

---

This is the **published version** of the master thesis:

Crespo Hereu, Mercedes; Candiota Silveira, Ana Paula , dir.; Fernández Cabada, Tamara dir. De 2D a 3D: cómo la arquitectura tumoral modula la respuesta a temozolomida e inmunogenicidad en el modelo de glioblastoma GL261. 2025. 32 pag. (Màster Universitari en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina)

---

This version is available at <https://ddd.uab.cat/record/320199>

under the terms of the  license

# **De 2D a 3D: cómo la arquitectura tumoral modula la respuesta a temozolomida e inmunogenicidad en el modelo de glioblastoma GL261**

Mercedes Crespo Hereu

Trabajo de Fin de Máster

Tutoras: Ana Paula Candiota Silveira / Tamara Fernández Cabada

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (UAB)

Máster en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Fecha de entrega: 04/09/2025

## Resumen

El glioblastoma (GB) es el tumor cerebral primario más agresivo en adultos. Su elevada heterogeneidad, la infiltración difusa y un microambiente tumoral intensamente inmunosupresor explican el mal pronóstico y las recaídas casi inevitables. La temozolomida (TMZ) sostiene el estándar terapéutico; puede modular la inmunidad antitumoral mediante muerte celular inmunogénica (*Immunogenic cell death*, ICD), en la que señales como exposición de calreticulina (CRT), liberación de ATP y *High Mobility Group Box 1* (HMGB1) actúan como activadores del sistema inmune. En paralelo, el avance preclínico exige modelos que reproduzcan mejor la fisiología tumoral: los esferoides tridimensionales de GL261 se proponen como alternativa a la monocapa 2D, al recrear gradientes, contactos célula-célula y heterogeneidad espacial.

El trabajo contrasta la respuesta a TMZ en 2D y 3D, poniendo el foco en viabilidad e inmunogenicidad. De forma global, la transición a 3D genera esferoides compactos y viables. Consideradas en conjunto, las preparaciones 2D y 3D muestran una susceptibilidad comparable tras exposiciones largas, con ligera tendencia a mayor preservación de viabilidad en 3D atribuible a gradientes de penetración, oxígeno y nutrientes. Las señales de ICD analizadas exhiben cambios discretos y dependientes del tiempo: la exposición de CRT aparece de forma modesta y transitoria, el ATP tiende a aumentar en fases tempranas y a disminuir más tarde y el HMGB1 puede elevarse inicialmente y decaer con el progreso del daño.

En conjunto, el 3D aporta valor biológico aun con diferencias modestas frente al 2D y se perfila como plataforma útil a seguir optimizando. Evaluaciones integradas (teniendo en cuenta la sinergia entre señales) y con mayor resolución temporal, junto con la incorporación de otras señales inmunogénicas, podrían capturar mejor la inmunogenicidad relevante. Observaciones preliminares internas sugieren, además, que los esferoides implantados reproducen rasgos *in vivo*, reforzando su potencial traslacional.

Palabras clave: Glioblastoma, Temozolomida, Muerte celular inmunogénica, DAMPs, Calreticulina, ATP, HMGB1, Esferoides 3D.

## Abreviaturas

- **GB:** Glioblastoma (glioblastoma).
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- **SNC:** Sistema Nervioso Central.
- **BHE:** Barrera hematoencefálica.
- **TME:** *Tumor Microenvironment*.
- **MEC:** Matriz extracelular.
- **GSC:** *Glioma Stem Cells*.
- **TAM:** *Tumor-Associated Macrophages*.
- **NK:** *Natural Killer*.
- **DC:** *Dendritic Cells*.
- **IDH:** Isocitrato deshidrogenasa.
- **MGMT:** O<sup>6</sup>-metilguanina-ADN metiltransferasa.
- **MMR:** *Mismatch Repair*.
- **TMZ:** Temozolomida.
- **MTIC:** 5-(3-metil-1-triazeno)imidazol-4-carboxamida.
- **O<sup>6</sup>-MeG:** O<sup>6</sup>-metilguanina.
- **ICD:** *Immunogenic Cell Death*.
- **DAMPs:** *Damage-Associated Molecular Patterns*.
- **PRRs:** *Pattern Recognition Receptors*.
- **TLR4:** *Toll-like receptor 4*.
- **RAGE:** *Receptor for Advanced Glycation End-products*.
- **CRT:** Calreticulina.
- **ATP:** Adenosín trifosfato.
- **HMGB1:** *High Mobility Group Box 1*.
- **P2RX7:** Receptor purinérgico P2X7.
- **NLRP3:** *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*.
- **IL-1 $\beta$ :** Interleucina-1 beta.
- **HIF-1:** *Hypoxia-Inducible Factor 1*.
- **ROS:** *Reactive Oxygen Species*.
- **DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*.
- **DMEM/F12:** Mezcla DMEM con Ham's F-12.
- **FBS:** *Fetal Bovine Serum*.
- **PBS:** *Phosphate-Buffered Saline*.
- **EGF:** *Epidermal Growth Factor*.
- **FGF:** *Fibroblast Growth Factor*.
- **B27:** Suplemento B27 (sin vitamina A).
- **DMSO:** Dimetilsulfóxido.
- **PFA:** Paraformaldehído.
- **BSA:** *Bovine Serum Albumin*.
- **FACS:** *Fluorescence-Activated Cell Sorting*.
- **FSC:** *Forward Scatter*.
- **SSC:** *Side Scatter*.
- **UV:** Ultravioleta
- **PE:** *Phycoerythrin*.
- **IC<sub>50</sub>:** Concentración inhibitoria media al 50%.
- **SEM:** *Standard Error of the Mean*.
- **ANOVA:** *Analysis of Variance*.
- **4PL:** *Four-Parameter Logistic*.

## Índice

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	4
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
3.1. Conversión de cultivos 2D a 3D.....	5
3.2. Tratamiento celular.....	5
3.3. Ensayos de viabilidad celular.....	6
3.4. Evaluación de la liberación/exposición de DAMPs .....	6
3.4.1. Citometría para detectar exposición de CRT en membrana .....	7
3.4.2. Luminiscencia para detectar la liberación de ATP .....	7
3.4.3. Luminiscencia para detectar la liberación de HMGB1 .....	7
3.5. Análisis estadístico .....	8
4. RESULTADOS .....	8
4.1. Transición del modelo 2D a 3D: cambios morfológicos .....	8
4.2. Efectos de la TMZ sobre la viabilidad celular en GL261 3D.....	9
4.3. Liberación de señales inmunogénicas.....	11
4.3.1. Exposición de CRT en la membrana .....	11
4.3.2. Liberación de ATP.....	14
4.3.3. Liberación de HMGB1.....	16
5. DISCUSIÓN.....	17
6. CONCLUSIÓN .....	22
7. BIBLIOGRAFÍA.....	24

## 1. INTRODUCCIÓN

El glioblastoma (GB) es una neoplasia primaria del sistema nervioso central que se origina en el tejido glial. Según la OMS (5ª clasificación del 2021), se clasifica como un glioma difuso de tipo adulto, de origen astrocítico, isocitrato deshidrogenasa (IDH) wildtype, de grado 4 [1]. Es el tumor cerebral primario más agresivo en adultos. Combina crecimiento maligno con invasión del parénquima y una marcada heterogeneidad inter e intratumoral, lo que favorece la resistencia al tratamiento y un pronóstico desfavorable [2], [3]. En la práctica clínica se reconoce como un tumor sólido, intraaxial, generalmente supratentorial y de recurrencia inevitable [3], [4]. Histológica y funcionalmente, el GB muestra polimorfismo celular, atipia nuclear, alto índice mitótico, necrosis pseudoempalizada (unas bandas de células que parecen alinearse rodeando focos de necrosis o hipoxia), e hiperplasia microvascular o neovascularización. Es un tumor hipóxico y protrombótico que induce neovascularización compensatoria, lo que acelera su progresión [3], [5].

El GB presenta una incidencia anual de 3,2 casos por 100.000 habitantes, es más frecuente en hombres y aumenta con la edad, alcanzando su pico entre los 75 y 84 años [6]. Dentro de los tumores del sistema nervioso central (SNC), el GB representa alrededor del 14% de los tumores primarios y un 47,7% de los malignos [7]. Aunque menos frecuente que otros cánceres, su pronóstico es muy desfavorable: sigue siendo incurable, con supervivencias medias que rondan 12–15 meses y una supervivencia a 5 años de aproximadamente el 5% [2], [5], [8]. Respecto a los factores de riesgo, no hay asociaciones concluyentes; sin embargo, existe evidencia de asociación con algunos síndromes genéticos poco frecuentes y con la exposición a radiación ionizante, especialmente en pacientes irradiados durante la infancia [5]. Todo esto contribuye a un diagnóstico tardío, habitualmente tras la aparición de clínica, la cual incluye cefalea, convulsiones y deterioro cognitivo o del lenguaje. El conjunto de estos síntomas requiere atención sanitaria, elevando la carga al sistema sanitario [9]. Actualmente no existen estrategias de cribado, y la resonancia magnética es el método de referencia para la evaluación por imagen [10].

El microambiente tumoral (TME, por sus siglas en inglés, *tumor microenvironment*) del GB, altamente dinámico y complejo, desempeña un papel clave en el crecimiento tumoral, la invasión del parénquima y la respuesta al tratamiento. Está formado por, además de matriz extracelular (MEC) y líquido intersticial, una serie de células no neoplásicas (células gliales, endotelio y sobre todo poblaciones inmunes) que se organizan en nichos anatómicos donde se concentran células madre de glioma (GSC, por sus siglas en inglés, *glioma stem cells*) resistentes a terapia [11]. En este entorno, los macrófagos asociados a tumor (TAM, por sus siglas en inglés, *tumor-associated macrophages*) son la población inmune dominante, procedente tanto de la microglía residente como de células mieloides periféricas. Los TAM representan hasta un 40% de las células del GB, y aunque genéticamente estables, reprograman su expresión en respuesta a señales tumorales, promoviendo proliferación, inmunosupresión, edema y resistencia a quimio-radioterapia [12], [13]. El GB, además, se considera un “tumor frío”: es poco inmunogénico, con baja carga mutacional y escaso infiltrado de linfocitos T, lo que refuerza un TME altamente

inmunosupresor [5]. En paralelo, el tumor es difuso e infiltrativo, se acopla a vasos y circuitos neuronales y se rodea de microglía, oligodendrocitos, astrocitos, pericitos y estroma en un contexto edematoso [3]. Esta interdependencia se da mediante factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas, componentes de la MEC, señales angiogénicas y permeabilidad vascular, y se asocia con peor pronóstico por mecanismos como transferencia mitocondrial desde astrocitos, remodelado de circuitos neuronales e inmunosupresión; además, el tratamiento actual basado en cirugía, radioterapia y quimioterapia pueden favorecer la aparición de fenotipos más agresivos en la recaída [2]. La remodelación de la MEC, junto con la hipoxia y la acumulación de adenosina, impulsa la invasión y preserva fenotipos “*stem-like*”, promoviendo migración, resistencia al tratamiento y progresión tumoral; este microambiente, controlado por el tumor, ayuda a entender por qué el tratamiento es tan difícil y la recaída casi inevitable [14]. El GB es heterogéneo y esa variabilidad se entrelaza con la del TME: en el núcleo predominan nichos perivasculares e hipóxicos y en la periferia un nicho invasivo, entendidos como microambientes celulares que sostienen y modulan el comportamiento tumoral. La composición inmunitaria, con predominio de TAM/microglía sobre linfocitos T/NK, convierte el diálogo tumor-TME en un motor de progresión, resistencia y recaída [11], [15].

El tratamiento estándar del GB comienza con una resección máxima segura, es decir, aquella en la que se extirpa la mayor cantidad posible de tumor sin comprometer funciones neurológicas críticas, seguida de radioterapia y quimioterapia con temozolomida (TMZ) concomitantes seguidas de seis ciclos de TMZ adyuvante. Este enfoque, conocido como “protocolo de Stupp”, proporciona un aumento significativo (aunque modesto) de la supervivencia frente a la radioterapia sola y se ha consolidado como estándar en la práctica clínica [16], [17]. La cirugía permite descompresión, obtención de tejido para la determinación del grado histopatológico y perfil molecular y la reducción tumoral, pero la infiltración difusa y la enfermedad microscópica residual impiden la erradicación completa del tumor; de hecho, la recurrencia local es normal pese a resecciones macroscópicamente completas y suele aparecer a medio plazo [18]. La quimiorradioterapia con TMZ fue capaz de mejorar la supervivencia global de 12,1 a 14,6 meses en comparación a la radioterapia sola [16]. Aun así, el GB sigue siendo incurable, con recurrencia prácticamente inevitable y a menudo más agresiva tras el tratamiento [2]. Este mal pronóstico se debe a varias limitaciones: la alta capacidad de difusión e invasión del tumor, la dificultad de extirparlo o irradiarlo sin dañar tejido sano, la barrera hematoencefálica (BHE) que limita la llegada de fármacos y la resistencia al tratamiento, tanto inicial como adquirida [2], [17].

