular (Bullwinkel et al. 2006) con una unión intracelular.

Se utiliza un fluoróforo en común el cual es Alexa Fluor 488 (AF488) (A11008, Thermo Fisher Scientific, USA) y Aloficocianina (APC) (sc-3860, Santa Cruz, USA), estos son empleados para la generación estable de señales para la obtención de imágenes en citometría de flujo, y también se encuentra conjugado con anticuerpos, como es Anti-MICA/B y Anti-ULBP3.

Se decidió usar una concentración de 1 µg/mL del anticuerpo, el cual es el indicado según su hoja de datos, el volumen de anticuerpo de añadir son 5 µL y se colocaron en el fondo de los tubos de centrifugación que tienen un volumen de 100 uL de suspensión de células recolectadas en PBS. Para la colocación del anticuerpo Ki-67 se permeabilizaron las células; posterior a una incubación de 10-30 minutos se lavó el anticuerpo con PBS, después se fijaron las células con paraformaldehído y

se leyeron en el citómetro de flujo (*CytoFLEX SRT de Beckman-Coulter*), para la lectura y análisis de los gráficos se utilizó el programa FlowJo (**figuras 4,5,6,7,8 y 9**)

### **5.3 Aislamiento de células mononucleares por gradiente de Ficoll para enfrentamiento de las líneas celulares humanas de glioblastoma humano U87 y A172**

Se realizó el sembrado de placas de 24 pozos con 100,000 células en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium F12(DMEM/F12 + 10% SFB), estas placas se utilizaron sin tratamiento y con tratamiento con alfa-isoácidos a una concentración de 20 µg/mL por 48 horas, a continuación se presentan los cálculos:

- Para la preparación de alfa-isoácidos se hicieron los siguientes cálculos:

Solución A (solución stock):

$$3.74 \mu\text{L de isoácidos} + 996.26 \mu\text{L de medio DMEM/F12} = 1000 \mu\text{L volumen final}$$

Posteriormente, para la preparación de la solución B debemos tener en cuenta la cantidad de pozos a preparar, en este caso se preparan 22 pozos, entonces:

$$\begin{aligned} \text{Si se usa 22 pozos: } & 22 \text{ pozos} * 500 \mu\text{L de medio DMEM/F12} \\ & = 11000 \mu\text{L medio DMEM/F12} \end{aligned}$$

A continuación, se prepara la solución B:

$$\begin{aligned} & 224 \mu\text{L de la solución A} + 11000 \mu\text{L de medio DMEM/F12} \\ & = 11224 \mu\text{L volumen final} \end{aligned}$$

A partir de la solución B, se filtró con un filtro de jeringa esteril (COBETTER PES) con un tamaño de poro de 0.22 µm y se colocan 500 µL por pozo (exceptuando los controles); esto se realizó a tiempos de 48 para ver el efecto que produce los isoácidos en las diferentes líneas celulares (A172 y U87) (figura 3).

Posterior al tratamiento realizado en las líneas celulares de glioblastoma en las placas, se obtuvo una muestra de sangre por punción venosa de un donante sano previo consentimiento informado. Para la extracción de sangre se utilizaron tubos

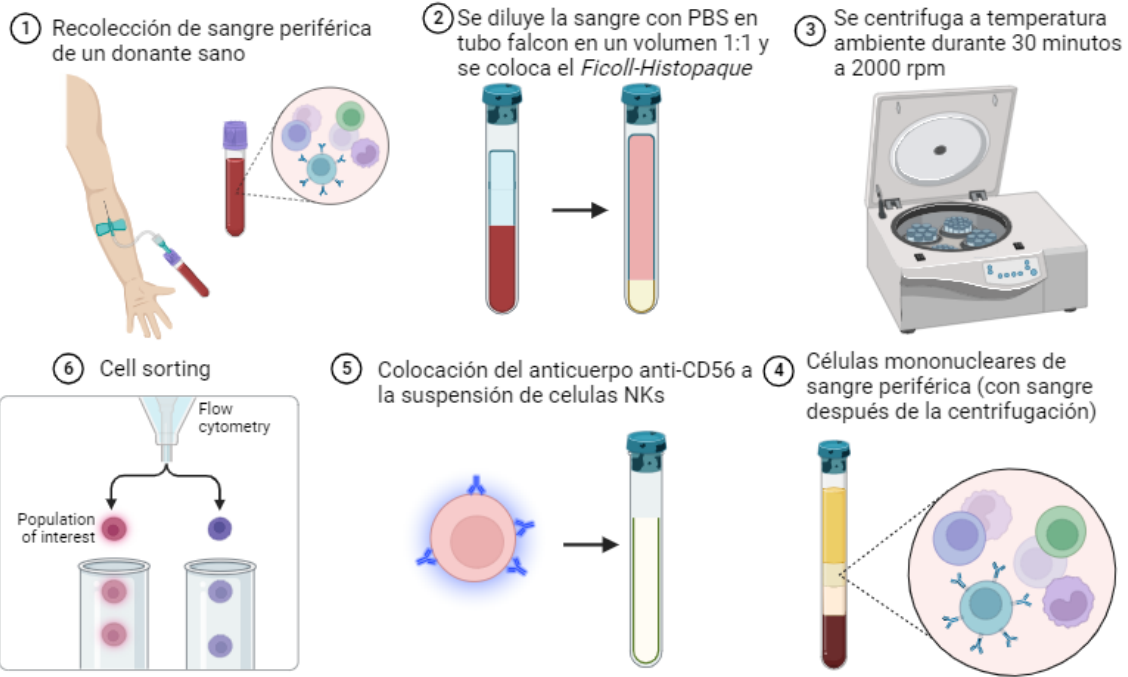
Vacutainer (*Becton Dickinson*) con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Se utilizaron 2 tubos de 4 ml de muestra sanguínea del donante sano y se agitaron suavemente por inversión para evitar la coagulación de sangre dentro del tubo. Inmediatamente se procedió a realizar aislamiento de células mononucleares por la técnica de gradiente por densidades utilizando Ficoll-Histopaque (*Sigma Aldrich*).

El Ficoll-Histopaque (*Sigma Aldrich*) es un polímero de sacarosa con alto peso molecular, siendo una solución viscosa que permite el gradiente de densidad generalmente usado para aislar células mononucleares provenientes de sangre periférica humana (*Boyum et al. 1968*) utilizando un procedimiento de centrifugación. Se diluyeron en un volumen 1:1 en un tubo falcon de 15 ml previamente contenido con PBS, es decir, se agregaron 6 ml de sangre más 6 ml de PBS, posteriormente en tres tubos falcon de 15 ML se colocaron 3 ml en cada uno de Ficoll-Histopaque (*Sigma Aldrich*) y se pone 4 ml de sangre diluida en PBS por la pared del tubo falcon.

Posteriormente se separó la fracción leucocitaria/eritrocítica a temperatura ambiente mediante centrifugación durante 30 minutos a 2000 rpm, como resultado, se obtuvo la separación de grupos celulares a causa de la diferencia de densidades: en la capa inferior se encontraron los eritrocitos seguidos por una capa delgada de granulocitos, por encima, el volumen de Ficoll-Histopaque separando la fracción de células plaquetarias, linfocitos, monocitos y por último el plasma. Se retiró la capa mononuclear, la cual se distingue como una banda blanca y difusa entre el plasma y la capa de Ficoll-Histopaque (*Sigma Aldrich*) y se transfirió a otro tubo falcon de 15 ml con suavidad, para posteriormente proseguir a los lavados con PBS y volver a centrifugar por 5 minutos a 2000 rpm y al último se decantó para obtener nuestras células mononucleares o natural killer(NK).

## Células mononucleares por gradiente de Ficoll

Enfrentamiento de líneas celulares U87 y A172 mediante tinción con anti-CD56 para el aislamiento células NKs mediante cell sorting



**Figura 3.** Toma de muestra de sangre de personas sanas para aislar células mononucleares por gradiente de Ficoll para enfrentamiento de líneas celulares, se realizó extrayendo una muestra sanguínea, para posteriormente realizar un gradiente de Ficoll y obtener las células mononucleares. Posteriormente, se utilizó el anticuerpo anti-CD56 para el aislamiento células NKs mediante cell sorting (Biorender,2023).

Posterior al aislamiento de células mononucleares, las células de las placas de las líneas celulares de glioblastoma U87 y A172 previamente con tratamiento de alfa-isoácidos por 48 horas y sin tratamiento fueron recolectadas y contadas junto con las células natural killer(NK), esto para poder realizar una relación 1:3 que significa que por cada célula de glioblastoma se añadieron 3 células NK, y la relación 1:5 que significa que por cada célula de glioblastoma se colocaron 5 células NK, después de 4 horas de este procedimiento se tomaron fotografías con un microscopio de fluorescencia con cámara digital a color (Media Cybernetics Evolution VF-F-CLR-12-C) (**tablas 5 y 6**), y por último se colocó el anticuerpo anti-CD56 que sirve como marcador para identificar las células NK el cual se deja incubar en oscuridad por un tiempo de 1 hora a temperatura ambiente, se fijaron las células con paraformaldehído y se llevó a cell sorting.





