

Mecanismo de células dendríticas derivadas de sangre periférica humana en la regulación de la autofagia en células de carcinoma

Yiming Liu, Mengqiang Song, HaoYuan, Xianpei Xiao, Jinghao Shu y Wanlong Pan*

Facultad de Medicina Básica, Universidad de Medicina del Norte de Sichuan, Nanchong, China

Resumen

Introducción: Las células dendríticas (CD) están involucradas en el reconocimiento, respuesta y modulación inmunológicos relacionados con la aparición del cáncer. **Objetivo:** Explorar el mecanismo de las CD en la inhibición de la autofagia de las células del hepatoma. **Métodos:** Células mononucleares de sangre periférica humana se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll y se indujeron en CD, las cuales fueron cocultivadas con células HepG2 por ensayo de migración Transwell. La actividad de las células HepG2 se determinó mediante ensayo CCK8. La expresión del índice de autofagia LC3 se midió con análisis de transferencia Western y la expresión y secreción de citocinas mediante qRT-PCR y ELISA. **Resultados:** En el sistema de cocultivo, las CD redujeron la viabilidad de HepG2; la expresión de IL-2, IL-12, IL-10 e IFN- γ en CD también se inhibió significativamente, si bien IL-2 e IFN- γ aún se expresaron 0.6 y 0.53 más que en el grupo de control. **Conclusión:** Las CD pueden regular la autofagia de las células del carcinoma hepatocelular. El mecanismo puede estar relacionado con la síntesis y liberación de citocinas como IL-2, IL-12 e IFN- γ por parte de las CD.

PALABRAS CLAVE: Autofagia. Células de carcinoma. Células dendríticas. HepG2.

Mechanism of human peripheral blood-derived dendritic cells in the regulation of autophagy in carcinoma cells

Abstract

Introduction: Dendritic cells (DC) are involved in immune recognition, response and immunomodulation mechanisms related to the onset of cancer. **Objective:** To explore DCs mechanism in the inhibition of autophagy in hepatoma cells. **Methods:** Human peripheral blood mononuclear cells were isolated by Ficoll density gradient centrifugation and induced into DCs, which were co-cultured with HepG2 cells by Transwell migration assay. HepG2 cell activity was determined using the CCK8 assay. LC3 autophagy index expression was measured with Western blot analysis, and the expression and secretion of cytokines, with qRT-PCR and ELISA. **Results:** In the co-culture system, DCs were able to reduce HepG2 cells viability; IL-2, IL-12, IL-10 and IFN- γ expression in DCs was also significantly inhibited, although IL-2 and IFN- γ were still expressed 0.6 and 0.53 more than in the control group. **Conclusion:** DCs can regulate autophagy in hepatocellular carcinoma cells. The mechanism may be related to the synthesis and release of cytokines such as IL-2, IL-12 and IFN- γ by DCs.

KEYWORDS: Autophagy. Carcinoma cells. Dendritic cells. HepG2.

*Correspondencia:

Wanlong Pan

E-mail: panwl@aliyun.com

0016-3813/© 2022 Academia Nacional de Medicina de México, A.C. Publicado por Permanyer. Este es un artículo *open access* bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Fecha de recepción: 14-04-2022

Fecha de aceptación: 07-07-2022

DOI: 10.24875/GMM.22000124

Gac Med Mex. 2022;158:372-379

Disponible en PubMed

www.gacetamedicademexico.com

Introducción

El carcinoma hepatocelular (CHC) es un tipo de cáncer de hígado primario. Es el sexto cáncer más común en todo el mundo y una de las cuatro causas principales de muerte relacionada con el cáncer. Para 2040, se estima que la incidencia mundial de cáncer de hígado aumentará 1.62 veces respecto a la de 2018.¹ En los últimos años, la resección quirúrgica es una de las principales modalidades terapéuticas del CHC. Numerosos pacientes son diagnosticados con CHC avanzado sin indicación de tratamiento quirúrgico. Dado que el riesgo de complicaciones después de la cirugía aumenta con el aumento de la edad,² es particularmente importante encontrar enfoques terapéuticos más efectivos para prolongar la vida de los pacientes y mejorar la calidad de vida.

Dado que la aparición y el desarrollo del cáncer están estrechamente relacionados con el sistema inmunológico del cuerpo, la terapia inmunológica tiene un gran potencial. Como las únicas células presentadoras de antígenos de tiempo completo que pueden activar las células T *in vivo*, las células dendríticas (CD) desempeñan un papel importante en el reconocimiento inmunológico, la respuesta inmunológica y la inmunomodulación en el cuerpo.³ Una cantidad considerable de investigación ha indicado que el CHC es capaz de inducir el escape inmunitario mediante la inhibición de la función de CD, para así eludir los ataques del propio sistema inmunitario. Las CD también funcionan como importantes células antitumorales,^{4,5} actúan como células intermedias de activación tumoral a antitumoral al activar la respuesta inmunitaria.⁶ Además, la función de las CD inmaduras es como la de los macrófagos que fagocitan y matan las células tumorales. Por lo tanto, las CD podrían tener una eficacia antitumoral directa, mientras que rara vez se informan sus acciones directas sobre el tumor.