La TMZ es el agente alquilante de referencia en el estándar de tratamiento del GB. Se trata de un profármaco lipofílico que atraviesa la BHE, se activa a pH fisiológico para generar el metabolito activo 5-(3-metil-1-triazeno)imidazol-4-carboxamida (MTIC) y produce metilación en el ADN, con una primera lesión citotóxica en O6-metilguanina (O6-MeG). Los aductos N7-metilguanina, N3-metilguanina y N3-metiladenina también contribuyen a la citotoxicidad, desencadenando desajustes, roturas de cadena, detención del ciclo y muerte celular (apoptosis o senescencia) [19], [20], [21], [22]. El estado de O6-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT) es

el biomarcador más reconocido que se relaciona con la respuesta a dicho fármaco. MGMT es una enzima que repara el ADN dañado por la TMZ. La metilación del promotor de MGMT es un cambio epigenético que reduce la expresión de la enzima, haciendo que las células tumorales sean más sensibles a la TMZ. Por lo tanto, la metilación del promotor se asocia a mejor respuesta a alquilantes y mayor supervivencia del paciente, mientras que, si el promotor de MGMT no está metilado, la célula tumoral puede reparar el daño causado por la TMZ y la respuesta al tratamiento puede ser menor [23]. En la línea GL261, la expresión basal de MGMT se ha descrito como relativamente débil, lo que podría influir en su sensibilidad a TMZ [24].

A pesar de la cirugía, la radioterapia y la TMZ, el GB mantiene una supervivencia limitada con una elevada frecuencia de recidivas, lo que hace imprescindible entender cómo las terapias moldean al tumor y cómo aprovechar la inmunidad antitumoral. Un marco útil es la muerte celular inmunogénica (ICD, por sus siglas en inglés, *immunogenic cell death*): una forma regulada de muerte que, además de destruir células, desencadena señales de peligro (DAMPs, por sus siglas en inglés, *damage-associated molecular patterns*) capaces de activar la inmunidad innata y adaptativa contra antígenos tumorales [25].

En la ICD destacan tres eventos clave que, aunque no son los únicos, sí son los más consensuados y descritos en la literatura. El primero es la exposición preapoptótica de calreticulina (CRT) en la membrana plasmática, que funciona como señal de “*eat-me*”. Esta externalización desde el retículo endoplasmático, convierte a la CRT en un marcador que facilita el reconocimiento de las células tumorales estresadas por parte de células dendríticas y macrófagos, promoviendo su fagocitosis y la posterior presentación de antígenos tumorales [25], [26]. El segundo evento es la secreción preapoptótica de ATP, que actúa como señal de “*find-me*”. Además de atraer células inmunes al foco tumoral mediante receptores purinérgicos (como P2RX7), el ATP liberado estimula la activación del inflamasoma NLRP3 y la producción de IL-1 $\beta$ , una citoquina clave en la activación y expansión de linfocitos T específicos frente al tumor [25], [26]. El tercer evento es la liberación tras la muerte celular de *High Mobility Group Box 1* (HMGB1), una proteína nuclear que, al salir al microambiente extracelular, actúa como DAMP. HMGB1 se une a receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés, *pattern recognition receptors*) como TLR4 y RAGE, en células presentadoras de antígenos, lo que potencia su maduración, aumenta la expresión de moléculas coestimuladoras y refuerza la presentación de antígenos tumorales a linfocitos T [25], [27].

En modelos preclínicos de GB existen evidencias que vinculan estos eventos con la terapia [28]. La TMZ, además de su efecto citotóxico, puede modular el sistema inmune regulando al alza señales tipo DAMP (CRT, ATP y HMGB1), lo que estimula células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés, *dendritic cells*) y macrófagos, amplificando la respuesta inmune antitumoral y creando oportunidades de sinergia con la inmunoterapia [29], [30]. Aunque en la práctica clínica los protocolos suelen perseguir la máxima dosis tolerada con el objetivo principal de eliminar el mayor número posible de células tumorales sin comprometer al paciente, la liberación de



antígenos y DAMPs que se produce en este contexto podría, en cierto grado, explicar sinergias observadas y orientar el diseño de futuras combinaciones terapéuticas [25], [29].

El modelo murino GL261 es uno de los más utilizados en investigación preclínica de glioblastoma porque reproduce rasgos clave de los gliomas y permite evaluar con eficacia distintas modalidades terapéuticas, aunque se reconoce que presenta divergencias a nivel molecular y mutacional respecto a los tumores humanos [31], [32]. El avance terapéutico en GB depende de modelos que reproduzcan de forma fiable la biología y el TME. La carencia de modelos preclínicos plenamente fieles hace que la traslación produzca resultados limitados. Con el objetivo de entender mejor los mecanismos biofísicos/biomoleculares, estudiar fármacos y optimizar biomarcadores [33], [34] se ha impulsado el uso del cultivo celular *in vitro*. El cultivo 2D ha dominado históricamente por su simplicidad, bajo coste y alta reproducibilidad. En ciertos contextos, puede reflejar rasgos genéticos del tumor y permitir ensayos funcionales útiles; sin embargo, distorsiona interacciones célula–célula y célula–matriz, altera la morfología, la polaridad y la división, además de estar expuesto homogéneamente a oxígeno y nutrientes, alejándose de los gradientes propios de una masa tumoral [34].

Para aproximarse mejor a la fisiología tumoral, los modelos tridimensionales (3D) buscan restaurar las interacciones celulares, ya que preservan tanto la morfología como la polaridad y generan gradientes de oxígeno y nutrientes que condicionan una proliferación periférica y apoptosis/necrosis centrales similares a los tumores sólidos *in vivo*. A nivel molecular, los cultivos 3D se acercan más a la topología, expresión génica, señalización y metabolismo observados *in vivo*, y el incremento de dimensionalidad de la MEC de 2D a 3D puede modular de forma marcada la proliferación, la diferenciación, las respuestas mecánicas y la supervivencia celular [33], [34]. Dentro de estas plataformas, los esferoides en suspensión permiten observar estructuras tridimensionales con rapidez y facilitan la recuperación celular para ensayos posteriores [34].

En este contexto, planteamos que el modo en que la TMZ activa señales inmunogénicas depende de cómo el modelo experimental reproduzca los nichos y gradientes propios del tumor. Dado que los cultivos 3D simulan mejor la arquitectura y la fisiología que los sistemas 2D, se utilizan como modelos intermedios entre 2D y modelos animales, por lo que resulta necesario evaluar si en cultivo 3D la TMZ desencadena una respuesta inmunogénica diferencial. Por ello, este trabajo se enfocará en caracterizar los efectos de la TMZ en modelos 3D de GB y comparar la emisión de DAMPs (CRT, ATP, HMGB1) con condiciones 2D, como paso clave para fundamentar combinaciones y secuencias terapéuticas que aprovechen la muerte celular inmunogénica en un escenario experimental más cercano a la biología tumoral real.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Al recrear mejor los gradientes tanto de oxígeno como de nutrientes y los contactos célula–célula, los esferoides tridimensionales (3D) modifican la difusión de TMZ,

modulando así las vías de reparación, muerte y liberación de DAMPs. Esta organización genera una heterogeneidad espacial en la respuesta que no se capta en cultivos bidimensionales (2D).

Por ello, hipotetizamos que existirán diferencias significativas entre los cultivos 2D y los esferoides 3D tras el tratamiento con TMZ, tanto en la viabilidad celular como en el perfil de muerte celular inmunogénica (ICD), este último evidenciado por la emisión de señales inmunogénicas (exposición de CRT, secreción de ATP y liberación de HMGB1).

Nuestro objetivo es obtener datos en condiciones de cultivo tridimensional (3D) de la línea celular GL261 tras el tratamiento con TMZ, evaluando su viabilidad y la liberación de señales inmunogénicas (ATP, CRT, HMGB1), y compararlos con resultados previamente disponibles en 2D.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Conversión de cultivos 2D a 3D**

Las células GL261 2D se cultivaron en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) alta glucosa con GlutaMAX (Gibco 11960044) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Gibco 10438026, previamente inactivado a 56 °C), en frascos T25/T75 (Corning 430641U/430639), a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>.

Para la transición de GL261 a cultivo tridimensional, las células se sembraron inicialmente en frascos T75 en DMEM suplementado con 10% de FBS, manteniéndose a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar una confluencia del 70–80%. Este procedimiento corresponde a un protocolo puesto a punto en nuestro grupo de investigación, basado en adaptaciones de protocolos previamente descritos en la literatura [35].

Después se realizó una reducción de suero de forma gradual cada 3 días: sustitución del medio por DMEM con 5%, 2,5% y 0,5% de FBS, manteniendo en todo momento las condiciones estándar de incubación. Este descenso progresivo del suero favorece la adaptación previa a las condiciones de crecimiento en 3D y la selección de clones. El día 12 se procedió a la conversión, siguiendo el protocolo descrito a continuación. Se recogió el medio condicionado (0,5% de FBS) en un tubo falcon, se lavó el frasco con PBS 1X y el lavado se añadió al mismo tubo. Las células se desprendieron del flascón con tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich T4049), se neutralizaron con DMEM + 10% FBS y se transfirieron a un nuevo falcon. Tras centrifugar a 300 g durante 5 min, el *pellet* celular se resuspendió en medio de cultivo para células 3D, DMEM/F12 (Thermo Fisher 21041025) suplementado con B27 sin vitamina A 1X (Gibco™ 12587010), *epidermal growth factor* (EGF) murino (20 ng/mL) (Peprotech 314-09) y *fibroblast growth factor* (FGF) básico recombinante (20 ng/mL) (PeproTech. #100-18b), en y la suspensión se transfirió a un frasco de cultivo en posición vertical. Los cultivos en 3D se incubaron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **3.2. Tratamiento celular**

Las células GL261 3D se trataron con TMZ (Sigma-Aldrich T2577). La TMZ se reconstituyó partiendo de un vial de 100 mg en polvo. Se añadieron 5 mL de DMSO

(20 mg/mL) (Sigma-Aldrich D4540) para obtener un stock de 100 mM. La disolución se favoreció mediante ciclos de sonicación a 45 °C y resuspensión, y posteriormente se fraccionó en alícuotas de 500 µL, que se etiquetaron y almacenaron protegidas de la luz (-20 °C). Para el tratamiento se prepararon soluciones de trabajo en DMEM/F12 + B27 sin vitamina A + EGF (20 ng/mL) + FGF básico (20 ng/mL). En función del diseño experimental, se ajustaron las concentraciones y los tiempos de tratamiento. Las células GL261 se sembraron en placas P96 multipocillo y se expusieron durante 24 o 72 horas.

### 3.3. Ensayos de viabilidad celular

Para el ensayo de citotoxicidad, las células GL261 3D se disociaron con acutasa (Sigma A6964), se contaron con azul de tripano (BioRad 1450021) (dilución 1:2) y se sembraron a una densidad de 1500 células/pocillo en placas de 96 pocillos, en un volumen de 100 µL de suspensión celular por pocillo. Los cultivos se incubaron a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Para el tratamiento se prepararon siete condiciones de trabajo: 0 (control), 300, 500, 1000, 2500, 5000 y 10000 µM de TMZ. Se distribuyeron 100 µL de cada solución de tratamiento en tres pocillos por concentración sin retirar el medio inicial, y se mantuvieron los cultivos durante 24 o 72h (según el caso) a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Al finalizar el periodo de exposición, la viabilidad se determinó mediante PrestoBlue (puesto a punto en nuestro laboratorio), añadiendo 10 µL por pocillo; la incubación se realizó *overnight* a 37 °C. Se incluyeron los siguientes controles: células sin tratamiento (0 µM) y un blanco (medio de cultivo con PrestoBlue sin células). La lectura de la fluorescencia se realizó con el equipo Victor3 *Multilabel Counter* (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), fijando la excitación en 530/572 nm y la emisión en 590 nm. Para el cálculo de la viabilidad, se sustrajo la señal del blanco y los valores obtenidos se normalizaron con respecto al control sin tratamiento (al que se asignó un 100% de viabilidad). Para los ensayos de viabilidad se utilizaron dos réplicas biológicas, cada una con triplicados técnicos.

### 3.4. Evaluación de la liberación/exposición de DAMPs

Las células GL261 3D se sembraron a una densidad de 120 000 células/pocillo en placas de 12 pocillos con 500 µL de medio de cultivo 3D por pocillo y se incubaron a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Para el tratamiento se prepararon cuatro condiciones de TMZ (0, 500, 1000 y 2500 µM) dado que la concentración inhibitoria media al 50% (IC<sub>50</sub>) calculada fue de 2228 µM. Este rango se eligió para obtener resultados con dosis que preservan una fracción viable o estresada idónea para detectar señales tempranas de ICD, y dosis que generen un efecto citotóxico más robusto para contrastar la cinética de las señales. Como control positivo se empleó doxorrubicina (25 µM), un agente quimioterápico ampliamente utilizado y conocido por inducir muerte celular inmunogénica en distintos modelos tumorales [36]. Se añadieron 500 µL de cada solución a tres pocillos por concentración, sin retirar el medio inicial, y los cultivos se mantuvieron 24 o 72 horas en las mismas condiciones según el caso. Al finalizar el tratamiento, se recogió el contenido de cada pocillo y se centrifugó (300 g, 5 min, 4 °C); se recuperó el sobrenadante y se conservó en hielo para la determinación mediante luminiscencia de la liberación de HMGB1 y ATP. El *pellet* celular restante se utilizó para detectar la exposición de CRT en la membrana celular mediante *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACs). Para la detección de

señales inmunogénicas se realizaron dos réplicas biológicas con duplicados técnicos.