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
Unidad Xochimilco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

## 6. RESULTADOS



INSTITUTO NACIONAL DE  
NEUROLOGÍA Y NEUROCIURUGÍA  
MANUEL VELASCO SUÁREZ

### Línea celular de glioblastoma humano U87 con extracto de lúpulo

Concentración	24 horas	48 horas	72 horas
Control			
0.15625 ug/ml			
0.3125 ug/ml			
0.625 ug/ml			



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
Unidad Xochimilco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE  
NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA  
MANUEL VELASCO SUÁREZ

1.25 ug/ml			
2.5 ug/ml			
5 ug/ml			
10 ug/ml			

**Tabla 1.** Fotografías con microscopio de fluorescencia con cámara digital a color (Media Cybernetics Evolution VF-F-CLR-12-C) de la línea celular humana de glioblastoma humano U87 con tratamiento de extracto de lúpulo (HopHaze) a un tiempo de 24,48 y 72 horas.



Casa abierta al tiempo

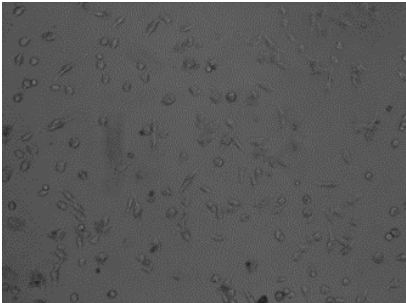
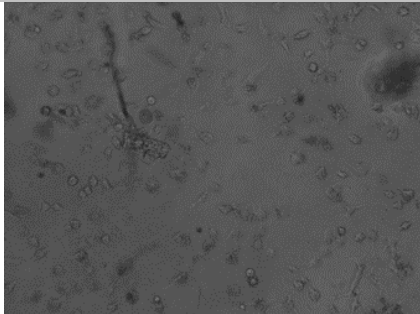
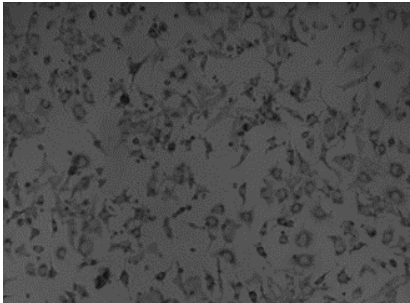
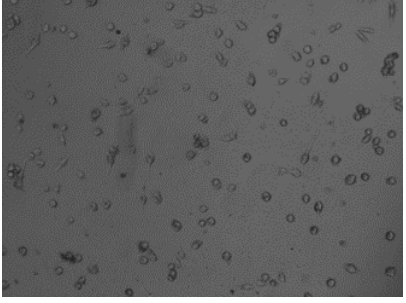
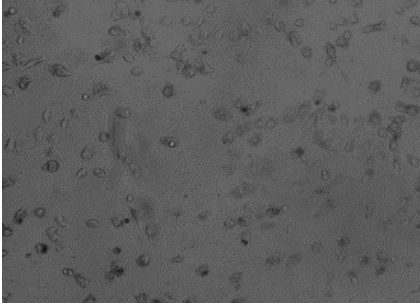
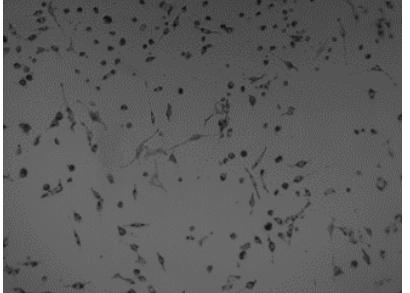
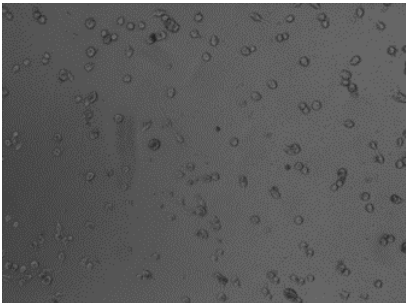
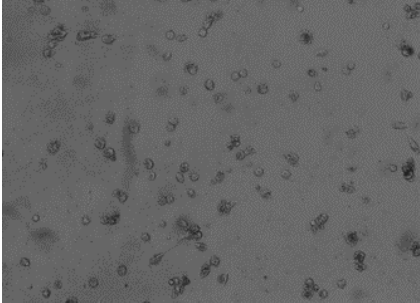
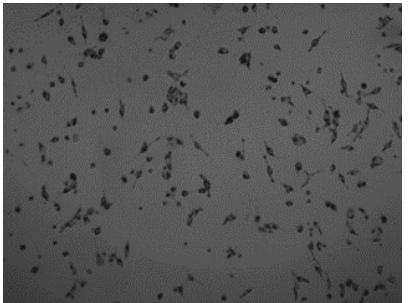
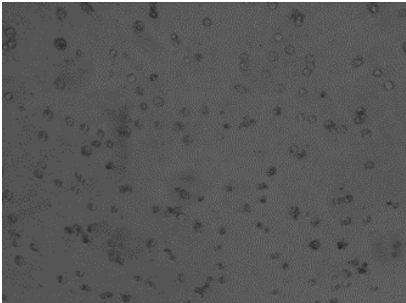
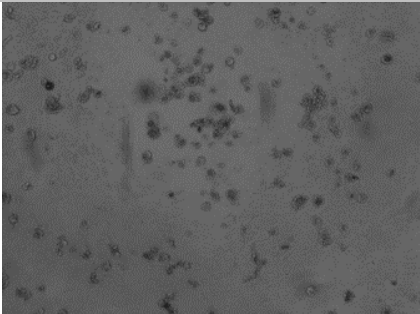
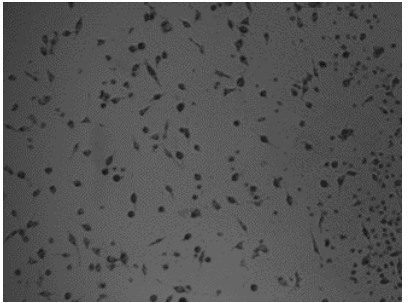
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
Unidad Xochimilco

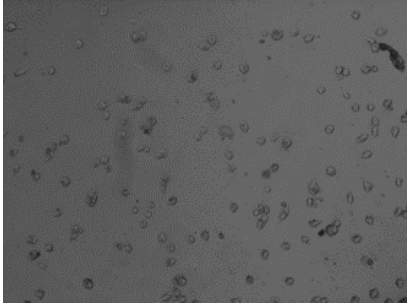
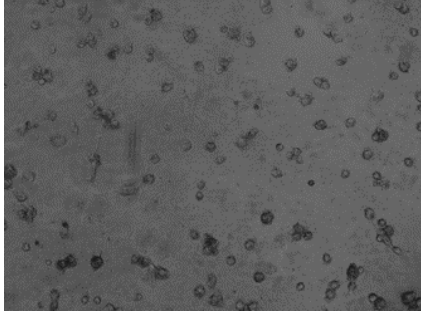
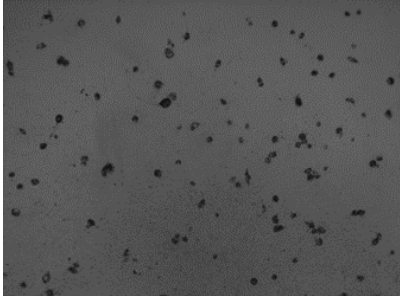
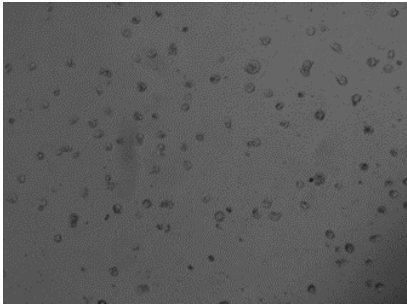
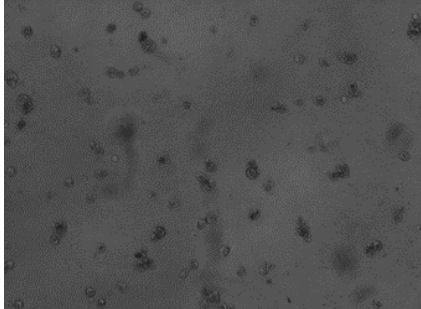
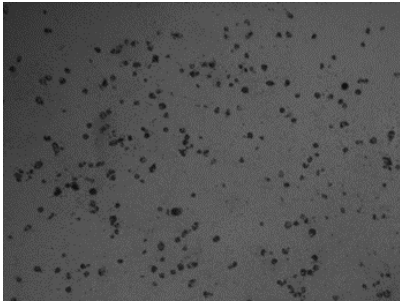
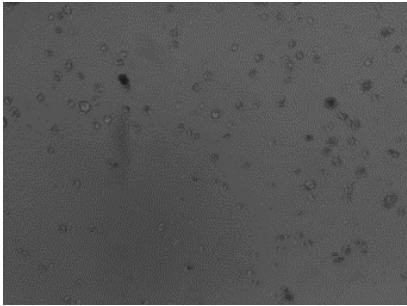
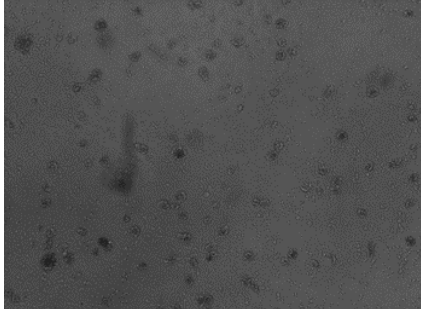
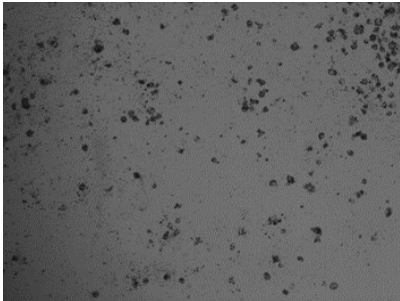
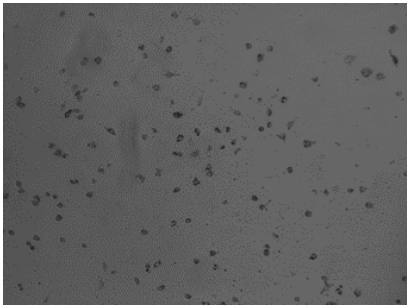
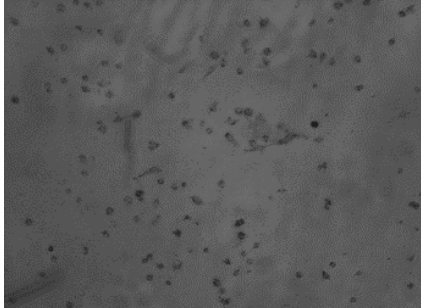
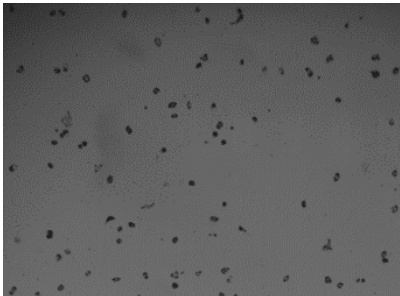
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE  
NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA  
MANUEL VELASCO SUÁREZ