La autofagia es una vía celular esencial para el desarrollo, la diferenciación, la supervivencia y la homeostasis. Está estrechamente relacionada con el desarrollo y la progresión del cáncer. LC3-I se puede convertir en LC3-II y unirse a la membrana del autofagosoma en la autofagia. Este proceso es esencial para la formación de autofagosomas. Además, LC3-II se degrada después de que los lisosomas se fusionan con los autofagosomas, lo que permite que funcione como un marcador de

autofagia.⁷⁻⁹ Mientras tanto, la expresión de LC3, muestra correlación con el pronóstico del CHC. Las células eucariotas cumplen este propósito de recuperación de material y generación de energía a través de la fusión del autofagosoma con los lisosomas, para formar autolisomas que degradan la sustancia;¹⁰ el autofagosoma desempeña un papel crítico en el metabolismo de una variedad de sustancias en las células.¹¹⁻¹³ Los estudios han demostrado que el agotamiento de Atg5 o Atg7, genes relacionados con la autofagia, deriva en múltiples neoplasias hepáticas. Se ha observado que los ratones desarrollan un tumor relacionado con el hígado con inactivación de Atg5, fuerte evidencia de que la autofagia suprime el efecto tumoral.^{14,15} En resumen, la autofagia es extremadamente importante en la actividad patológica asociada al tumor.

En este estudio, exploramos el mecanismo de las CD en la inhibición de la autofagia de las células de hepatoma, con el propósito de establecer la base teórica para investigar los mecanismos relacionados con el inicio y desarrollo de tumores y coadyuvar a encontrar las terapias y estrategias farmacológicas. Específicamente, se utilizaron monocitos de sangre periférica humana para inducir las CD, y para su observación y análisis se cultivaron conjuntamente CD con células de hepatoma mediante el sistema Transwell.

Métodos

Cultivo de células de hepatoma HepG2

Las células HepG2 se cocultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco alto en glucosa (Saibo Kang Biotechnology, Shanghái, China) que contenía 10 % de FBS a 37 °C y 5 % de dióxido de carbono. El medio fresco se cambió cada dos o tres días.

Inducción de células dendríticas

Se recogieron 50 mL de sangre periférica humana de voluntarios sanos (certificado de ética 202119) y se aislaron células mononucleares (CMSP) mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll. Además, se añadieron citocinas a las células con 10 ng/mL de GM-CSF y 10 ng/mL de IL-4 (novoproteína). También se añadió suficiente suplemento de citocinas cada 2.5 días. En el día 7, se añadieron 100 ng/mL de IL-1β para inducir las CD; se obtuvieron CD maduras después de 24 horas.

Detección fenotípica de CD mediante citometría de flujo

Las CD y CMSP obtenidas se recogieron y suspendieron ($1\text{-}5 \times 10^6/\text{mL}$) usando anti-CD14 PE, anti-CD83 PE, anti-CD80 PE y anti-CD86 PE (BD Bioscience). El fenotipo celular se determinó por citometría de flujo (Agilent Biosciences) y los resultados se digitalizaron con el programa ACEA NovoExpress.

Sistema de cocultivo Transwell de CD-HepG2

El sistema de cocultivo se construyó con una placa Transwell de seis pocillos, 0.3 μm de tamaño de poro (Corning). Se sembraron HepG2 y CD en las cámaras inferior y superior. Mientras tanto, se estableció por separado un control en blanco de HepG2. Tanto el grupo de cocultivo como el grupo de control en blanco se mantuvieron a 37 °C y 5 % de dióxido de carbono. Después de 48 horas, se recogieron las células HepG2 del sobrenadante y del compartimento inferior.

Efecto de las CD en la viabilidad de HepG2

Se tomó un número adecuado e igual de células del grupo de cocultivo y del grupo de control, y se adhirieron en una placa de 96 pocillos. Mientras tanto, se estableció el grupo de control en blanco. Después de eso, a cada pozo se agregó 1 mL de medio fresco y 20 mL de reactivo CCK-8 (GBC BIO Technology), que se incubaron durante dos horas; se utilizó un lector de microplacas para detectar la absorbancia a 450 nm. De acuerdo con los resultados calculó la vitalidad celular.

Expresión de la proteína de autofagia (LC3) de las células HepG2 detectada por Western blot

La proteína de HepG2 se extrajo utilizando el kit SDS-PAGE (Beyotime Biotechnology, Shanghái, China). Las concentraciones de proteínas se determinaron utilizando un kit de ensayo de proteínas BCA (Shanghai Fuheng Biotechnology). Luego, la proteína se separó usando SDS-PAGE y se transfirió a una membrana de fluoruro de polivinilideno. Después de bloquearla durante una hora con leche en polvo descremada a 5 %, se agregó el

anticuerpo primario (anti-LC3, Proteintech Group y β -actina, Zen-Bio) y se agitó durante la noche a 4 °C. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario (Zen-Bio) y las células se agitaron a temperatura ambiente durante una hora. La quimioluminiscencia se realizó utilizando el kit ECL (Shanghai Biyuntian Biotechnology) y se detectó mediante ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad). Los datos fueron analizados con el programa ImageJ.