#### **3.4.1. Citometría para detectar exposición de CRT en membrana**

El *pellet* celular se trató con acutasa (200  $\mu$ L, 10 min, 37 °C), se centrifugó y se desechó el sobrenadante; se lavó con PBS frío (200  $\mu$ L) y se centrifugó de nuevo. Después se incubó con Zombie UV (Cat. 423107) (100  $\mu$ L, 20 min, 4 °C, oscuridad), y se lavó con PBS frío (200  $\mu$ L). A continuación, se tiñó la CRT de superficie con anti-CRT ab2907 (1:100) en FACS *buffer* (1 % BSA/PBS; 150  $\mu$ L, 30 min, 4 °C, oscuridad), se lavó con FACS *buffer* (200  $\mu$ L), se fijó con *fixation buffer* (4% paraformaldehído (PFA)/FACS *buffer*) (100  $\mu$ L, 15 min, 4 °C, oscuridad) y se eliminaron los restos de PFA mediante tres lavados con FACS *buffer* frío (200  $\mu$ L). Finalmente, se incubó con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 555 *goat anti-rabbit* (1:250; 200  $\mu$ L, 30 min, 4 °C, oscuridad), se lavó y las células se resuspendieron en 200  $\mu$ L de FACS *buffer*, manteniéndose a 4 °C en oscuridad hasta su adquisición en el citómetro. Las muestras se analizaron utilizando un citómetro CytoFLEX (Beckman Coulter). En todas las muestras se empleó la misma estrategia de *gating*, aplicando regiones de selección sucesivas sobre los diagramas de dispersión para aislar la población de interés: primero se usan los parámetros dispersión frontal (*Forward Scatter*, FSC) y dispersión lateral (*Side Scatter*, SSC) para seleccionar células y excluir detritos y agregados; después se discriminan singletes con geometría de pulso empleando FSC-Height vs FSC-Area (o Width vs Area) para descartar dobletes; a continuación se estudió la viabilidad con Zombie UV en el canal NUV 450-A, reteniendo Zombie- y excluyendo Zombie+; finalmente, dentro de la fracción viable se ha cuantificado el marcador de interés, CRT de superficie, mediante la señal del secundario Alexa Fluor 555 en Y585-PE-A.

#### **3.4.2. Luminiscencia para detectar la liberación de ATP**

Para cada condición experimental, 100  $\mu$ L del sobrenadante se dispensaron en una placa blanca de 96 pocillos de fondo plano para luminiscencia. Tras esto, se añadieron 100  $\mu$ L del reactivo CellTiter-Glo perteneciente al kit CellTiter-Glo *Luminescent Cell Viability Assay* (Promega, G7571), y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal luminiscente, siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente, la luminiscencia se analizó utilizando el lector de placas Victor3 *Multilabel Counter* (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE. UU.), que detectó la intensidad de luz visible emitida por las muestras.

#### **3.4.3. Luminiscencia para detectar la liberación de HMGB1**

Para cada condición experimental, 80  $\mu$ L del sobrenadante se dispensaron en una placa blanca de 96 pocillos de fondo plano para luminiscencia y se cuantificó el HMGB1 presente en el sobrenadante con el kit Lumit™ HMGB1 *Immunoassay* (Promega, W6110), siguiendo el protocolo del fabricante. Después de 5 min de incubación de la placa, la luminiscencia se midió en el lector de placas Victor3 *Multilabel Counter* (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), que detectó la intensidad de luz visible emitida por las muestras.

### 3.5. Análisis estadístico

Se realizaron análisis descriptivos de los datos. Dado que el tamaño muestral por condición fue demasiado pequeño, no se realizaron pruebas formales de normalidad, como Shapiro–Wilk. Las curvas dosis–respuesta se ajustaron por regresión no lineal a un modelo  $\log(\text{inhibitor})$  vs.  $\text{response}$  con pendiente variable de cuatro parámetros (4PL), previa transformación logarítmica de las concentraciones, obteniéndose las  $IC_{50}$  con sus intervalos de confianza del 95 %. Para comparaciones entre al menos tres grupos independientes con un único factor, se priorizó la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis; el ANOVA de una vía se empleó, en su caso, como análisis complementario/exploratorio. En diseños con dos factores, se aplicó ANOVA de dos vías (incluida la interacción) cuando se verificaron los supuestos de normalidad. Todas las pruebas fueron bilaterales y se consideró significativo  $p < 0,05$ . Los resultados se expresaron como media  $\pm$  *Standard Error of the Mean* (SEM) de los valores obtenidos. Los análisis se realizaron *GraphPad Prism 8* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Transición del modelo 2D a 3D: cambios morfológicos

Con el fin de establecer un modelo tridimensional representativo, se llevó a cabo la conversión progresiva de los cultivos convencionales de GL261 en 2D hacia condiciones de crecimiento en 3D. Durante este proceso, se observaron diferencias morfológicas y organizativas relevantes. En los cultivos 2D, las células GL261, de morfología poligonal característica de una línea de glioma murino, permanecieron adheridas a la superficie de cultivo, mostrando a las 24 horas un patrón disperso con algunas células aún en proceso de adhesión, y alcanzando una mayor confluencia a las 72 horas (Fig. 1.A). En contraste, tras la transición al modelo tridimensional, las células dejaron de crecer en monocapa y comenzaron a organizarse en agregados esferoidales no adheridos. A las 24 horas, se observaron esferoides de pequeño tamaño y en menor número, mientras que a las 72 horas éstos incrementaron en tamaño y densidad (Fig. 1.B), reflejando una mayor agregación celular y consolidación del crecimiento en 3D.

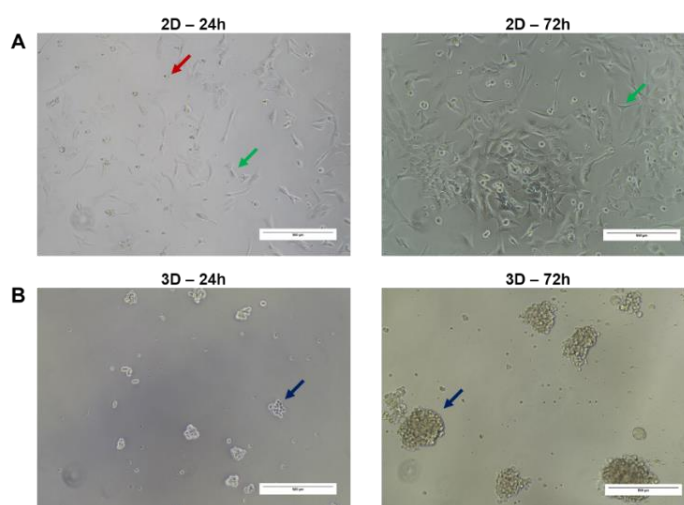


Figura 1. Conversión del modelo GL261 de 2D a 3D: evolución morfológica. (A) Cultivos 2D a 24 h y 72 h, con células adheridas y morfología poligonal (flecha verde) y algunas células en proceso de adhesión

(flecha roja). (B) Esferoides 3D a 24 h y 72 h, agregados esferoidales (flechas azules) evidenciando agregación y compactación progresivas Barra de escala: 500µm. Imágenes obtenidas mediante microscopía óptica (objetivo 10x).

#### 4.2. Efectos de la TMZ sobre la viabilidad celular en GL261 3D

Para conseguir el objetivo final propuesto en este trabajo, determinando las señales inmunogénicas en modelos 3D de cultivo tras el tratamiento con TMZ, comenzamos realizando una comparativa visual cualitativa de los esferoides GL261 tratados con concentraciones crecientes del fármaco (0, 300, 500, 1000, 2500, 5000 y 10000 µM).

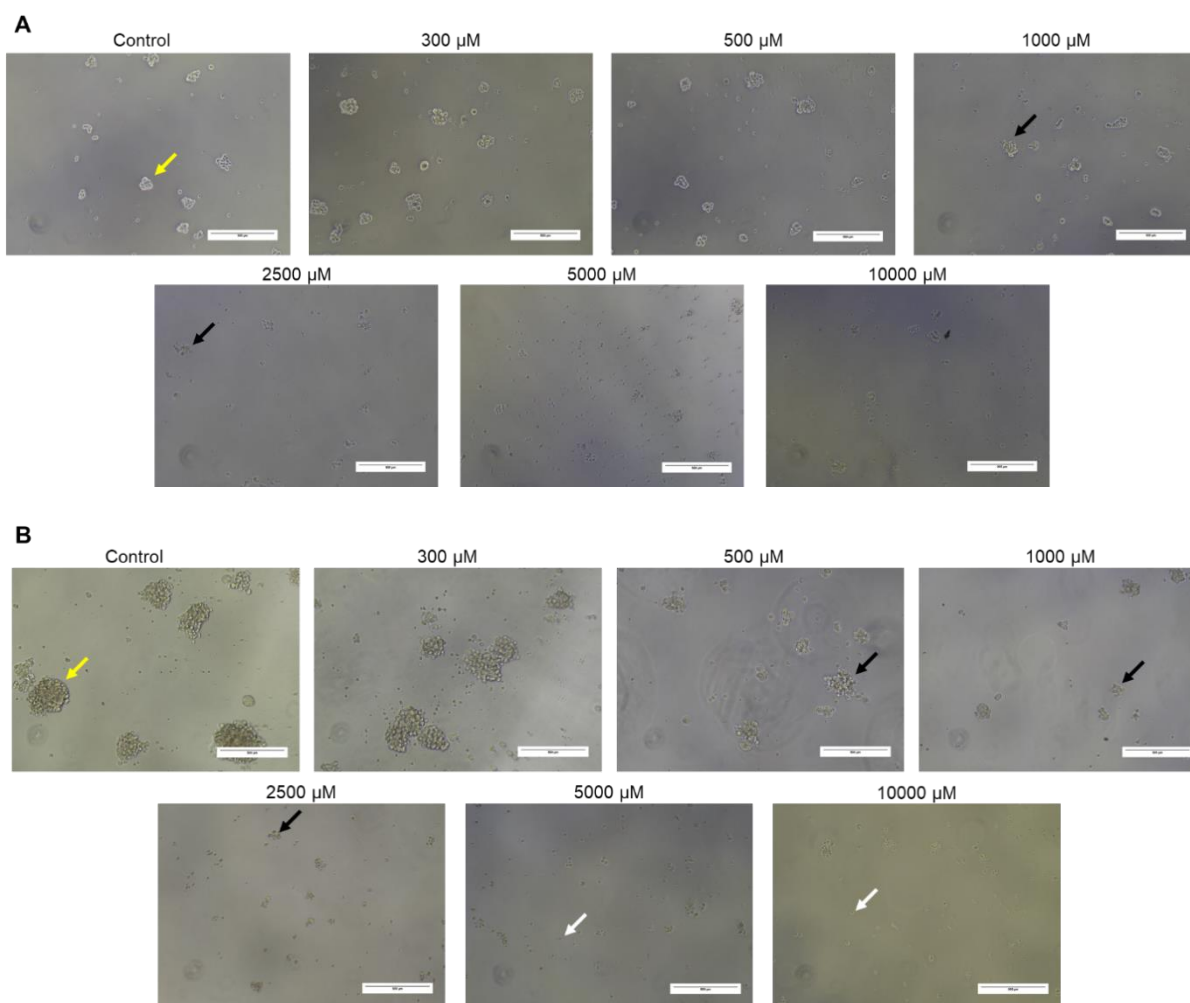


Figura 2. Efectos de la temozolomida (TMZ) sobre la morfología de esferoides GL261 en 3D. (A) Esferoides tras 24 h de tratamiento con el control (0 µM) y concentraciones crecientes de TMZ (300–10 000 µM). (B) Esferoides tras 72 h de tratamiento con el control (0 µM) y concentraciones crecientes de TMZ (300–10 000 µM). Se observaron, según el caso, bordes definidos (flechas amarillas), bordes irregulares (flechas negras) y células desprendidas (flechas blancas). Barra de escala: 500µm. Imágenes obtenidas mediante microscopía óptica (objetivo 10x).

Tras 24 horas de tratamiento (Fig. 2.A) se observaron cambios morfológicos en los esferoides. En el control (0 µM), los esferoides presentaron un tamaño pequeño, con una morfología compacta, bordes definidos y bien organizados. A medida que aumentó la concentración de TMZ, se observó una disminución progresiva del tamaño de los esferoides, pérdida de compactación y aparición de bordes irregulares.

Con un mayor tiempo de incubación, a las 72h (Fig. 2.B), los esferoides del control (0  $\mu$ M) alcanzaron un mayor tamaño, manteniéndose compactos, organizados y con bordes definidos. Sin embargo, el efecto de la TMZ fue más acusado: los esferoides tratados mostraron una reducción de tamaño, pérdida de compacidad, bordes irregulares y un grado creciente de disgregación celular a medida que aumentaba la concentración. Además, se observó una mayor cantidad de células desprendidas y restos celulares en el medio. En las dosis más elevadas ( $\geq 5000$   $\mu$ M), los esferoides presentes fueron escasos y de un tamaño muy reducido.

Posteriormente, se evaluó la viabilidad celular en el modelo 3D. Para ello, los esferoides se incubaron con TMZ durante 24 y 72 horas en las diferentes concentraciones ensayadas (0, 300, 500, 1000, 2500, 5000 y 10000  $\mu$ M), y la viabilidad se determinó mediante el ensayo PrestoBlue. Los resultados se presentan normalizados al control (0  $\mu$ M), al que se atribuyó un valor del 100%, y se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n = 2$ ).