**Línea celular de glioblastoma humano A172 con extracto de lúpulo**

<b>Concentración</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>	<b>72 horas</b>
<i>Control</i>			
<i>0.15625 ug/ml</i>			
<i>0.3125 ug/ml</i>			
<i>0.625 ug/ml</i>			

1.25 ug/ml			
2.5 ug/ml			
5 ug/ml			
10 ug/ml			

**Tabla 2.** Fotografías con microscopio de fluorescencia con cámara digital a color (Media Cybernetics Evolution VF-F-CLR-12-C) de la línea celular humana de glioblastoma humano A172 con tratamiento de extracto de lúpulo (HopHaze) a un tiempo de 24,48 y 72 horas.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
Unidad Xochimilco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE  
NEUROLOGÍA Y NEUROCIURGÍA  
MANUEL VELASCO SUÁREZ

**Línea celular de glioblastoma humano U373 con extracto de lúpulo**

<b>Concentración</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>	<b>72 horas</b>
<i>Control</i>			
<i>0.15625 ug/ml</i>			
<i>0.3125 ug/ml</i>			
<i>0.625 ug/ml</i>			



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
Unidad Xochimilco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE  
NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA  
MANUEL VELASCO SUÁREZ

1.25 ug/ml			
2.5 ug/ml			
5 ug/ml			
10 ug/ml			

**Tabla 3.** Fotografías con microscopio de fluorescencia con cámara digital a color (Media Cybernetics Evolution VF-F-CLR-12-C) de la línea celular humana de glioblastoma humano U373 con tratamiento de extracto de lúpulo (HopHaze) a un tiempo de 24,48 y 72 horas.



Casa abierta al tiempo

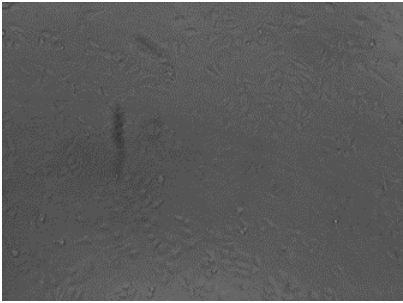
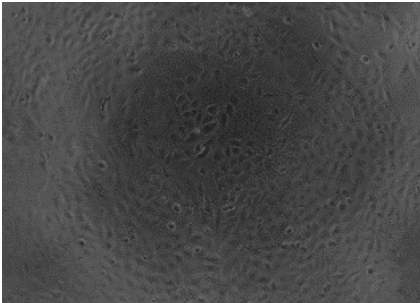
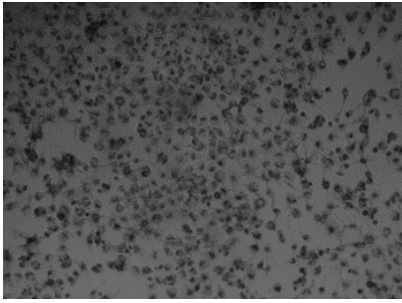
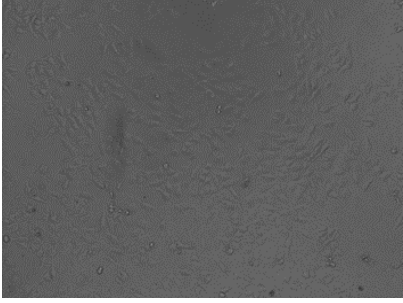
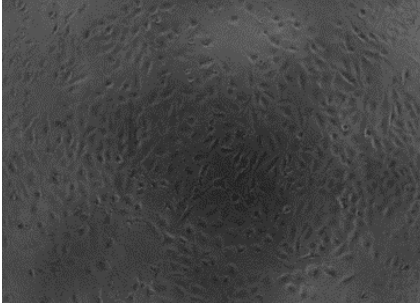
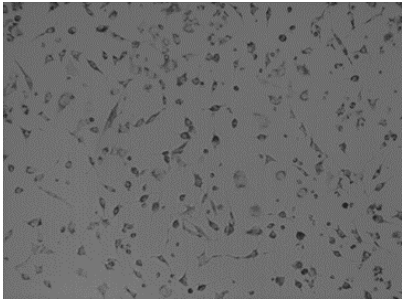
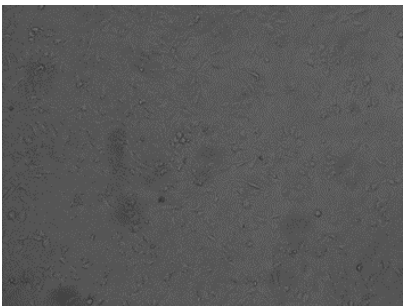
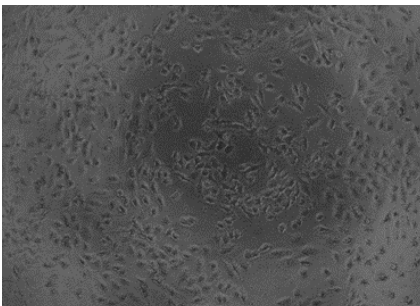
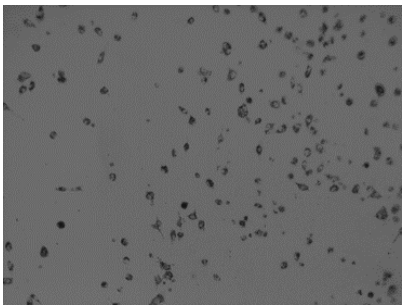
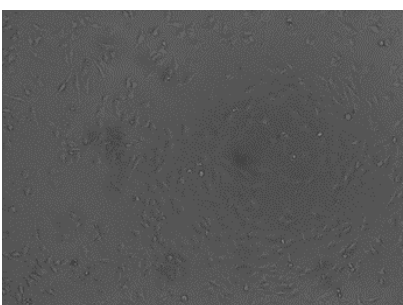
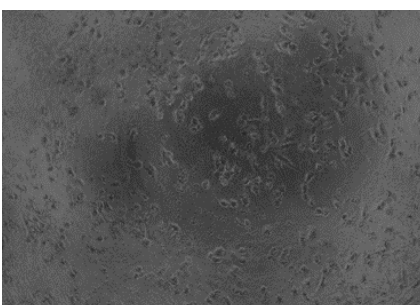
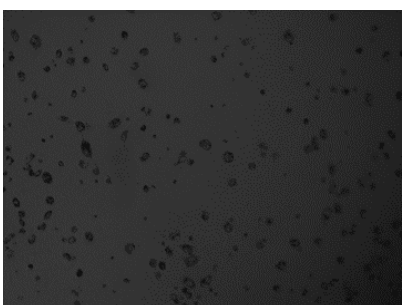
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
Unidad Xochimilco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE  
NEUROLOGÍA Y NEUROCIURGÍA  
MANUEL VELASCO SUÁREZ

**Línea celular de glioblastoma humano LN18 con extracto de lúpulo**

<b>Concentración</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>	<b>72 horas</b>
<i>Control</i>			
<i>0.15625 ug/ml</i>			
<i>0.3125 ug/ml</i>			
<i>0.625 ug/ml</i>			



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
Unidad Xochimilco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



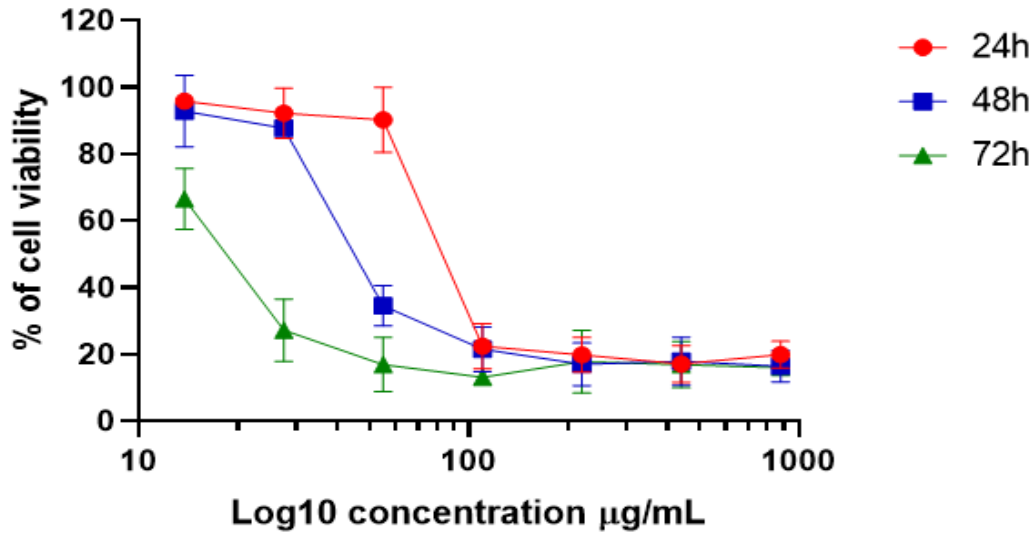
INSTITUTO NACIONAL DE  
NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA  
MANUEL VELASCO SUÁREZ

1.25 ug/ml			
2.5 ug/ml			
5 ug/ml			
10 ug/ml			

**Tabla 4.** Fotografías con microscopio de fluorescencia con cámara digital a color (Media Cybernetics Evolution VF-F-CLR-12-C) de la línea celular humana de glioblastoma humano LN18 con tratamiento de extracto de lúpulo (HopHaze) a un tiempo de 24,48 y 72 horas.