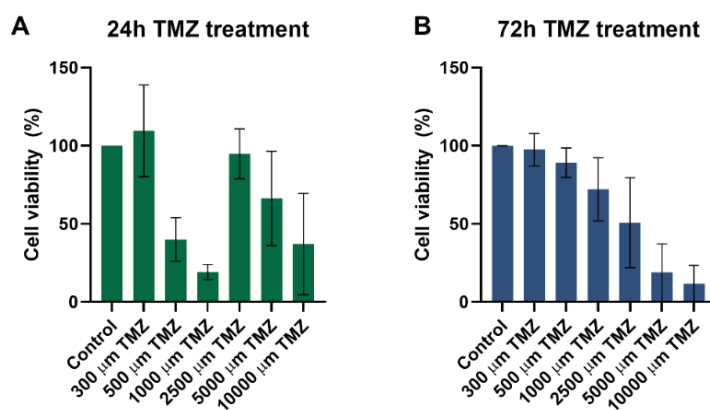


Figura 3. Viabilidad celular de esferoides GL261 3D tras tratamiento con temozolomida (TMZ). (A) Viabilidad a las 24 h determinada mediante ensayo PrestoBlue en esferoides tratados con control (0  $\mu$ M) y concentraciones crecientes de TMZ (300–10 000  $\mu$ M). (B) Viabilidad a las 72 h determinada en las mismas condiciones. Los valores se representan normalizados al control (0  $\mu$ M) y expresados como media  $\pm$  SEM ( $n = 2$ ). Se realizó ajuste no lineal con log-transformación de las concentraciones de TMZ y cálculo de  $IC_{50}$ .

A las 24h (Fig. 3.A), en el modelo 3D se observó un patrón irregular y variable de respuesta, sin una relación dosis–respuesta clara. A concentraciones de 500 y 1000  $\mu$ M la viabilidad descendió de forma marcada respecto al control, con valores de  $39,98 \pm 13,92$  y  $19,18 \pm 4,89\%$ , respectivamente. Sin embargo, concentraciones superiores no mostraron un descenso proporcional. En las dosis bajas, el efecto de la TMZ resultó prácticamente inexistente. Aunque el análisis estadístico calculó una  $IC_{50}$  de 380,3  $\mu$ M, y tal como se describirá a continuación, entendemos que no refleja un valor real ya que el comportamiento de los datos no es consistente con una progresión dosis-respuesta.

Tras 72 horas de tratamiento (Fig. 3.B), los esferoides mostraron un descenso progresivo y más uniforme de la viabilidad celular en función de la concentración de TMZ. Los valores permanecieron próximos al control en 300  $\mu$ M ( $97,5 \pm 10,4\%$ ), mientras que se redujeron de manera escalonada en el rango de 500–2500  $\mu$ M ( $89,1 \pm 9,4$ ;  $72,0 \pm 20,2$ ;  $50,8 \pm 28,8\%$ ). En las concentraciones más altas (5000 y 10000  $\mu$ M) la viabilidad descendió de forma acusada hasta valores muy bajos ( $18,8 \pm 18,4$



y  $11,7 \pm 11,7\%$ , respectivamente). En conjunto, se observa un perfil dosis–respuesta, con una  $IC_{50}$  de  $2228 \mu M$ .

Por último, se comparó con datos previos obtenidos en 2D por el grupo de investigación, considerando las concentraciones comunes (0, 300, 500 y  $1000 \mu M$ ).

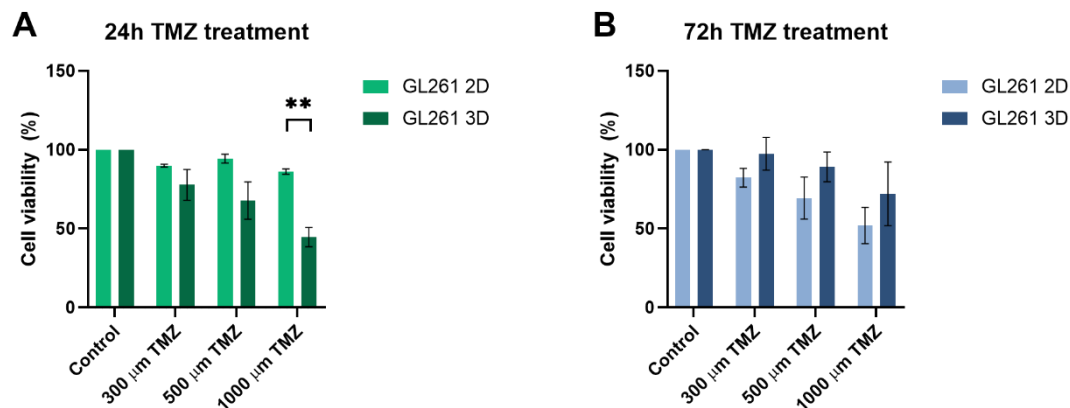


Figura 4. Comparación de la viabilidad celular entre modelos 2D y 3D de GL261 tras tratamiento con temozolomida (TMZ). Viabilidad en cultivos 2D y 3D determinada mediante ensayo PrestoBlue tras (A) 24h y (B) 72 h de tratamiento con control ( $0 \mu M$ ) y concentraciones crecientes de TMZ ( $300\text{--}1000 \mu M$ ). Los valores se representan normalizados al control ( $0 \mu M$ ) y expresados como media  $\pm$  SEM. Se aplicó análisis de varianza de dos vías (two-way ANOVA) para la comparación entre modelos y concentraciones, considerándose significativos valores de  $p < 0,05$ .

A las 24 horas (Fig. 4.A), consideramos que los datos de viabilidad en 3D obtenidos en nuestro ensayo no son asumibles debido a una incidencia técnica que compromete su interpretación. En consecuencia, para esta comparación únicamente, se emplearon datos de viabilidad en 3D a 24 h cedidos por el grupo de investigación, obtenidos bajo condiciones metodológicas equivalentes. Con esta sustitución, la comparación entre los modelos 2D y 3D muestra una diferencia significativa en la concentración de  $1000 \mu M$ , con una media del  $86,15\%$  en 2D frente al  $44,58\%$  en 3D ( $p = 0,0045$ ). Cabe remarcar que con estos datos concretos, la  $IC_{50}$  calculada a las 24 horas fue de  $1075 \mu M$ , alcanzando valores más cercanos a lo esperado.

A las 72 horas de tratamiento (Fig. 4.A) no se observaron diferencias significativas entre ambos modelos en ninguna de las concentraciones analizadas ( $p > 0,05$ ); no obstante, visualmente se aprecia una tendencia a valores más elevados de viabilidad en el modelo 3D, si bien esta diferencia aparente podría obedecer a la variabilidad experimental.

### 4.3. Liberación de señales inmunogénicas

#### 4.3.1. Exposición de CRT en la membrana

Como primer marcador de muerte celular inmunogénica, se analizó la exposición de calreticulina (CRT) en la superficie celular de esferoides GL261 3D tras el tratamiento con TMZ ( $500, 1000$  y  $2500 \mu M$ ). Se incluyó doxorubicina ( $25 \mu M$ ) como control positivo, dada su capacidad conocida de inducir inmunogenicidad. Para caracterizar de forma más precisa la respuesta, se evaluaron cuatro subpoblaciones celulares (vivas CRT–, vivas CRT+, muertas CRT– y muertas CRT+), y



adicionalmente se representó por separado el porcentaje de células vivas CRT+ tanto a 24 como a 72 horas. Posteriormente, los resultados en 3D se compararon con datos previos en 2D obtenidos por el grupo de investigación.

Empezando por el análisis de la exposición de CRT en las distintas subpoblaciones celulares, se evaluaron los perfiles tanto a 24 como a 72 horas.

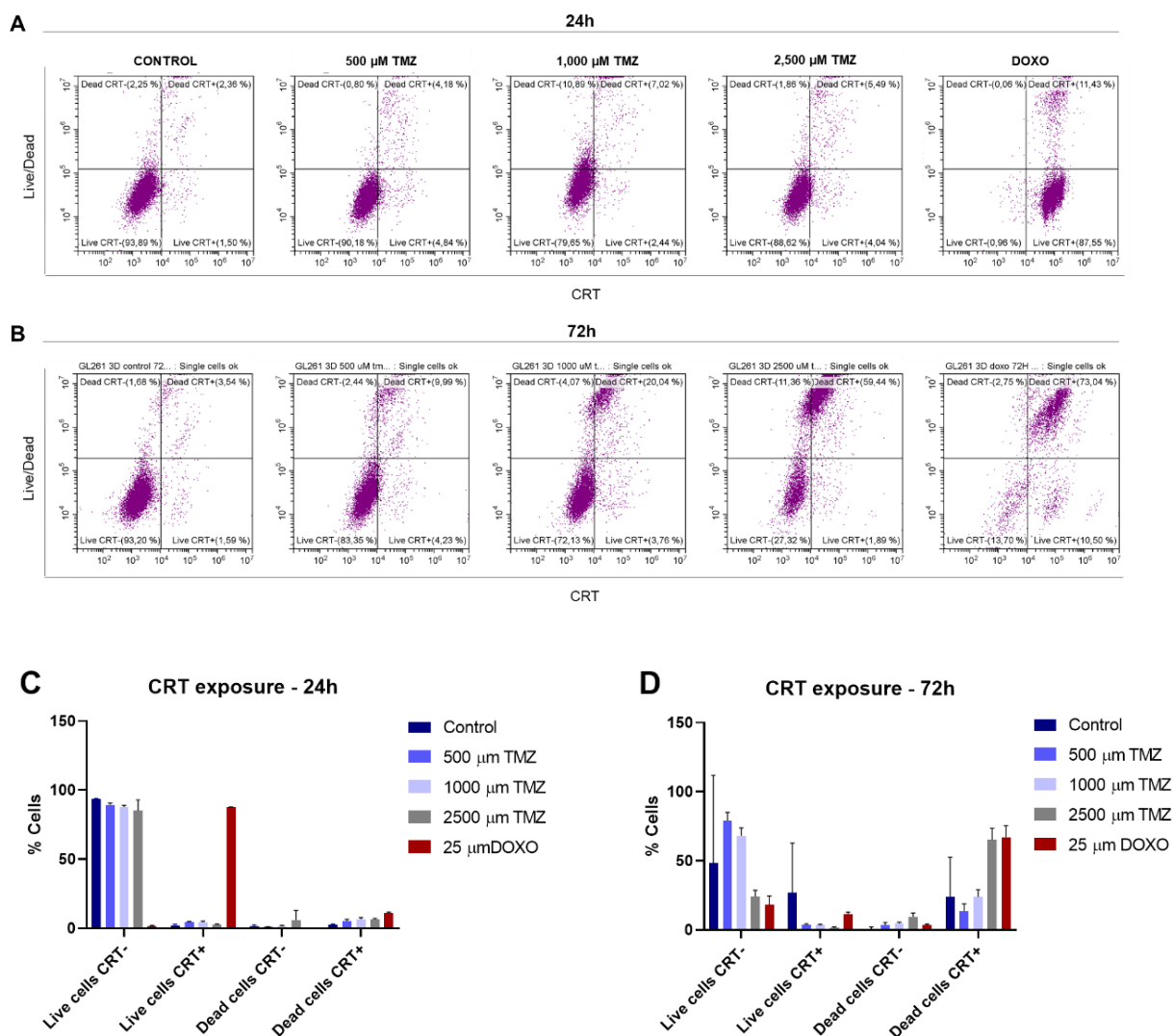


Figura 5. Citometría de flujo para la detección de exposición de calreticulina (CRT) en esferoides GL261 3D tratados con temozolomida (TMZ). Se evaluaron cuatro condiciones de tratamiento: control (0  $\mu$ M), TMZ (500–2500  $\mu$ M) y doxorubicina (25  $\mu$ M). (A) Distribución de las subpoblaciones celulares (vivas CRT-, vivas CRT+, muertas CRT- y muertas CRT+) a las 24 h de tratamiento y (B) a las 72 h. (C) Porcentaje de las subpoblaciones celulares a las 24 h. (D) Porcentaje de las subpoblaciones celulares a las 72 h. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. Se aplicó análisis de varianza de dos vías (two-way ANOVA), considerándose significativos valores de  $p < 0,05$ .

A las 24 horas (Fig. 5.C), tanto en el control como en las condiciones tratadas con TMZ, la población predominante correspondió a células vivas CRT-, reflejando una baja exposición de CRT. En contraste, en las células tratadas con doxorubicina la mayoría de la población correspondió a vivas CRT+, lo que confirma su papel como control positivo robusto de exposición de CRT.

A las 72 horas (Fig. 5.D), el perfil cambió de manera notable: el porcentaje de células se desplazó hacia la población de muertas CRT+, reduciéndose la fracción de vivas CRT- en todas las condiciones, incluido el control. En el caso del tratamiento con doxorubicina, también se observó una transición hacia un predominio de muertas CRT+, reforzando su función como control positivo de muerte celular inmunogénica.

Como la población celular que realmente nos interesa para este estudio son las células vivas que expresan CRT en su membrana (vivas CRT+), ya que esta exposición mientras la célula aún está viable es una señal “eat-me”, analizaremos en profundidad esta población.

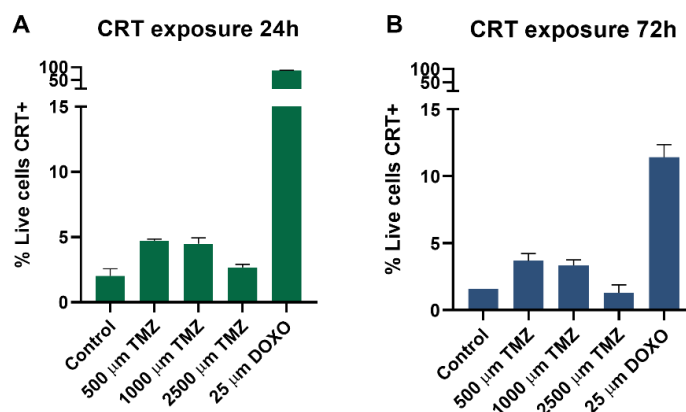


Figura 6. Exposición de calreticulina (CRT) en células vivas GL261 3D tratados con temozolomida (TMZ). Se evaluaron cuatro condiciones de tratamiento: control (0 μM), TMZ (500–2500 μM) y doxorubicina (25 μM) tras (A) 24 h y (B) 72 h. Los valores se expresan como porcentaje de células vivas CRT+ y se muestran como media ± SEM (n = 2). Se aplicó análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA), considerándose significativos valores de  $p < 0,05$ .

A las 24 horas (Fig. 6.A), los grupos de 500 μM, 1000 μM y doxorubicina mostraron valores medios de células vivas CRT+ de  $4,72 \pm 0,12$ ,  $4,49 \pm 0,45$  y  $87,67 \pm 0,12\%$ , respectivamente, frente al control. Aunque estos datos sugieren un aumento (especialmente con doxorubicina), no alcanzaron significación estadística ( $p > 0,05$ ) y deben interpretarse como tendencias susceptibles a la variabilidad experimental.

A las 72 horas (Fig. 6.B), no se detectaron diferencias significativas entre el control y las distintas concentraciones de TMZ ( $1,59$  y  $3,69 \pm 0,55$  /  $3,33 \pm 0,43$  /  $1,3 \pm 0,60\%$  respectivamente). Cabe mencionar que una réplica del control fue excluida por una incidencia técnica en la ejecución del experimento, sin alterar la interpretación global de los resultados. Sin embargo, el tratamiento con doxorubicina indujo un aumento marcado en la fracción de células vivas CRT+ ( $11,44 \pm 0,94\%$ ) en comparación con el control ( $1,59\%$ ), alcanzando significación estadística ( $p = 0,0038$ ). Es importante destacar que, en este tiempo, el número total de células vivas en la condición de doxorubicina fue menor en comparación con las 24 horas, lo que sugiere una transición progresiva hacia poblaciones celulares muertas CRT+.

En la comparación entre los modelos 3D y los datos previos en 2D a las 24 horas (Fig. 7.A), no se detectaron diferencias significativas en las condiciones de control ni en las tratadas con TMZ. Dado que las series no incluían concentraciones idénticas, se consideró el valor de 2000 μM en 2D como aproximación al de

2500  $\mu\text{M}$  en 3D, reconociendo que no son estrictamente equivalentes. Bajo esta premisa, no se observaron diferencias entre ambos modelos en dicha concentración. Sin embargo, en el caso de doxorrubicina se observó un incremento marcado en la fracción de células vivas CRT+ en 3D ( $87,67 \pm 0,12\%$ ) frente a 2D ( $7,1\%$ ) ( $p < 0,0001$ ).

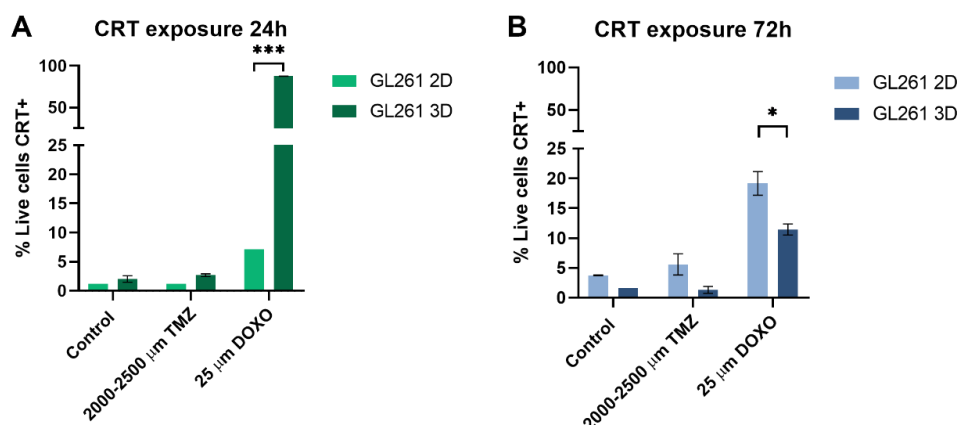


Figura 7. Comparación de la exposición de calreticulina (CRT) en células vivas en cultivos GL261 2D y 3D. Se evaluaron las condiciones control ( $0 \mu\text{M}$ ), TMZ ( $2000 \mu\text{M}$  en 2D y  $2500 \mu\text{M}$  en 3D como aproximación) y doxorrubicina ( $25 \mu\text{M}$ ) tras (A) 24 h y (B) 72 h de tratamiento. Los valores se expresan como porcentaje de células vivas CRT+ y se muestran como media  $\pm$  SEM. Se aplicó análisis de varianza de dos vías (two-way ANOVA), considerándose significativos valores de  $p < 0,05$ .

A las 72 horas (Fig. 7.B), la comparación entre 3D y 2D no mostró diferencias significativas en las condiciones de control ni en el tratamiento con TMZ. Sin embargo, en la condición de doxorrubicina se detectó una diferencia significativa, con un mayor porcentaje de células vivas CRT+ en 2D ( $19,19 \pm 1,98\%$ ) en comparación con 3D ( $11,44 \pm 0,94\%$ ) ( $p = 0,024$ ).

#### 4.3.2. Liberación de ATP

Con el fin de analizar otro marcador clave de inmunogenicidad, se determinó la liberación de ATP extracelular en esferoides GL261 3D tratados con TMZ y doxorrubicina. Posteriormente, estos resultados se compararon con datos previos obtenidos en 2D por el grupo de investigación.

Se midió el ATP extracelular por bioluminiscencia en esferoides GL261 3D tras su tratamiento con TMZ ( $500$ ,  $1000$  y  $2500 \mu\text{M}$ ) o doxorrubicina como control positivo ( $25 \mu\text{M}$ ) a 24 y 72 horas.

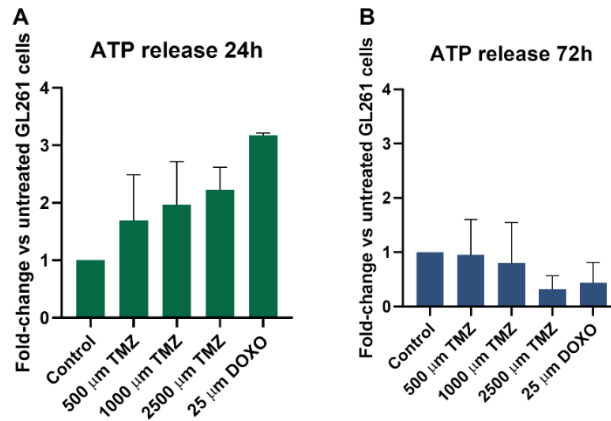


Figura 8. Liberación extracelular de ATP en esferoides GL261 3D tratados con temozolomida (TMZ). Esferoides incubados durante (A) 24 h y (B) 72 h con control (0  $\mu$ M), TMZ (500–2500  $\mu$ M) o doxorrubicina (25  $\mu$ M). Los valores se expresan como fold-change respecto al control (0  $\mu$ M) y se muestran como media  $\pm$  SEM (n = 2). Se aplicó análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA), considerándose significativos valores de  $p < 0,05$ .

Tras las 24 horas de tratamiento (Fig. 8.A), la señal de ATP aumentó de forma gradual con las concentraciones de TMZ, desde 500 a 2500  $\mu$ M ( $1,69 \pm 0,80$  /  $1,96 \pm 0,76$  /  $2,23 \pm 0,39$  respectivamente en *fold-change* vs. células sin tratar), todas superando el control. La mayor respuesta corresponde al control positivo, la doxorrubicina ( $3,17 \pm 0,04$ ). La señal de ATP sigue un patrón dosis-dependiente, sin embargo, no se detectaron diferencias significativas frente al control ( $p \geq 0,05$ )

Por el contrario, tras las 72 horas de tratamiento (Fig. 8.B), la señal de ATP exhibió el patrón inverso, con una disminución progresiva al incrementar la concentración de TMZ ( $0,95 \pm 0,65$  /  $0,80 \pm 0,74$ ) con respecto el control. También mostró un descenso marcado tanto en la concentración más alta ( $0,32 \pm 0,25$ ) como en la doxorrubicina ( $0,44 \pm 0,38$ ). En este caso los resultados revelan una clara tendencia decreciente con la dosis, pero no se detectaron diferencias significativas frente al control ( $p > 0,05$ ).

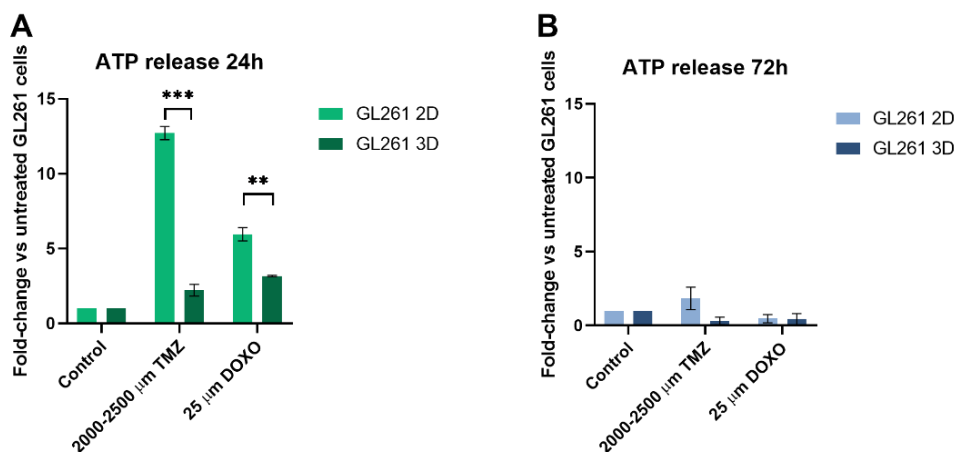


Figura 9. Comparación de la liberación extracelular de ATP en cultivos GL261 2D y 3D. Se evaluaron los valores en control (0  $\mu$ M), TMZ (2000  $\mu$ M en 2D y 2500  $\mu$ M en 3D como aproximación) y doxorrubicina (25  $\mu$ M) tras (A) 24 h y (B) 72 h de tratamiento. Los valores se expresan como fold-change respecto al control (0  $\mu$ M) y se muestran como media  $\pm$  SEM. Se aplicó análisis de varianza de dos vías (two-way ANOVA), considerándose significativos valores de  $p < 0,05$ .

Al comparar con los datos obtenidos en 2D, a las 24 horas (Fig. 9.A) no se detectaron diferencias significativas en el control. Sin embargo, sí se observaron diferencias relevantes en las concentraciones de 2500  $\mu\text{M}$  y en doxorubicina. En 2500  $\mu\text{M}$ , la liberación de ATP fue significativamente mayor en 2D ( $12,71 \pm 0,44$ ) que en 3D ( $2,23 \pm 0,39$ ) ( $p < 0,0001$ ). De forma similar, en doxorubicina se observó un valor superior en 2D ( $5,96 \pm 0,44$ ) frente a 3D ( $3,17 \pm 0,04$ ) ( $p = 0,0019$ ).

Tras 72 horas de tratamiento (Fig. 9.B), no se detectaron diferencias significativas entre los modelos 2D y 3D en ninguna de las condiciones analizadas ( $p > 0,05$ ). No obstante, en la concentración de 2500  $\mu\text{M}$  se observó una tendencia hacia valores más elevados en 2D ( $1,83 \pm 0,76$ ) en comparación con 3D ( $0,32 \pm 0,24$ ), con un valor de  $p$  cercano a la significación ( $p = 0,08$ ).

#### 4.3.3. Liberación de HMGB1

Con el objetivo de evaluar la liberación de señales inmunogénicas asociadas a la muerte celular, se cuantificó el HMGB1 extracelular por bioluminiscencia en esferoides GL261 3D tras el tratamiento con TMZ (500, 1000 y 2500  $\mu\text{M}$ ) o doxorubicina como control positivo (25  $\mu\text{M}$ ) a 24 y 72 horas. Al igual que en el caso del ATP, los resultados se contrastaron con datos previos en 2D disponibles en el grupo de investigación.