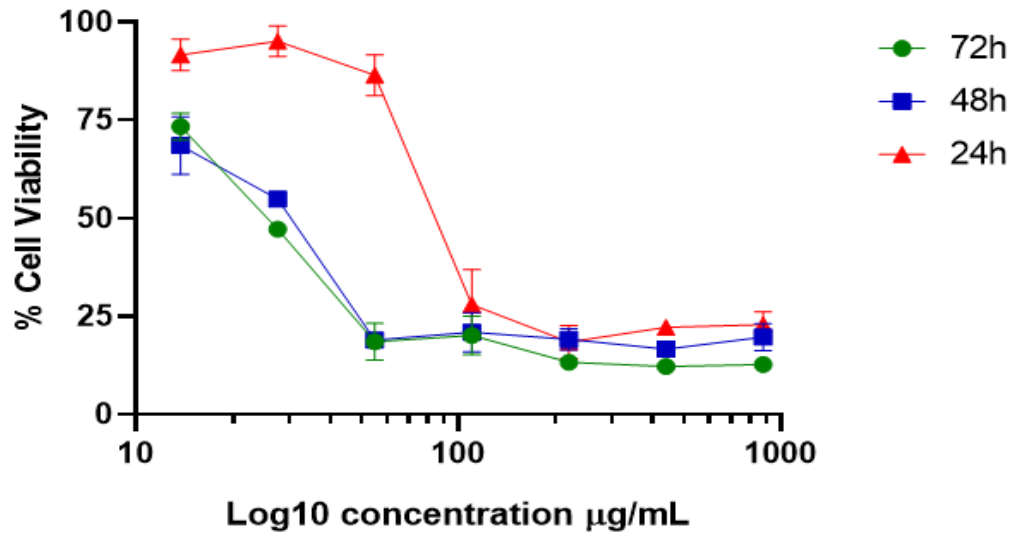


### U87



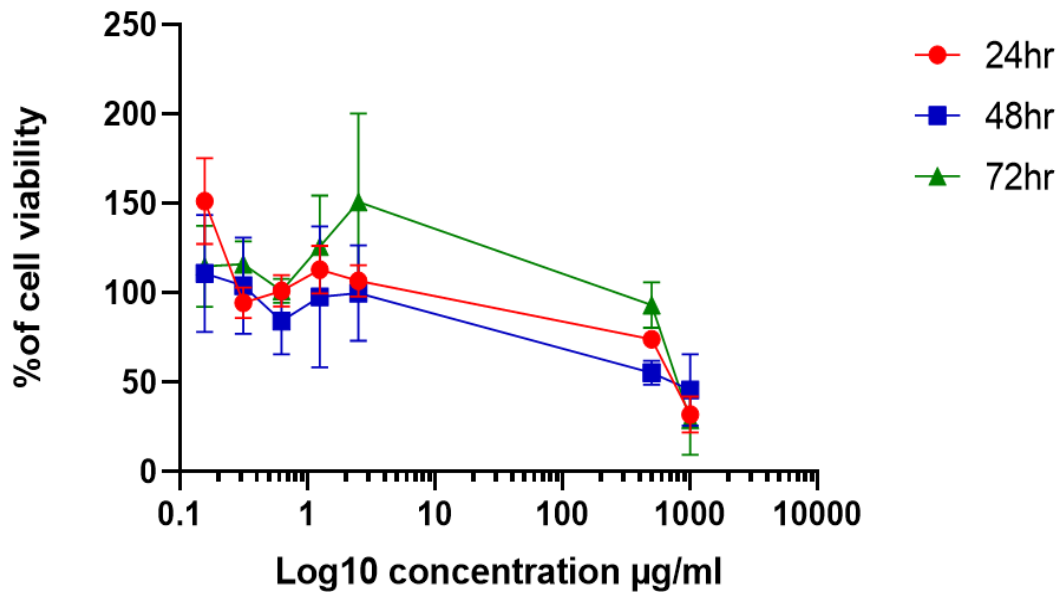
Gráfica 1. Ensayo de viabilidad celular (MTT) de la línea celular humana de glioblastoma humano U87 con tratamiento de extracto de lúpulo (HopHaze) a un tiempo de 24, 48 y 72 horas.

### A172



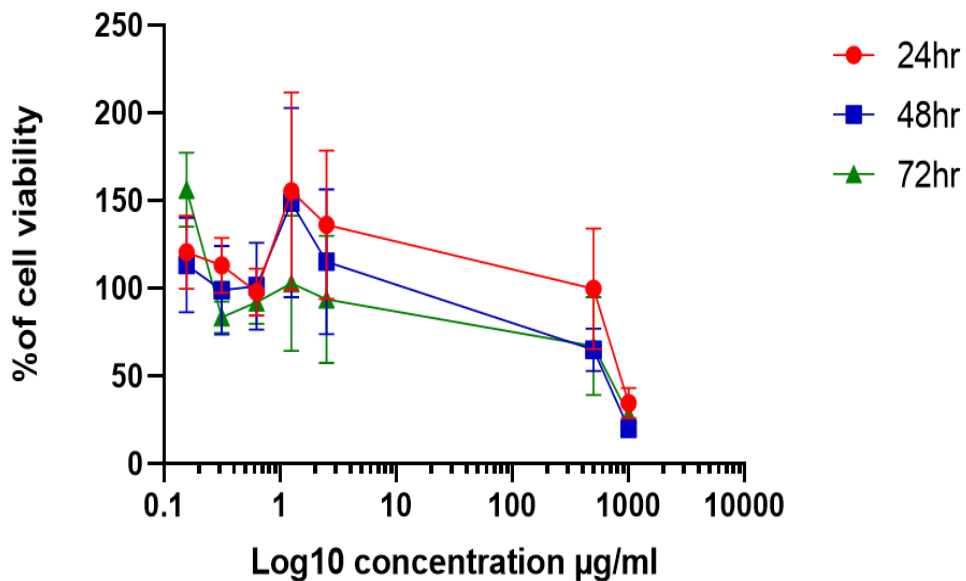
Gráfica 2. Ensayo de viabilidad celular (MTT) de la línea celular humana de glioblastoma humano A172 con tratamiento de extracto de lúpulo (HopHaze) a un tiempo de 24, 48 y 72 horas.

### U373



Gráfica 3. Ensayo de viabilidad celular (MTT) de la línea celular humana de glioblastoma humano U373 con tratamiento de extracto de lúpulo (HopHaze) a un tiempo de 24,48 y 72 horas

### LN18



Gráfica 4. Ensayo de viabilidad celular (MTT) de la línea celular humana de glioblastoma humano LN18 con tratamiento de extracto de lúpulo (HopHaze) a un tiempo de 24,48 y 72 horas.

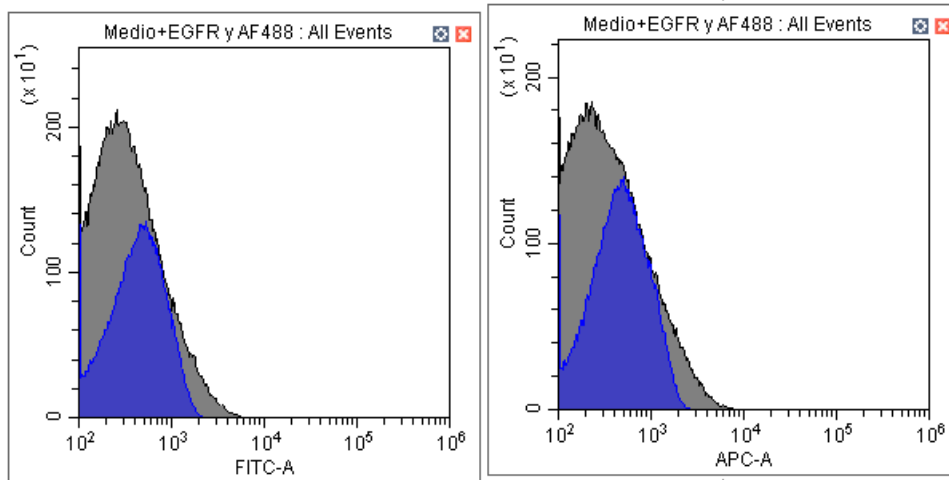
El extracto de lúpulo (*HopHaze*) es un producto derivado de 100% ingredientes de lúpulo desarrollado por diferentes técnicas para la extracción y aislamiento de componentes como sus metabolitos (alfa-isoácidos) y aceites esenciales utilizados para industrias cerveceras para darles diferentes propiedades a sus productos. Es producido a partir de un extracto de CO<sub>2</sub> de lúpulo (*Humulus lupulus*) con un pH de 10.5-11.5 y una concentración estándar de 10,0 % +/- 0,5 componentes de resina de lúpulo según su ficha técnica. (Hass et al. 2023)

Según las fotografías de las **tablas 1 y 2** (líneas U87 y A172) es posible observar que a medida de que se aumentan las concentraciones y el volumen de extracto de lúpulo (*HopHaze*) (siendo 10 µL la mayor) existe una mayor muerte de las células de glioblastoma y al disminuir la concentración y el volumen del extracto de lúpulo la viabilidad aumenta. Esto lo podemos confirmar al observar las **gráficas 1 y 2**, en las cuales se observa que en los tiempos de 24 y 48 horas la viabilidad celular en la menor concentración y volumen es más alta que en el tiempo de 72 horas, ya que hay una mayor interacción del extracto de lúpulo (*HopHaze*) con las células.