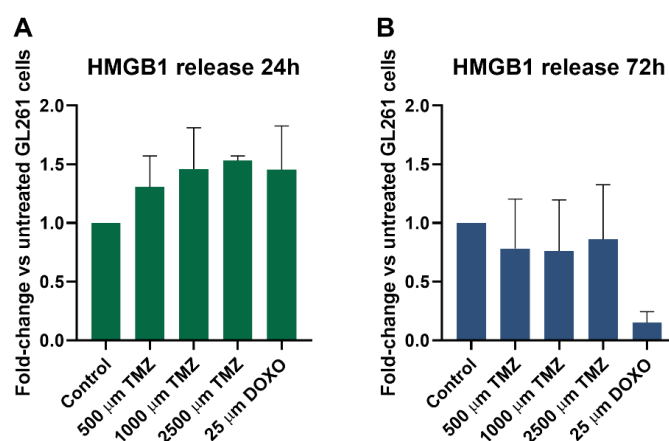


Figura 10. Liberación extracelular de HMGB1 en esferoides GL261 3D tratados con temozolomida (TMZ). Esferoides incubados durante (A) 24 h y (B) 72 h con control (0  $\mu\text{M}$ ), TMZ (500–2500  $\mu\text{M}$ ) o doxorubicina (25  $\mu\text{M}$ ). Los valores se expresan como fold-change respecto al control (0  $\mu\text{M}$ ) y se muestran como media  $\pm$  SEM ( $n = 2$ ). Se aplicó análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA), considerándose significativos valores de  $p < 0,05$ .

Tras el tratamiento de 24 horas (Fig. 10.A), la señal de HMGB1 aumentó gradualmente con la concentración de TMZ (de 500 a 2500  $\mu\text{M}$  respectivamente  $1,31 \pm 0,27$  /  $1,46 \pm 0,35$  /  $1,53 \pm 0,04$  fold sobre el control), superando el control en todos los casos. Este incremento sigue por tanto un patrón dosis-dependiente. La doxorubicina, como control positivo, emite la señal más elevada ( $1,46 \pm 0,37$  fold sobre el control). Aunque aparentemente sigue un patrón dosis-dependiente, en este conjunto no se detectaron diferencias significativas frente al control ( $p > 0,05$ ).

Cuando realizamos el mismo experimento a 72 horas de tratamiento (Fig. 10.B), la señal de HMGB1 mostró un patrón distinto. Se observa una disminución de la señal respecto del control en todas las concentraciones de TMZ ( $0,78 \pm 0,42$  /  $0,76 \pm 0,44$

/  $0,86 \pm 0,47$  fold sobre el control) y una caída marcada en el tratamiento con doxorrubicina ( $0,15 \pm 0,09$  fold sobre el control). De nuevo, este ensayo carece de significación estadística en las comparaciones realizadas ( $p > 0,05$ ).

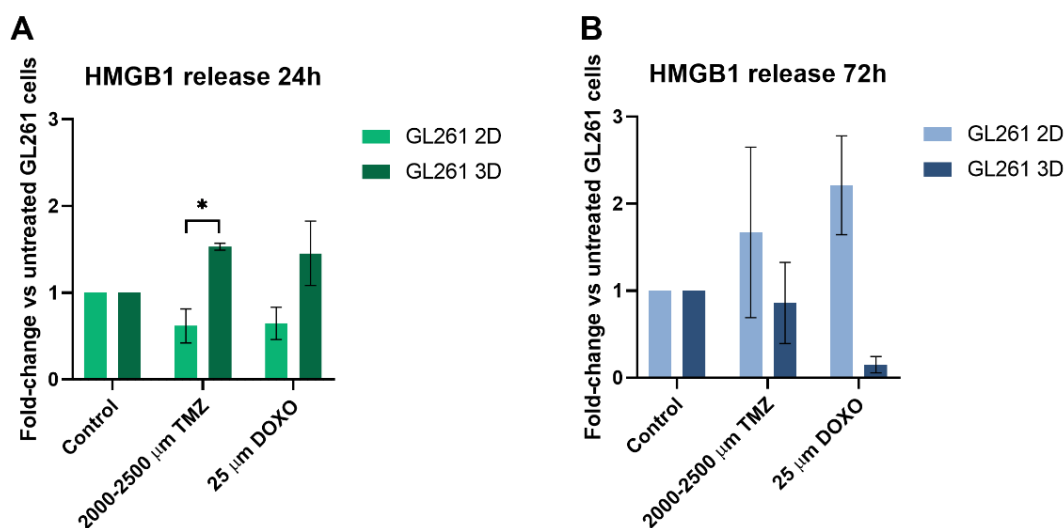


Figura 11. Comparación de la liberación extracelular de HMGB1 en cultivos GL261 2D y 3D. Se evaluaron los valores en control ( $0 \mu\text{M}$ ), TMZ ( $2000 \mu\text{M}$  en 2D y  $2500 \mu\text{M}$  en 3D como aproximación) y doxorrubicina ( $25 \mu\text{M}$ ) a (A) 24 h y (B) 72 h. Los valores se expresan como fold-change respecto al control ( $0 \mu\text{M}$ ) y se muestran como media  $\pm$  SEM. Se aplicó análisis de varianza de dos vías (two-way ANOVA), considerándose significativos valores de  $p < 0,05$ .

Para contrastar estos resultados, los comparamos con datos en 2D cedidos por el grupo de investigación. Dado que las series no incluían concentraciones idénticas, el valor de  $2000 \mu\text{M}$  en 2D se utilizó como referencia aproximada del de  $2500 \mu\text{M}$  en 3D, asumiendo que no son estrictamente equivalentes. Bajo esta aproximación, a 24 horas (Fig. 11.A), observamos una diferencia significativa en HMGB1 con un valor más elevado en 3D en comparación con las 2D ( $1,53 \pm 0,04$  y  $0,62 \pm 0,20$  fold sobre el control), ( $p = 0,04$ ). En control y doxorrubicina no se detectaron diferencias significativas entre 2D y 3D ( $p > 0,05$ ).

Cuando se evaluó la liberación de HMGB1 a las 72 horas de tratamiento (Fig. 11.B), no se detectaron diferencias significativas entre los modelos 2D y 3D en ninguna de las condiciones analizadas (control, TMZ y doxorrubicina) ( $p > 0,05$ ). No obstante, en la comparación con doxorrubicina se observó una tendencia hacia valores más altos en 2D en relación con 3D ( $2,21 \pm 0,57$  y  $0,15 \pm 0,09$  respectivamente con una  $p = 0,07$ ).

## 5. DISCUSIÓN

El aumento progresivo en el número y tamaño de los agregados celulares tras la **conversión de GL261 a 3D** refleja la transición hacia un crecimiento basado en interacciones célula–célula. Este cambio implica la pérdida del anclaje al sustrato y el predominio de contactos celulares; el proceso sigue una fase de autoagregación y posterior compactación mediada por cadherinas, con refuerzo de uniones homotípicas y reorganización de las adhesiones célula–MEC a través de integrinas, lo que estabiliza la estructura esférica [37]. En conjunto, estos hallazgos—pérdida

de adherencia y transición a esferoides flotantes que crecen y se compactan entre 24 y 72 h—son plenamente consistentes con el comportamiento esperado de GL261 al pasar de 2D a 3D y con la literatura que sustenta tanto la morfología 2D (monocapa poligonal) como la dinámica 3D (auto-agregación y compactación progresiva) [33]. Todas estas características avalan el uso del modelo 3D como escenario más cercano a la biología tumoral para los análisis funcionales posteriores, capturando las interacciones dinámicas con el microambiente e imitando el crecimiento tumoral real y la diseminación tumoral [38].

Para contextualizar la **respuesta a TMZ** en GL261 3D, comparamos la viabilidad a 24 y 72 horas, poniendo el foco en la relación dosis–respuesta y en las diferencias frente a 2D, con especial énfasis en las 72 horas. El punto de 24 horas se incluye para capturar eventos tempranos y explorar si emergen señales inmunogénicas que, previsiblemente, anteceden a la muerte celular.

A las 24 horas, la respuesta en viabilidad es irregular y no sigue una clara relación dosis–respuesta, incluso con descensos abruptos en concentraciones intermedias, dando lugar a una  $IC_{50}$  poco realista. Esto puede deberse a limitaciones técnicas, incluyendo un error en la dilución de la TMZ y pérdidas de esferoides durante la manipulación (adhesión a las paredes), lo que reduce la carga celular efectiva por condición. Adicionalmente, no se descarta contaminación que altere la lectura metabólica, así como una exposición subóptima al reactivo PrestoBlue (relación reactivo/volumen inadecuada o tiempo de incubación insuficiente). Por ello, los datos de 24 h fueron excluidos de los análisis, de las comparaciones intermodelo y de la estimación de parámetros. Para subsanar esta situación, se han utilizado datos de viabilidad celular previamente obtenidos en el grupo, que indican una  $IC_{50}$  de 1075  $\mu$ M. Cabe señalar que esta incidencia fue puntual y se observó exclusivamente en el ensayo de viabilidad a 24 horas; no se traslada al resto de procedimientos realizados a 24 horas, que constituyen experimentos independientes con protocolos diferenciados.

A las 72 horas, el modelo 3D exhibe una tendencia más clara y gradual hacia una relación dosis–respuesta, aunque sin significación estadística. Esto es coherente con el mecanismo temporal de acción de TMZ, donde la formación de lesiones como O<sup>6</sup>-metilguanina requiere al menos dos ciclos de replicación para convertirse en daño citotóxico efectivo vía el sistema de reparación por desajustes (MMR, por sus siglas en inglés *mismatch repair*), generando roturas en doble cadena y apoptosis [39]. Bajo estas condiciones, los modelos 2D y 3D convergen hacia niveles comparables de afectación celular *in vitro*, reflejando una sensibilidad similar al fármaco en exposición prolongada. No obstante, visualmente se aprecia una tendencia a valores de viabilidad ligeramente más elevados en el modelo 3D, lo que podría atribuirse a que los esferoides recrean gradientes de difusión y penetración tanto del fármaco como de oxígeno y nutrientes [34].

En cualquier caso, conviene subrayar que los indicadores de viabilidad y las  $IC_{50}$  obtenidas *in vitro* tienen un poder predictivo limitado sobre lo que sucede *in vivo*. En modelos preclínicos, pautas de TMZ que preservan la competencia inmunitaria prolongan la supervivencia e incluso logran curaciones, con exposiciones



claramente inferiores a la  $IC_{50}$  [40], [41]. Esto sugiere que el beneficio terapéutico no depende solo de la citotoxicidad directa, sino también de efectos inmunomoduladores, de la interacción con estroma y vasculatura, de senescencia/citostasis y de condicionantes farmacocinéticos y de la BHE que los modelos 2D y 3D reproducen de forma incompleta [42].

La ICD es clave para la eficacia antitumoral porque integra el daño terapéutico con la emisión coordinada de DAMPs en ventanas temporales definidas. Los cultivos 2D pueden subestimar o desfazar estas señales al carecer de gradientes y arquitectura tisular. En cambio, los modelos 3D reproducen compactación, heterogeneidad espacial y restricciones de difusión, lo que modula la magnitud y la cinética de los DAMPs, ofreciendo una lectura más fiel de su dinámica y de su relevancia biológica real [43]. En este trabajo se analizaron tres marcadores clave de muerte celular inmunogénica. La exposición de calreticulina (CRT) en membrana se evaluó como señal “*eat-me*”, fundamental para el reconocimiento de células tumorales por parte de fagocitos. La liberación de ATP extracelular se estudió como señal quimioatrayente (“*find-me*”) que favorece el reclutamiento de células inmunes. Finalmente, se cuantificó la liberación de HMGB1, una proteína nuclear que, al salir al medio extracelular, actúa como señal de peligro (*danger signal*) promoviendo la activación de células presentadoras de antígenos. Es importante señalar una limitación transversal a estos ensayos: el bajo número de réplicas biológicas ( $n = 2$ ) y la elevada dispersión observada en algunos valores impiden detectar cambios estadísticamente significativos frente al control con el nivel de significación habitual ( $\alpha = 0,05$ ). Por tanto, este estudio constituye una prueba de concepto, que demuestra la viabilidad del enfoque y sienta las bases para estudios confirmatorios más amplios.

La **calreticulina (CRT)** en superficie constituye una de las señales más tempranas de muerte celular inmunogénica, actuando como señal “*eat-me*” que favorece la fagocitosis por células dendríticas y macrófagos [36], [44].

A las 24 horas, la baja proporción de células vivas CRT+ en las condiciones control y TMZ indica que la exposición de CRT inducida por este fármaco es limitada. Este comportamiento coincide con lo descrito en la literatura, donde la TMZ presenta una capacidad modesta e incluso inconsistente para inducir señales clásicas de ICD en gliomas [25], [45]. En contraste, la marcada exposición de CRT en células tratadas con doxorrubicina confirma su papel como inductor prototípico de ICD: las antraciclinas inducen estrés del retículo endoplásmico y translocación temprana de CRT a la membrana, generando una potente señal “*eat-me*” para células inmunes [46].

A las 72 horas, no se detectaron diferencias significativas entre las concentraciones de TMZ y el control, lo que puede explicarse porque la exposición de CRT es un evento temprano y transitorio dentro de la ICD [47]. En este punto, muchas células ya han progresado hacia apoptosis avanzada o necrosis, donde CRT se pierde de la membrana y, por tanto, deja de detectarse como señal. Este fenómeno es coherente con la cinética de acción de TMZ, cuyo efecto citotóxico se manifiesta tras varios ciclos de replicación y que, en tiempos prolongados, conduce a muerte celular



más que a señales tempranas de inmunogenicidad [48], [49]. En contraste, la doxorubicina mantuvo un aumento significativo de vivas CRT+, pero acompañado de una reducción del número total de células viables respecto a 24 horas, indicando una menor población capaz de mantener CRT en superficie. Este patrón refleja su capacidad robusta como inductor de ICD y la transición esperable hacia poblaciones muertas CRT+ en fases tardías [46].

En la comparación entre los modelos, a las 24 horas no se detectaron diferencias entre 2D y 3D en las condiciones de control ni en TMZ, lo que concuerda con lo reportado en la literatura sobre la TMZ, donde se describe exposición temprana pero discreta de CRT [25], [45]. En cambio, con doxorubicina se observó una diferencia muy marcada, con un porcentaje de vivas CRT+ mucho mayor en 3D que en 2D. Este resultado sugiere que el microambiente tridimensional, caracterizado por mayor compactación celular, estrés metabólico e interacciones célula-célula, potencia la exposición de CRT frente a un sistema en monocapa más homogéneo, donde la señal fue mucho más limitada [50].

A las 72 horas, tampoco se observaron diferencias entre 2D y 3D en control ni en TMZ, lo que concuerda con la naturaleza transitoria de la exposición de CRT y con la progresión hacia poblaciones muertas en ambos modelos. Sin embargo, en doxorubicina el patrón se invirtió: la fracción de vivas CRT+ fue mayor en 2D que en 3D. Una explicación plausible es que en 3D la muerte celular masiva y el estrés prolongado reducen la población viable capaz de mantener CRT en membrana, mientras que en 2D persiste un mayor número de células vivas que aún exhiben CRT en superficie [51]. En conjunto, estos resultados refuerzan que la cinética y magnitud de la exposición de CRT dependen tanto del tipo de agente como del contexto tridimensional, siendo más robusta y temprana en 3D, pero con una pérdida más acusada en tiempos prolongados. Además, aunque la exposición de CRT parezca modesta, su cooperación sinérgica con otras señales inmunogénicas puede potenciar de forma relevante la activación de la ICD.

El **ATP extracelular** se analizó como un marcador del estado de la célula, dado que su liberación funciona como señal inmunogénica temprana de tipo *find-me*. En el modelo 3D, a las 24 horas se observó un aumento progresivo de ATP con la concentración de TMZ y con doxorubicina como condición más elevada, aunque sin alcanzar significación estadística. Este perfil es consistente con una liberación temprana de ATP asociada a células en estrés inicial o apoptosis incipiente, tal como se ha descrito en otros modelos tumorales tratados con quimioterapia [52].

A las 72 horas la señal de ATP se invierte y desciende tanto con TMZ como con doxorubicina, más acusado en las dosis altas, porque el ATP liberado tempranamente se hidroliza rápidamente a AMP/adenosina por las ectonucleotidasas CD39/CD73, muy activas en GB y potenciadas por la hipoxia mediada por HIF-1 propia de los esferoides 3D [53], [54]. En paralelo, al avanzar la muerte celular disminuye la fracción viable capaz de secreción activa, y las reservas intracelulares de ATP se agotan, reduciendo el flujo neto hacia el sobrenadante [55], [56]. El resultado combinado limita la acumulación detectable por el ensayo de

bioluminiscencia, de modo que, pese a que haya daño elevado, la lectura a 72 horas muestra un perfil descendente con TMZ y doxorubicina.

La comparación con 2D evidenció a las 24 horas una liberación mucho mayor de ATP en 2D en las condiciones de 2500  $\mu\text{M}$  de TMZ y de doxorubicina, lo que podría relacionarse con la ausencia de barreras de difusión en monocapa y con una mayor liberación directa al medio [57]. En esferoides 3D, en cambio, la compactación celular, la degradación enzimática local y la retención intracelular limitarían la acumulación extracelular medible.

A las 72 horas no hubo diferencias significativas entre ambos modelos, aunque se observó una tendencia hacia valores más altos en 2D en la dosis de 2500  $\mu\text{M}$ , posiblemente asociada a una mayor proporción de células aún viables capaces de liberar ATP [58]. En conjunto, estos hallazgos se alinean con lo previsto y respaldan la liberación de ATP como señal inmunogénica tras el tratamiento con TMZ, indicando además que en ambos modelos (2D y 3D) las 24 h constituyen una ventana temporal más relevante que las 72 h para su detección.

La proteína nuclear **HMGB1** es uno de los principales DAMPs liberados durante la muerte celular inmunogénica. Su presencia en el espacio extracelular actúa como señal de peligro, favoreciendo la activación de células dendríticas y la presentación de antígenos. Sin embargo, su liberación y detectabilidad pueden variar en función del tiempo, el tipo de estímulo y el estado redox de la proteína.

En nuestros resultados, a las 24 horas se observó un aumento dependiente de la dosis de TMZ en la liberación de HMGB1, aunque sin alcanzar significación estadística. Esto podría reflejar una respuesta inicial moderada al daño, en línea con estudios que describen una liberación temprana de HMGB1 en modelos de glioma tras quimioterapia [59]. En contraste, a las 72 horas la señal disminuyó en todas las condiciones, incluido el control positivo con doxorubicina. Este hallazgo puede deberse a que la liberación de HMGB1 requiere de células viables: cuando la muerte celular es extensa, la proteína puede degradarse, quedar atrapada en restos celulares o detectarse con menor afinidad debido a oxidación o modificaciones postraduccionales. De hecho, se ha descrito que la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), a la que contribuye la TMZ al inducir un marcado estrés oxidativo (por la disfunción mitocondrial y el estrés replicativo), oxida HMGB1, lo que reduce su inmunogenicidad y la eficacia de su detección por anticuerpos en ensayos bioquímicos. [60], [61].

En nuestra comparación entre los modelos 3D y 2D, observamos una liberación significativamente mayor de HMGB1 con una concentración de TMZ de 2500  $\mu\text{M}$  en 3D frente a 2D a las 24 horas. Este mayor nivel en el modelo tridimensional puede explicarse por su representatividad más cercana al entorno tumoral real, donde la secreción activa de HMGB1 mediada por autofagia es más eficiente, lo cual se ha documentado en glioblastoma en respuesta a TMZ [59]. En células organizadas en esferoides tridimensionales, la arquitectura densa y los contactos célula-célula reforzados facilitan esta secreción, que resulta ser algo menos prominente en monocapa.

A las 72 horas no se detectaron diferencias significativas en la liberación de HMGB1 entre los modelos 2D y 3D. Sin embargo, la tendencia a valores más altos en 2D frente a 3D con doxorubicina podría explicarse debido a que en el modelo 3D, la muerte celular más extensa y la acumulación de ROS favorecerían la oxidación o degradación de HMGB1, reduciendo su detectabilidad en el medio extracelular [60].

Es necesario considerar la falta de estandarización en la evaluación de señales inmunogénicas. La heterogeneidad de modelos (líneas, cultivos primarios, esferoides), ventanas temporales de análisis y lecturas (citometría, microscopía, ELISA/luminiscencia) dificulta comparar magnitudes y cinéticas entre estudios y, en la práctica, impide definir con certeza un “mejor” momento o técnica única para capturar un perfil representativo. Además, decisiones analíticas como el umbral de positividad, la normalización y el esquema de dosificación condicionan la interpretación [62].

Por otra parte, es improbable que una señal aislada explique por sí sola la inmunogenicidad global. Más bien, el fenómeno parece surgir de una firma compuesta donde convergen la exposición de CRT, la liberación de ATP y HMGB1, cambios en ejes reguladores como CD47 o CD39–CD73 y la maduración de células dendríticas. Varias de estas señales aparecen cuando la muerte aún no es evidente, lo que facilita su captura por el sistema inmune *in vivo* y puede modular el resultado final. De ahí la necesidad de enfoques multiparamétricos y dependientes del tiempo, idealmente complementados con ensayos funcionales de fagocitosis y presentación antigénica, para contextualizar adecuadamente las lecturas bioquímicas y de viabilidad [63].

## **6. CONCLUSIÓN**

En conjunto, nuestros datos indican que *in vitro* el modelo 3D de GL261 muestra diferencias modestas frente al 2D en las variables evaluadas, pero es cierto que aporta ventajas estructurales como gradientes de difusión, heterogeneidad espacial y microambientes locales que ayudan a interpretar las divergencias observadas y lo convierten en un sistema útil que merece seguir optimizándose.

Las señales seleccionadas ATP, CRT y HMGB1 no resultaron especialmente determinantes en este contexto, con cambios discretos y cinéticas distintas, por lo que será necesario incorporar marcadores con mayor sensibilidad en 3D y ajustar la ventana temporal. En particular, sería interesante analizar otras señales inmunogénicas que pudieran tener mayor relevancia para la ICD en este modelo y caracterizar tanto su magnitud como su cinética. Es importante considerar que estas señales no actúan de forma aislada, sino de manera coordinada y a menudo sinérgica; por ello, una evaluación integrada de su actividad conjunta y de su secuencia temporal podría resultar más informativa que el análisis individual.

Además, resultados preliminares de un estudio en curso del grupo, aún no publicado, muestran que al implantar los esferoides en ratón su comportamiento se aproxima más al del tumor *in vivo*, con crecimiento acelerado y patrón difuso e infiltrativo, gracias a la interacción con un microambiente tumoral funcional. Esto

respalda el valor de este modelo y guía su perfeccionamiento con vistas a reducir el uso de animales.

Como línea futura, la integración de componentes inmunes en organoides y en cocultivos representa un paso lógico, condicionado a consolidar previamente el modelo 3D y a identificar las señales clave que mejor capturen su biología.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] D. N. Louis *et al.*, “The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary,” *Neuro Oncol*, vol. 23, no. 8, pp. 1231–1251, Aug. 2021, doi: 10.1093/NEUONC/NOAB106,.
- [2] J. White, M. P. J. White, A. Wickremesekera, L. Peng, and C. Gray, “The tumour microenvironment, treatment resistance and recurrence in glioblastoma,” *Journal of Translational Medicine* 2024 22:1, vol. 22, no. 1, pp. 1–14, Jun. 2024, doi: 10.1186/S12967-024-05301-9.
- [3] B. Rodríguez-Mendoza *et al.*, “Glioblastoma y su interacción con la neurogénesis,” *Rev Neurol*, vol. 79, no. 10, p. 279, Nov. 2024, doi: 10.33588/RN.7910.2024226.
- [4] L. C. Hou, A. Veeravagu, A. R. Hsu, and V. C. K. Tse, “Recurrent glioblastoma multiforme: a review of natural history and management options,” *Neurosurg Focus*, vol. 20, no. 4, p. Art. no. E5, 2006, doi: 10.3171/FOC.2006.20.4.2,.
- [5] B. Oronsky, T. R. Reid, A. Oronsky, N. Sandhu, and S. J. Knox, “A Review of Newly Diagnosed Glioblastoma,” *Front Oncol*, vol. 10, p. Art. no. 574012, Feb. 2021, doi: 10.3389/FONC.2020.574012,.
- [6] Q. T. Ostrom *et al.*, “CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2016-2020,” *Neuro Oncol*, vol. 25, no. 12 Suppl 2, pp. IV1–IV99, Oct. 2023, doi: 10.1093/NEUONC/NOAD149,.
- [7] Q. T. Ostrom *et al.*, “CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016,” *Neuro Oncol*, vol. 21, no. Suppl 5, pp. V1–V100, Oct. 2019, doi: 10.1093/NEUONC/NOZ150,.
- [8] B. Tran and M. A. Rosenthal, “Survival comparison between glioblastoma multiforme and other incurable cancers,” *Journal of Clinical Neuroscience*, vol. 17, no. 4, pp. 417–421, Apr. 2010, doi: 10.1016/J.JOCN.2009.09.004.
- [9] M. Price *et al.*, “Childhood, adolescent, and adult primary brain and central nervous system tumor statistics for practicing healthcare providers in neuro-oncology, CBTRUS 2015–2019,” *Neurooncol Pract*, vol. 11, no. 1, pp. 5–25, Feb. 2024, doi: 10.1093/NOP/NPAD061,.
- [10] S. Grochans *et al.*, “Epidemiology of Glioblastoma Multiforme–Literature Review,” *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 10, p. Art. no. 2412, May 2022, doi: 10.3390/CANCERS14102412,.
- [11] R. D. Read, Z. M. Tapp, P. Rajappa, and D. Hambardzumyan, “Glioblastoma microenvironment—from biology to therapy,” *Genes Dev*, vol. 38, no. 9–10, pp. 360–379, 2024, doi: 10.1101/GAD.351427.123,.
- [12] A. Buonfiglioli and D. Hambardzumyan, “Macrophages and microglia: the cerberus of glioblastoma,” *Acta Neuropathologica Communications* 2021 9:1, vol. 9, no. 1, pp. 1–21, Mar. 2021, doi: 10.1186/S40478-021-01156-Z.
- [13] J. Ma, C. C. Chen, and M. Li, “Macrophages/Microglia in the Glioblastoma Tumor Microenvironment,” *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 5775, vol. 22, no. 11, p. 5775, May 2021, doi: 10.3390/IJMS22115775.