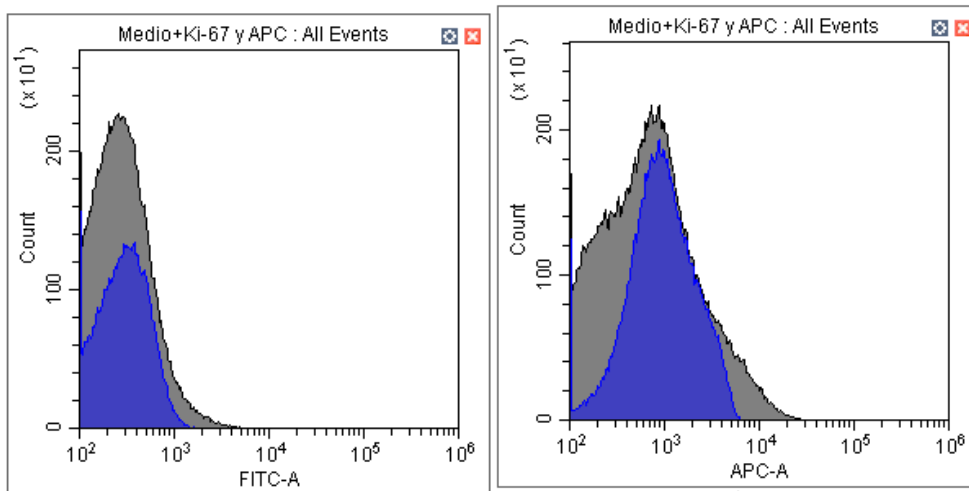
Al observar las fotografías de las **tablas 3 y 4** (líneas U373 y LN18) se observa también que existe una mayor muerte de las células al aumentar la concentración y volumen, mientras que la viabilidad aumenta al disminuir las concentraciones y volumen, aunque no pareciera funcionar de esta manera en todos los casos como se muestra en las **gráficas 3 y 4**; las cuales no se observa la curva esperada de viabilidad celular y en su caso existen subidas y bajadas, añadiendo que los experimentos por triplicado parecieran no tener una desviación estándar confiable, por lo que no podemos concluir que el extracto de lúpulo (*HopHaze*) esté realizando la citotoxicidad en las células de glioblastoma humano.

Con los resultados del ensayo de viabilidad utilizando bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) con tratamiento con extracto de lúpulo (*HopHaze*) se observa que las líneas U87 y A172 tuvieron el comportamiento esperado al presentar una curva definida, así como los triplicados no presentan una desviación estándar significativa, mostrando concordancia según la hipótesis planteada, por lo que estas dos líneas celulares se utilizaron para los experimentos

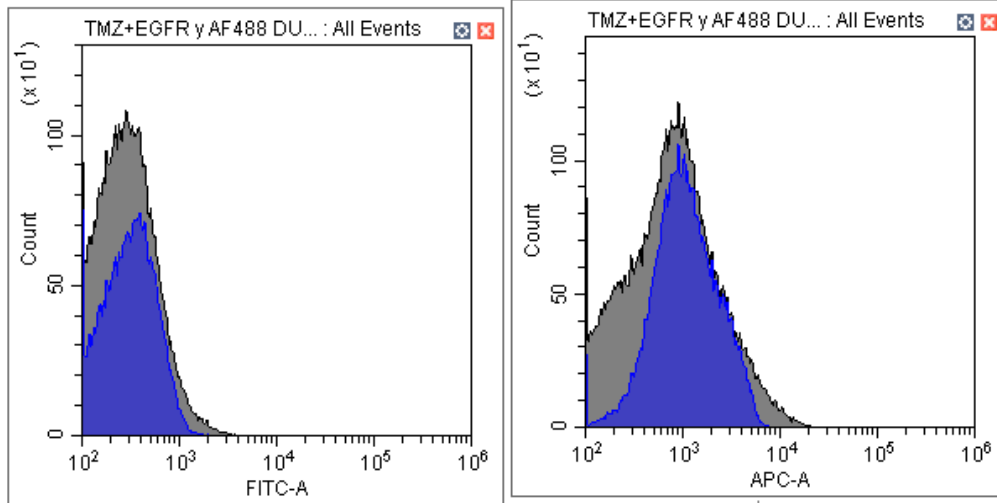
posteriores. Caso contrario con las líneas U373 y LN18, cuyos ensayos por triplicado muestran una desviación estándar mayor a lo esperado y no se observa una clara curva de viabilidad celular, por lo que se decide no continuar utilizando dichas líneas celulares para experimentos posteriores. Se recomienda realizar más experimentos o una modificación del protocolo al trabajar con estas líneas celulares y, que por falta de tiempo no se realizó.



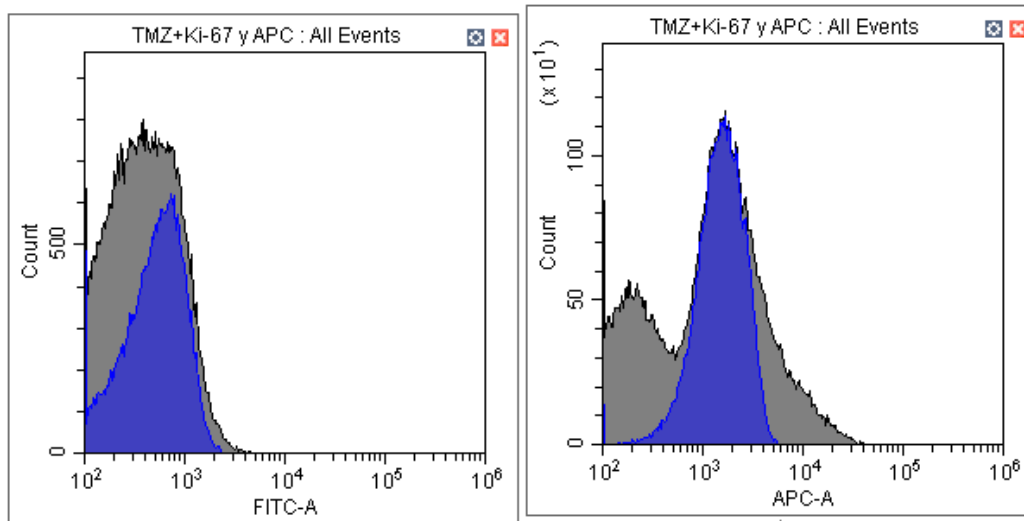
**Figura 4.** Histogramas de tinción con anticuerpos sin tratamiento (control) y el anticuerpo anti-EGFR (A11351, ABClona, USA) en la línea celular de glioblastoma U87.



**Figura 5.** Histogramas de tinción con anticuerpos con un tratamiento de temozolomida(TMZ) a 24 horas y el anticuerpo anti-Ki-67 (350513, Biolegend, USA) en la línea celular de glioblastoma U87.



**Figura 6.** Histogramas de tinción con anticuerpos con un tratamiento de temozolomida(TMZ) a 24 horas y el anticuerpo anti-EGFR (A11351, ABClonal, USA) en la línea celular de glioblastoma U87.

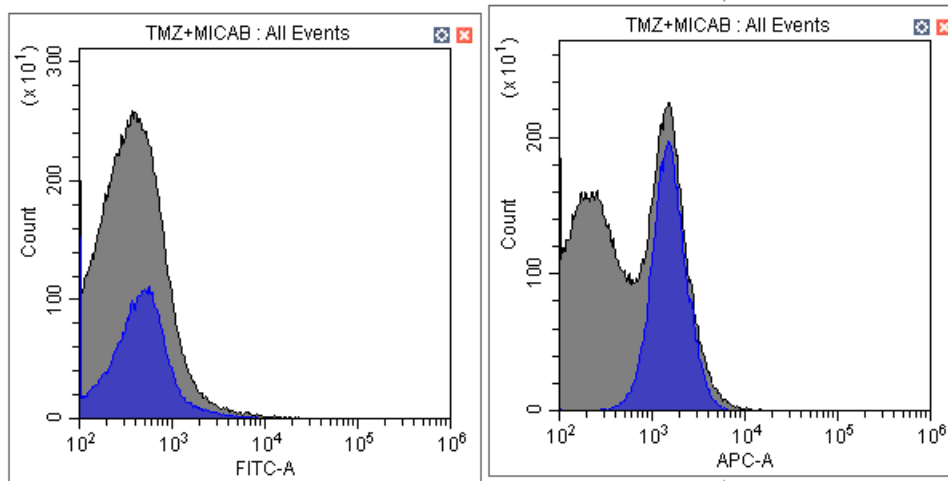


**Figura 7.** Histogramas de tinción con anticuerpos con un tratamiento de temozolomida(TMZ) a 24 horas y el anticuerpo anti-Ki-67 (350513, Biolegend, USA) en la línea celular de glioblastoma U87.

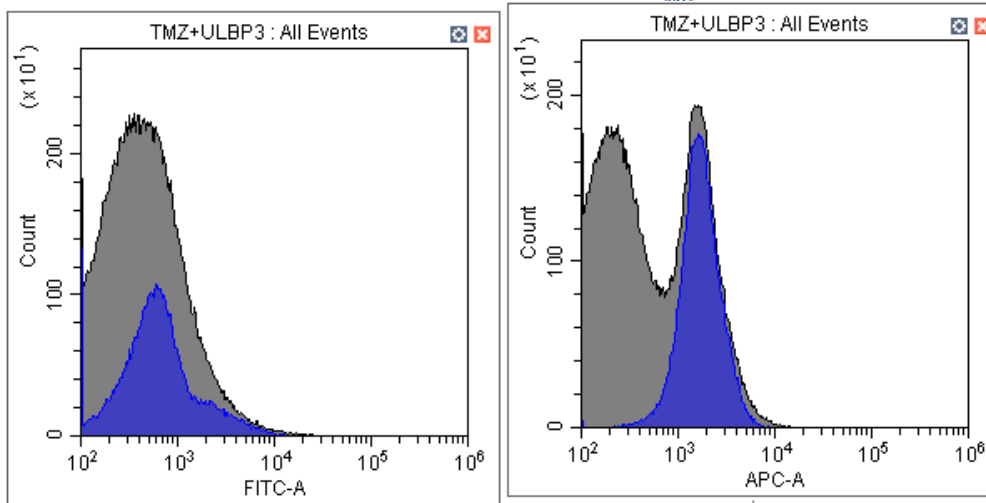
Las células de glioblastoma humano expresan varias moléculas inducibles por estrés que son detectadas por el receptor activador NKG2D (Jung et al. 2013), los ligandos para la NKG2D humana comprenden dos grupos de moléculas relacionadas con el MHC de clase I, las proteínas A y B relacionadas con la cadena del MHC de clase I (MICA/B) y seis miembros de la familia de proteínas de unión a UL16 (ULBP1-6) (Raulet et al. 2013). Según la literatura se menciona que existe una expresión de estos ligandos en células de glioblastoma humano y también cuando se les administra temozolomida (TMZ) utilizando citometría de flujo

(Chitadze et al., 2016), así que por los artículos realizados previamente se decide realizar el experimento utilizando los anticuerpos anteriormente mencionados.

Se utilizaron como controles los tubos sin tinción, los anticuerpos anti-EGFR (A11351, ABClonal, USA) ya que el que esté expresado nos indica que existe una amplificación en las células de glioblastoma y anti-Ki-67 (350513, Biolegend, USA) el cual nos indica que existe una proliferación celular, entonces lo esperado es que el medio que son células sin ningún tratamiento y las células con DMSO que al ser usado como vehículo no influye ningún daño a las células de glioblastoma así que los tratamientos que tienen este deben de estar expresados anti-EGFR (A11351, ABClonal, USA) y anti-Ki-67 (350513, Biolegend, USA) y esto puede verse observado en las **figuras 4 y 5**; sin embargo, las células que tienen el tratamiento con TMZ se debe de haber afectada la expresión de anti-EGFR (A11351, ABClonal, USA) y anti-Ki-67 (350513, Biolegend, USA) pues la concentración de TMZ que se utilizó es para llegar a una IC50, entonces no se esperaría ver una amplificación y una proliferación celular si la TMZ está sensibilizando y aumentando la expresión de los ligando de NKG2D (MICA/B Y ULBP1-6) a las células de glioblastoma humano, por lo que se puede observar en las **figuras 6 y 7**.

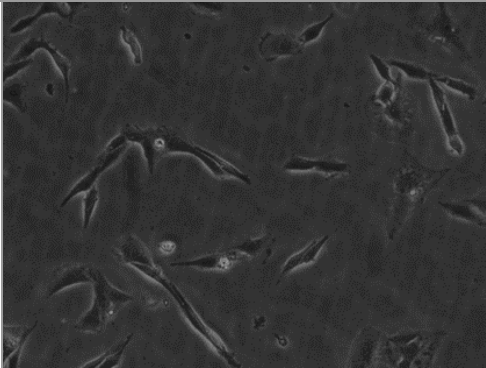
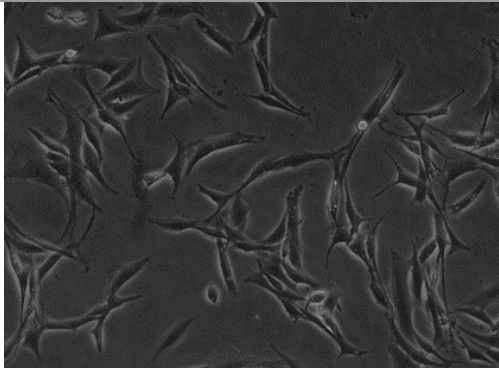
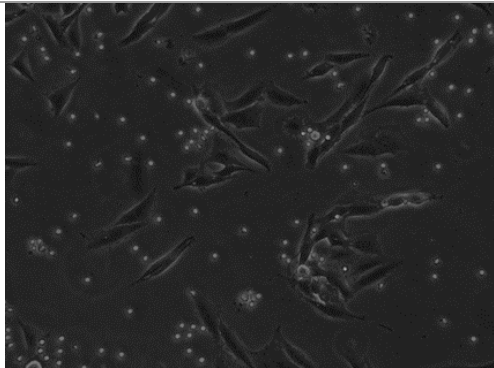
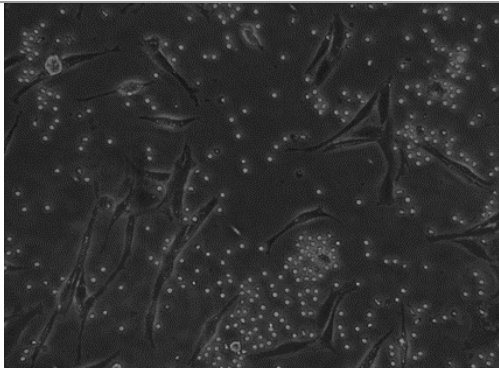
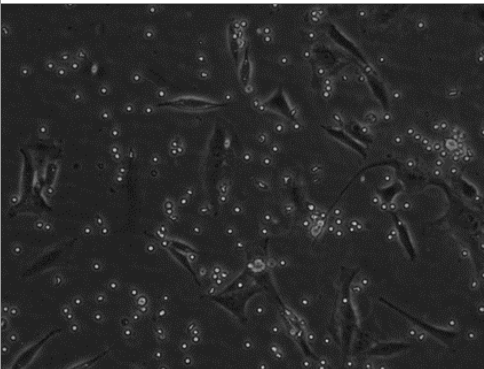
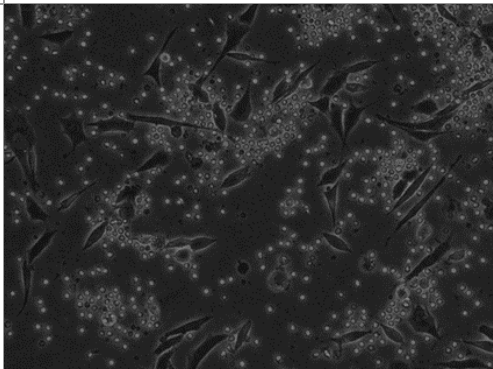


**Figura 8.** Histogramas de tinción con anticuerpos con un tratamiento de temozolomida(TMZ) a 24 horas y el anticuerpo anti-MICA/B (F-6) (sc-137242, Santa Cruz, USA) en la línea celular de glioblastoma U87.