- [14] J. I. Erices *et al.*, "Glioblastoma Microenvironment and Invasiveness: New Insights and Therapeutic Targets," *Int J Mol Sci*, vol. 24, no. 8, p. Art. no. 7047, Apr. 2023, doi: 10.3390/IJMS24087047,.
- [15] Z. Chen and D. Hambardzumyan, "Immune microenvironment in glioblastoma subtypes," *Front Immunol*, vol. 9, no. MAY, p. 338950, May 2018, doi: 10.3389/FIMMU.2018.01004/BIBTEX.
- [16] R. Stupp *et al.*, "Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma," *New England Journal of Medicine*, vol. 352, no. 10, pp. 987–996, Mar. 2005, doi: 10.1056/NEJMOA043330,.
- [17] L. R. Schaff and I. K. Mellinghoff, "Glioblastoma and Other Primary Brain Malignancies in Adults: A Review," *JAMA*, vol. 329, no. 7, pp. 574–587, Feb. 2023, doi: 10.1001/JAMA.2023.0023,.
- [18] J. I. Ausman, T. A. Wilson, M. A. Karajannis, D. H. Harter, M. A. Karajannis - MatthiasKarajannis, and D. H. Harter -DavidHarter, "Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics," *Surg Neurol Int*, vol. 5, no. Supplement, p. 64, 2014, doi: 10.4103/2152-7806.132138.
- [19] A. Arora and K. Somasundaram, "Glioblastoma vs temozolomide: can the red queen race be won?," *Cancer Biol Ther*, vol. 20, no. 8, p. 1083, Aug. 2019, doi: 10.1080/15384047.2019.1599662.
- [20] W. P. Roos *et al.*, "Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine," *Oncogene*, vol. 26, no. 2, pp. 186–197, Jan. 2007, doi: 10.1038/SJ.ONC.1209785,.
- [21] D. Matthaios *et al.*, "Revisiting Temozolomide's role in solid tumors: Old is gold?," *J Cancer*, vol. 15, no. 11, p. 3254, 2024, doi: 10.7150/JCA.94109.
- [22] N. Singh, A. Miner, L. Hennis, and S. Mittal, "Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma - a comprehensive review," *Cancer Drug Resistance*, vol. 4, no. 1, pp. 17–43, 2021, doi: 10.20517/CDR.2020.79,.
- [23] R. Shaw, M. Basu, S. Karmakar, and M. K. Ghosh, "MGMT in TMZ-based glioma therapy: Multifaceted insights and clinical trial perspectives," *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, vol. 1871, no. 3, p. Art. no. 119673, Mar. 2024, doi: 10.1016/j.bbamcr.2024.119673.
- [24] A. P. Candiota and C. Arús, "Establishing Imaging Biomarkers of Host Immune System Efficacy during Glioblastoma Therapy Response: Challenges, Obstacles and Future Perspectives," *Metabolites*, vol. 12, no. 3, p. Art. no. 243, Mar. 2022, doi: 10.3390/METABO12030243,.
- [25] B. Decraene, Y. Yang, F. De Smet, A. D. Garg, P. Agostinis, and S. De Vleeschouwer, "Immunogenic cell death and its therapeutic or prognostic potential in high-grade glioma," *Genes & Immunity* 2022 23:1, vol. 23, no. 1, pp. 1–11, Jan. 2022, doi: 10.1038/s41435-021-00161-5.
- [26] A. D. Garg *et al.*, "A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death," *EMBO J*, vol. 31, no. 5, p. 1062, Mar. 2012, doi: 10.1038/EMBOJ.2011.497.

- [27] S. Wang and Y. Zhang, "HMGB1 in inflammation and cancer," *J Hematol Oncol*, vol. 13, no. 1, p. 116, Aug. 2020, doi: 10.1186/S13045-020-00950-X.
- [28] L. Villamañan, L. Martínez-escardó, C. Arús, V. J. Yuste, and A. P. Candiota, "Successful partnerships: Exploring the potential of immunogenic signals triggered by TMZ, CX-4945, and combined treatment in GL261 glioblastoma cells," *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 7, p. Art. no. 3453, Apr. 2021, doi: 10.3390/IJMS22073453,.
- [29] F. Pasi, A. Paolini, R. Nano, R. Di Liberto, and E. Capelli, "Effects of single or combined treatments with radiation and chemotherapy on survival and danger signals expression in glioblastoma cell lines," *Biomed Res Int*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/453497,.
- [30] T. G. Kim *et al.*, "Immunological factors relating to the antitumor effect of temozolomide chemoimmunotherapy in a murine glioma model," *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 17, no. 1, pp. 143–153, Jan. 2010, doi: 10.1128/CVI.00292-09/ASSET/A2C27450-4EF4-45BD-A46E-777058E82A81/ASSETS/GRAPHIC/ZCD0011037010008.JPEG.
- [31] D. B. Zamler *et al.*, "Immune landscape of a genetically engineered murine model of glioma compared with human glioma," *JCI Insight*, vol. 7, no. 12, p. Art. no. e148990, Jun. 2022, doi: 10.1172/JCI.INSIGHT.148990,.
- [32] T. Szatmári *et al.*, "Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy," *Cancer Sci*, vol. 97, no. 6, pp. 546–553, Jun. 2006, doi: 10.1111/J.1349-7006.2006.00208.X,.
- [33] M. Kapałczyńska *et al.*, "2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures," *Arch Med Sci*, vol. 14, no. 4, p. 910, 2016, doi: 10.5114/AOMS.2016.63743.
- [34] K. Duval *et al.*, "Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture," *Physiology*, vol. 32, no. 4, pp. 266–277, Jun. 2017, doi: 10.1152/PHYSIOL.00036.2016,.
- [35] R. V. Simões, M. L. García-Martín, S. Cerdán, and C. Arús, "Perturbation of mouse glioma MRS pattern by induced acute hyperglycemia," *NMR Biomed*, vol. 21, no. 3, pp. 251–264, Mar. 2008, doi: 10.1002/NBM.1188,.
- [36] M. Obeid *et al.*, "Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death," *Nat Med*, vol. 13, no. 1, pp. 54–61, Jan. 2007, doi: 10.1038/NM1523,.
- [37] K. Białkowska, P. Komorowski, M. Bryszewska, and K. Miłowska, "Spheroids as a type of three-dimensional cell cultures—examples of methods of preparation and the most important application," *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 17, pp. 1–17, Sep. 2020, doi: 10.3390/IJMS21176225,.
- [38] S. Mangani, S. Kremmydas, and N. K. Karamanos, "Mimicking the Complexity of Solid Tumors: How Spheroids Could Advance Cancer Preclinical Transformative Approaches," *Cancers (Basel)*, vol. 17, no. 7, Apr. 2025, doi: 10.3390/CANCERS17071161,.
- [39] B. Kaina, L. Beltzig, and H. Strik, "Temozolomide – Just a Radiosensitizer?," *Front Oncol*, vol. 12, p. 912821, Jun. 2022, doi: 10.3389/FONC.2022.912821.
- [40] R. Diegmiller, L. Salphati, B. Alick, T. R. Wilson, T. J. Stout, and M. Hafner, "Growth-rate model predicts in vivo tumor response from in vitro data," *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*, vol. 11, no. 9, pp. 1183–1193, Sep. 2022, doi: 10.1002/PSP4.12836,.

- [41] V. J. Herbener *et al.*, "Considering the Experimental Use of Temozolomide in Glioblastoma Research," *Biomedicines*, vol. 8, no. 6, p. 151, Jun. 2020, doi: 10.3390/BIOMEDICINES8060151.
- [42] E. T. Wong, J. Timmons, A. Callahan, L. O'Loughlin, B. Giarusso, and D. C. Alsop, "Phase I study of low-dose metronomic temozolomide for recurrent malignant gliomas," *BMC Cancer*, vol. 16, no. 1, pp. 1–10, Nov. 2016, doi: 10.1186/S12885-016-2945-2/FIGURES/3.
- [43] D. V. Krysko, R. Demuynck, I. Efimova, F. Naessens, O. Krysko, and E. Catanzaro, "In Vitro Veritas: From 2D Cultures to Organ-on-a-Chip Models to Study Immunogenic Cell Death in the Tumor Microenvironment," *Cells*, vol. 11, no. 22, Nov. 2022, doi: 10.3390/CELLS11223705,.
- [44] D. Y. Kim *et al.*, "Imaging Calreticulin for Early Detection of Immunogenic Cell Death During Anticancer Treatment," *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 62, no. 7, pp. 956–960, Jul. 2021, doi: 10.2967/JNUMED.120.245290,.
- [45] J. Schatz *et al.*, "Normofractionated irradiation and not temozolomide modulates the immunogenic and oncogenic phenotype of human glioblastoma cell lines," *Strahlentherapie und Onkologie*, vol. 199, no. 12, pp. 1140–1151, Dec. 2023, doi: 10.1007/S00066-022-02028-8,.
- [46] Y. J. Wang, R. Fletcher, J. Yu, and L. Zhang, "Immunogenic effects of chemotherapy-induced tumor cell death," *Genes Dis*, vol. 5, no. 3, p. 194, Sep. 2018, doi: 10.1016/J.GENDIS.2018.05.003.
- [47] K. Matsusaka *et al.*, "Distinct roles in phagocytosis of the early and late increases of cell surface calreticulin induced by oxaliplatin," *Biochem Biophys Rep*, vol. 29, p. Art. no. 101222, Mar. 2022, doi: 10.1016/J.BBREP.2022.101222.
- [48] C. H. Fan, W. L. Liu, H. Cao, C. Wen, L. Chen, and G. Jiang, "O6-methylguanine DNA methyltransferase as a promising target for the treatment of temozolomide-resistant gliomas," *Cell Death Dis*, vol. 4, no. 10, p. Art. no. e876, Oct. 2013, doi: 10.1038/CDDIS.2013.388,.
- [49] K. Yoshimoto *et al.*, "Complex DNA repair pathways as possible therapeutic targets to overcome temozolomide resistance in glioblastoma," *Front Oncol*, vol. 2, 2012, doi: 10.3389/FONC.2012.00186.
- [50] S. Liu *et al.*, "3D culture boosting fullerene nanoparticles to induce calreticulin exposure on MCF-7 cells for enhanced macrophage-mediated cell removal," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 224, p. 113204, Apr. 2023, doi: 10.1016/J.COLSURFB.2023.113204.
- [51] B. Pinto, A. C. Henriques, P. M. A. Silva, and H. Bousbaa, "Three-Dimensional Spheroids as In Vitro Preclinical Models for Cancer Research," *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 12, p. 1186, Dec. 2020, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS12121186.
- [52] I. Martins *et al.*, "Premortem autophagy determines the immunogenicity of chemotherapy-induced cancer cell death," *Autophagy*, vol. 8, no. 3, pp. 413–415, 2012, doi: 10.4161/AUTO.19009,.



- [53] E. Braganhol, G. P. B. de Andrade, G. T. Santos, and M. A. Stefani, "ENTPD1 (CD39) and NTSE (CD73) expression in human glioblastoma: an in silico analysis," *Purinergic Signal*, vol. 20, no. 3, p. 285, Jun. 2023, doi: 10.1007/S11302-023-09951-0.
- [54] M. Domènech, A. Hernández, A. Plaja, E. Martínez-balibrea, and C. Balañà, "Hypoxia: The Cornerstone of Glioblastoma," *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 22, p. 12608, Nov. 2021, doi: 10.3390/IJMS222212608.
- [55] F. B. Chekeni *et al.*, "Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis," *Nature*, vol. 467, no. 7317, pp. 863–867, Oct. 2010, doi: 10.1038/NATURE09413,.
- [56] H. Imamura *et al.*, "Single-cell dynamics of pannexin-1-facilitated programmed ATP loss during apoptosis," *Elife*, vol. 9, pp. 1–20, Oct. 2020, doi: 10.7554/ELIFE.61960,.
- [57] T. Riss and O. J. Trask, "Factors to consider when interrogating 3D culture models with plate readers or automated microscopes," *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, vol. 57, no. 2, pp. 238–256, Feb. 2021, doi: 10.1007/S11626-020-00537-3,.
- [58] F. Martin *et al.*, "MTS, WST-8, and ATP viability assays in 2D and 3D cultures: Comparison of methodologically different assays in primary human chondrocytes," *Clin Hemorheol Microcirc*, vol. 88, no. s1, pp. S3–S19, Nov. 2024, doi: 10.3233/CH-248101,.
- [59] Z. Li *et al.*, "Autophagy-based unconventional secretion of HMGB1 in glioblastoma promotes chemosensitivity to temozolomide through macrophage M1-like polarization," *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, vol. 41, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1186/S13046-022-02291-8,.
- [60] C. Janko *et al.*, "Redox Modulation of HMGB1-Related Signaling," *Antioxid Redox Signal*, vol. 20, no. 7, pp. 1075–1085, Mar. 2014, doi: 10.1089/ARS.2013.5179.
- [61] Y. Zhou *et al.*, "Temozolomide-based sonodynamic therapy induces immunogenic cell death in glioma," *Clinical Immunology*, vol. 256, p. Art. no. 109772, Nov. 2023, doi: 10.1016/j.clim.2023.109772.
- [62] J. Fucikova *et al.*, "Detection of immunogenic cell death and its relevance for cancer therapy," *Cell Death Dis*, vol. 11, no. 11, Nov. 2020, doi: 10.1038/S41419-020-03221-2,.
- [63] G. Kroemer, C. Galassi, L. Zitvogel, and L. Galluzzi, "Immunogenic cell stress and death," *Nat Immunol*, vol. 23, no. 4, pp. 487–500, Apr. 2022, doi: 10.1038/S41590-022-01132-2,.