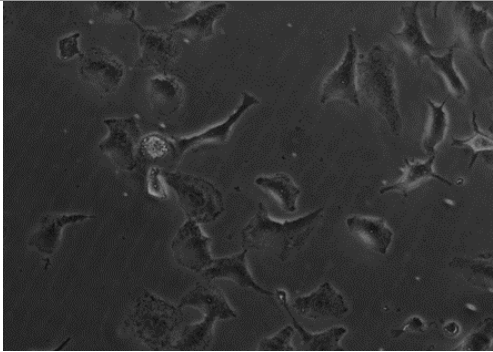
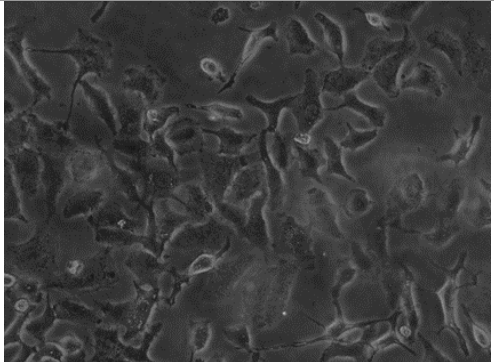
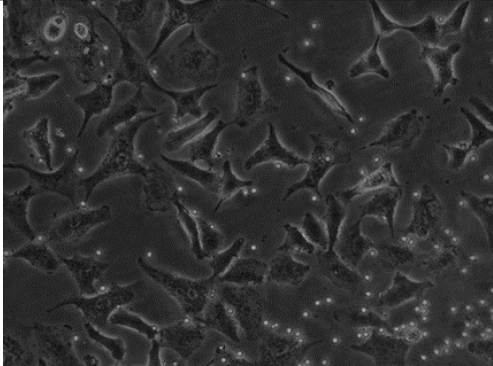
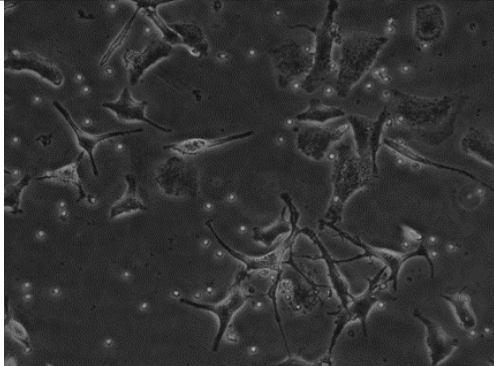
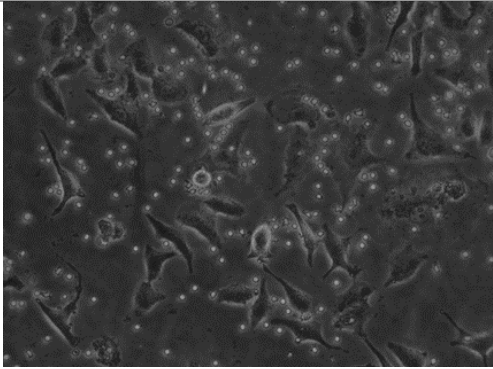
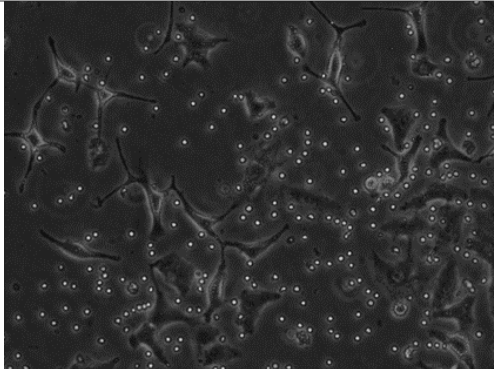
**Figura 9.** Histogramas de tinción con anticuerpos con un tratamiento de temozolomida(TMZ) a 24 horas y el anticuerpo anti-ULBP3 (D-1) (s-c390844, Santa Cruz, USA) en la línea celular de glioblastoma U87.

Para los anticuerpos anti-MICA/B (F-6) (sc-137242, Santa Cruz, USA) y anti-ULBP3 (D-1) (s-c390844, Santa Cruz, USA) se obtuvieron resultados en los que podemos observar que existe una ligera expresión de estos con el tratamiento de temozolomida, aunque en las **figuras 8 y 9** podemos observar la elongación de la curva hacia la derecha que podría indicarnos que sí existe esta expresión, se sugiere realizar más experimentos con estos anticuerpos que por falta de tiempo no se pudieron llevar a cabo. Y para los anticuerpos anti-ULBP1 (3F-1) (sc-53131, Santa Cruz, USA) y anti-ULBP2 (6F6) (sc-53135, Santa Cruz, USA) no fueron realizados para este experimento, ya que el laboratorio no contaba con anticuerpos secundarios para estos anticuerpos primarios, por lo que se pospone el experimento para comprobar si existe esta expresión de estos ligandos, y se sugiere realizar estos experimentos con estos anticuerpos que por falta de material y tiempo no se pudieron llevar a cabo.

Enfrentamiento de la línea celular de glioblastoma U87		
	Sin tratamiento	Con tratamiento de alfa-isoácidos 20 µg/mL
Control		
Relación 1 célula tumoral de glioblastoma: 3 células Natural Killer		
Relación 1 célula tumoral de glioblastoma: 5 células Natural Killer		

**Tabla 5.** Fotografías con microscopio de fluorescencia con cámara digital a color (Media Cybernetics Evolution VF-F-CLR-12-C) de la línea celular humana de glioblastoma humano U87 sin previo tratamiento y con tratamiento de alfa-isoácidos por un tiempo de 48 horas a una concentración 20 µg/mL, con células natural killer a una relación 1:3 y 1:5.



Enfrentamiento de la línea celular de glioblastoma A172		
	Sin tratamiento	Con tratamiento de alfa-isoácidos 20 µg/mL
Control		
Relación 1 célula tumoral de glioblastoma: 3 células Natural Killer		
Relación 1 célula tumoral de glioblastoma: 5 células Natural Killer		

**Tabla 6.** Fotografías con microscopio de fluorescencia con cámara digital a color (Media Cybernetics Evolution VF-F-CLR-12-C) de la línea celular humana de glioblastoma humano A172 sin previo tratamiento y con tratamiento de alfa-isoácidos por un tiempo de 48 horas a una concentración 20 µg/mL, con células natural killer a una relación 1:3 y 1:5.

Las células NK tienen una morfología definida como linfocitos grandes granulares, las cuales expresan CD56 que tienen una alta actividad citotóxica y expresan altas cantidades de perforina; además, expresan en alta densidad receptores que potencian su capacidad de responder frente a células anormales (Taborda et al, 2014). Tienen la capacidad de reconocer una célula con una transformación maligna y la destruyen, y no dañan a las células normales; la capacidad de distinguir entre células peligrosas en potencia y sanas del propio individuo depende de la expresión de receptores tanto inhibitorios como activadores. Los receptores inhibidores de las células NK reconocen las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad 1 (MHC-1) que se expresa de manera constitutiva en las células sanas del organismo, pero no suele expresarse en células cancerosas. Pero los de carácter activador reconocen estructuras presentes en las células susceptibles de ser un blanco para las células NK, así como en las normales, pero la vía inhibidora predomina cuando existe este reconocimiento de moléculas del MHC-1, aunque algunos receptores activadores reconocen moléculas de este complejo expresadas únicamente por aquellas células dañadas y las células NK destruyen las que estén en condiciones de expresar el MHC-1 (Abbas et al. 2009).

El receptor activador NKG2D está expresado por todas las células NK y subconjuntos de células T. Sirve como un importante receptor de reconocimiento para la detección y eliminación de células transformadas e infectadas, En algunos casos, la inducción del ligando se puede atribuir a vías que se activan específicamente en células cancerosas o células infectadas (Laskowski et al.2022) Como se mencionó anteriormente, NKG2D reconoce los ligandos MICA/B y ULBP(1-6) principalmente en células tumorales (Raulet et al. 2013) los cuales poseen dominios  $\alpha$  y  $\beta$  del MHC-1, tampoco presentan una expresión en las células normales, pero aumentan ante una agresión o alteración de DNA, y suelen estar presentes en las células tumorales. Por lo tanto, las células NK utilizan estos receptores para eliminar las células dañadas y las tumorales.

Para el enfrentamiento de las líneas celulares U87 y A172 según la **tabla 5 y 6** podemos observar la morfología de la células de glioblastoma ligeramente alargadas y más oscuras y también esferas blancas brillantes lo que pertenece a

las células NK, en los controles no fueron añadidas y por eso no se observan pero en las relaciones 1:3 y 1:5 podemos observar que existe un aumento significativo en la cantidad de células NK añadidas y específicamente en las que tienen el tratamiento añadido de alfa-isoácidos a una concentración de 20  $\mu\text{g}/\text{m}$ , al ser sensibilizadas las células de glioblastoma por alfa-isoácidos se puede observar estas células NK como parecieran acercarse a la célula de glioblastoma humano esto es porque suponemos que el receptor NKG2D encargado de unirse a una familia proteica del tipo del MHC-1 con una estructura a fin presente en las células de glioblastoma, lo que generaría que se activen las células NK y una vez activadas, las células NK citotóxicas liberarían perforinas y granzimas, induciendo la lisis de la célula. Las perforinas son proteínas que se integran a la membrana celular e inducen la formación de poros que provocan lisis osmótica de la célula blanco. Por su parte, las granzimas entran a la célula por medio de endocitosis e inducen apoptosis celular mediante la activación de caspasas. Sin embargo, se necesita repetir los experimentos y seguir en continuo estudio para comprobar si las células NK siguen este mecanismo, por último, se concluye que los parámetros clave que determinan la potencia y la persistencia de las células NK será importante a medida que el campo avance hacia el desarrollo de enfoques para abordar los desafíos específicos contra el glioblastoma.

## 7. CONCLUSIONES

Con los experimentos realizados se puede reafirmar la potencial aplicación biológica de compuestos como lo fue el extracto de lúpulo, alfa-isoácidos y temozolomida, utilizándolos en diferentes protocolos para el tratamiento de glioblastoma.

Las inmunoterapias celulares diseñadas continúan experimentando un gran crecimiento, con diversas modalidades que avanzan rápidamente desde los estudios preclínicos hasta las pruebas clínicas, las terapias basadas en células NK deben estar en continuo estudio para impulsar la función y la persistencia de las células NK endógenas, o para aumentar la sensibilidad tumoral a la citotoxicidad mediada por células NK.

Se necesita realizar más experimentos así como sus triplicados para poder decir que son resultados reproducibles y confiables, se necesita más tiempo para llevar a cabo las modificaciones necesarias en los protocolos para demostrar que las hipótesis son correctas, sin embargo creemos que estos resultados serán un impacto en la investigación científica contra el glioblastoma y podrán tener más alternativas para el tratamiento contra esta enfermedad, sin embargo los resultados obtenidos permiten que se continúen con estudios posteriores en el área de la investigación cerebral.

## **8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Abbas A.K. Lichtman A. H. y Pober J. S.(2009) "Inmunología celular y molecular".(6<sup>o</sup> Ed.) Sanunders-Elsevier.

Ahmed, F. E. (1995). "Toxicological effects of ethanol on human health." Crit Rev Toxicol 25(4): 347-367.

Bautista, A. P. (2001). "Free radicals, chemokines, and cell injury in HIV-1 and SIV infections and alcoholic hepatitis." Free Radic Biol Med 31(12): 1527-1532.

Boscolo, P., A. del Signore, E. Sabbioni, M. Di Gioacchino, L. Di Giampaolo, M. Reale, P. Conti, R. Paganelli and M. Giaccio (2003). "Effects of resveratrol on lymphocyte proliferation and cytokine release." Ann Clin Lab Sci 33(2): 226-231.

Boyum, A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, 97, 77.

Budec, M., O. Ciric, V. Koko and R. Asanin (1992). "The possible mechanism of action of ethanol on rat thymus." Drug Alcohol Depend 30(2): 181-185.

Bullwinkel, J.; Baron-Lühr, B.; Lüdemann, A.; Wohlenberg, C.; Gerdes, J. & Scholzen, T.(2006) Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J. Cell. Physiol.*, 206(3):624-35.

Cohen, S., D. A. Tyrrell, M. A. Russell, M. J. Jarvis and A. P. Smith (1993). "Smoking,

alcohol consumption, and susceptibility to the common cold." *Am J Public Health* 83(9): 1277-1283.

Cooper, M. A., T. A. Fehniger and M. A. Caligiuri (2001). "The biology of human natural killer-cell subsets." *Trends Immunol* 22(11): 633-640.

Crane, C. A., K. Austgen, K. Haberthur, C. Hofmann, K. W. Moyes, L. Avanesyan, L. Fong, M. J. Campbell, S. Cooper, S. A. Oakes, A. T. Parsa and L. L. Lanier (2014). "Immune evasion mediated by tumor-derived lactate dehydrogenase induction of NKG2D ligands on myeloid cells in glioblastoma patients." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(35): 12823-12828.

Champsaur, M. and L. L. Lanier (2010). "Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses." *Immunol Rev* 235(1): 267-285.

Chitadze, G., Lettau, M., Luecke, S., Wang, T., Janssen, O., Fürst, D., ... & Kabelitz, D. (2016). NKG2D-and T-cell receptor-dependent lysis of malignant glioma cell lines by human  $\gamma\delta$  T cells: Modulation by temozolomide and A disintegrin and metalloproteases 10 and 17 inhibitors. *Oncoimmunology*, 5(4), e1093276.

Diaz, L. E., A. Montero, M. Gonzalez-Gross, A. I. Vallejo, J. Romeo and A. Marcos (2002). "Influence of alcohol consumption on immunological status: a review." *Eur J Clin Nutr* 56 Suppl 3: S50-53.

Feins, S., Kong, W., Williams, E. F., Milone, M. C., & Fraietta, J. A. (2019). An introduction to chimeric antigen receptor (CAR) T-cell immunotherapy for human cancer. *American journal of hematology*, 94(S1), S3-S9.

Gaspar, M., Bovaira, M., Carrera-Hueso, F. J., Querol, M., Jiménez, A., & Moreno, L. (2012). Efectividad de un protocolo de tratamiento tópico con dimetilsulfóxido al 50% en el síndrome de dolor regional complejo tipo 1. *Farmacia Hospitalaria*, 36(5), 385-391.

Guerra, N., Y. X. Tan, N. T. Joncker, A. Choy, F. Gallardo, N. Xiong, S. Knoblaugh, D. Cado, N. M. Greenberg and D. H. Raulet (2008). "NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy." *Immunity*

Hass, J. (04 de agosto de 2023). *HopHaze. Technical Data Sheet* [archivo PDF].

John I. Hass. [http://www.johnihaas.com/wp-content/uploads/2022/07/HAAS\\_TechSpecs\\_HopHaze\\_TDS.pdf](http://www.johnihaas.com/wp-content/uploads/2022/07/HAAS_TechSpecs_HopHaze_TDS.pdf)

Iannello, A. and D. H. Raulet (2014). "Immunosurveillance of senescent cancer cells by natural killer cells." *Oncoimmunology* 3(1): e27616.

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (2023) *¿Qué hacemos?. Gobierno de México.* <https://www.gob.mx/salud%7Cinnn/que-hacemos>

Jin, H., & Kim, H. J. (2021). NK cells lose their cytotoxicity function against cancer stem cell-rich radiotherapy-resistant breast cancer cell populations. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9639.

Jung, T. Y., Choi, Y. D., Kim, Y. H., Lee, J. J., Kim, H. S., Kim, J. S., ... & Cho, D. (2013). Immunological characterization of glioblastoma cells for immunotherapy. *Anticancer research*, 33(6), 2525-2533.

Kawai, T. and S. Akira (2006). "TLR signaling." *Cell Death Differ* 13(5): 816-825.

Khong, H. T. and N. P. Restifo (2002). "Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes." *Nat Immunol* 3(11): 999-1005.

Komori, T. (2017). "The 2016 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: The Major Points of Revision." *Neurol Med Chir (Tokyo)* 57(7): 301-311.

Laskowski, T. J., Biederstädt, A., & Rezvani, K. (2022). Natural killer cells in antitumour adoptive cell immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 22(10), 557-575.

MacGregor, R. R. (1986). "Alcohol and immune defense." *JAMA* 256(11): 1474-1479.

Mandrekar, P., D. Catalano, B. White and G. Szabo (2006). "Moderate alcohol intake in humans attenuates monocyte inflammatory responses: inhibition of nuclear regulatory factor kappa B and induction of interleukin 10." *Alcohol Clin Exp Res* 30(1): 135-139.

Mendenhall, C. L., S. A. Theus, G. A. Roselle, C. J. Grossman and S. D. Rouster (1997). "Biphasic in vivo immune function after low- versus high-dose alcohol consumption." *Alcohol* 14(3): 255-260.

Messaoudi, I., S. Pasala and K. Grant (2014). "Could moderate alcohol intake be recommended to improve vaccine responses?" *Expert Rev Vaccines* 13(7): 817-819.

Meyer, M. A. (2008). "Malignant gliomas in adults." *N Engl J Med* 359(17): 1850; author reply 1850.

Nardini, M., F. Natella, C. Scaccini and A. Ghiselli (2006). "Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans." *J Nutr Biochem* 17(1): 14-22.

Orr, M. T. and L. L. Lanier (2010). "Natural killer cell education and tolerance." *Cell* 142(6): 847-856.

Perez, R. S., Zuurmond, W. W. A., Bezemer, P. D., Kuik, D. J., Van Loenen, A. C., De Lange, J. J., & Zuidhof, A. J. (2003). The treatment of complex regional pain syndrome type I with free radical scavengers: a randomized controlled study. *Pain*, 102(3), 297-307

Raulet, D. H., S. Gasser, B. G. Gowen, W. Deng and H. Jung (2013). "Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor." *Annu Rev Immunol* 31: 413-441.

Romeo, J., J. Warnberg, L. E. Diaz, M. Gonzalez-Gross and A. Marcos (2007). "Effects of moderate beer consumption on first-line immunity of healthy adults." *J Physiol Biochem* 63(2): 153-159.

Romeo, J., J. Warnberg, E. Nova, L. E. Diaz, M. Gonzalez-Gross and A. Marcos (2007). "Changes in the immune system after moderate beer consumption." *Ann Nutr Metab* 51(4): 359-366.

Sepulveda, C., & Puente, J. (2000). Natural killer cells and the innate immune system in infectious pathology. *Revista Médica de Chile*, 128(12), 1361-1370.

Szabo, G. (1998). "Monocytes, alcohol use, and altered immunity." *Alcohol Clin Exp Res* 22(5 Suppl): 216S-219S.

Szabo, G. (1999). "Consequences of alcohol consumption on host defense." *Alcohol* 34(6): 830-841.

Taborda, N. A., Hernández, J. C., Montoya, C. J., & Rugeles, M. T. (2014). Las células natural killer y su papel en la respuesta inmunitaria durante la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo-1. *Inmunología*, 33(1), 11-20.

Vinson, J. A., M. Mandarano, M. Hirst, J. R. Trevithick and P. Bose (2003). "Phenol antioxidant quantity and quality in foods: beers and the effect of two types of beer on an animal model of atherosclerosis." *J Agric Food Chem* 51(18): 5528-5533.

Zhang, P., G. J. Bagby, K. I. Happel, C. E. Raasch and S. Nelson (2008). "Alcohol abuse, immunosuppression, and pulmonary infection." *Curr Drug Abuse Rev* 1(1): 56-67.

Zhou, W., Liu, L., Xue, Y., Zheng, J., Liu, X., Ma, J., ... & Liu, Y. (2017). Combination of endothelial-monocyte-activating polypeptide-II with temozolomide suppress malignant biological behaviors of human glioblastoma stem cells via miR-590-3p/MACC1 inhibiting PI3K/AKT/mTOR signal pathway. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 68.