Expresión de IL-10, IL-12, IL-2, IFN- γ en CD

La expresión de IL-10, IL-12, IL-2 e IFN- γ en CD se detectó mediante ensayo qRT-PCR. El ARN total se aisló de HepG2 recogido del grupo cocultivado y del grupo de control mediante 1 mL de reactivo TRIzol (Invitrogen, Estados Unidos). Se transcribió inversamente un total de 2 μg de ARN en ADNc utilizando cebadores aleatorios y el kit de síntesis de ADNc de primera hebra Revert Aid (Thermo Fisher, Estados Unidos). El ADNc se realizó mediante QIAGEN miR-Neasy Mini Kit (QIAGEN, Estados Unidos). La PCR en tiempo real se realizó mediante TaqMan MicroRNA Assays (QIAGEN, Estados Unidos) y UltraSYBR Mixture (WCBIO, Jiangsu, China) en el sistema de detección de secuencias Bio-Rad (Applied Biosystems, Foster City, California, Estados Unidos). El nivel de las expresiones relativas de IL-10, IL-12, IL-2 e IFN- γ se calcularon utilizando el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ y se normalizaron a β -actina. Las secuencias de los cebadores utilizados para la PCR fueron (5'-3'):

- IL-2 F: CTCACCAGGATGCTCACATT, R: TACAATGGTTGCTGTCTCATCA.
- IL-10 F: AGGGCACCCAGTCTGAGAAC, R: CGGCCTTGCTCTGTTTCAC.
- IL-12 F: ACCTGACCCACCCAAGAACT, R: TGTTACTGCCAGGACCCATA.
- IFN- γ F: TGTTACTGCCAGGACCCATA, R: CTTCCTTGATGGTCTCCACA.

Concentraciones de IL-12 e IFN- γ en los sobrenadantes

Las concentraciones de IL-12 e IFN- γ en los sobrenadantes se detectaron mediante ELISA. El experimento se realizó según las instrucciones del kit ELISA p30 de IL-12 humana (Multisciences [Lianke] Biotech) y el kit ELISA de IFN- γ humano (Camilo Biological, Nanjing).

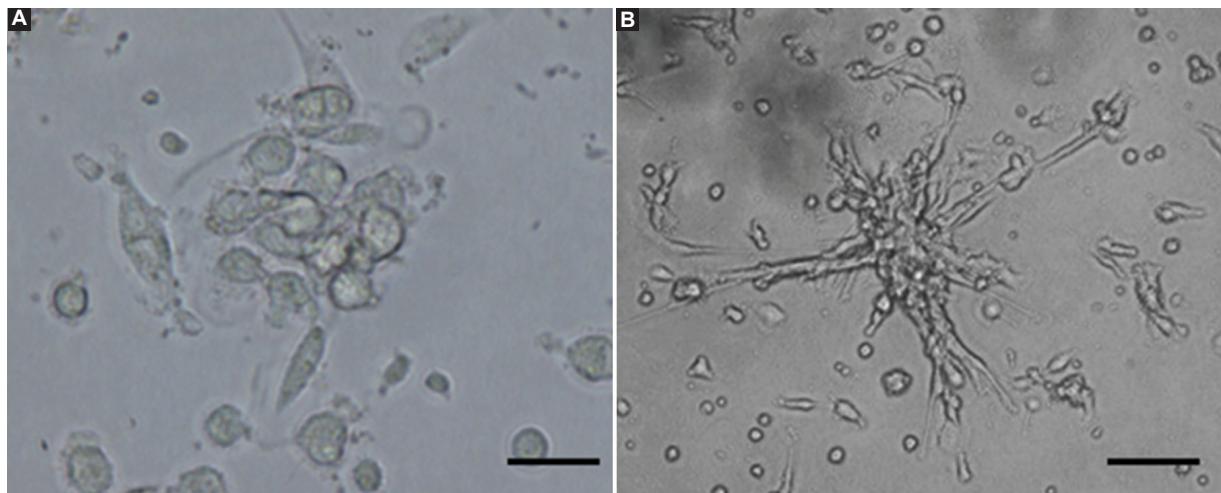


Figura 1. Identificación morfológica de las células dendríticas. Extracción de células mononucleares de sangre periférica humana, seguida de seis días de cultivo. A: GM-CSF e IL-4. Apareció una pequeña cantidad de estructuras similares a rebabas en las células cultivadas y el volumen se hizo más grande. Mientras tanto, las células cambiaron del estado adherente al semisuspendido. B: se agregó IL-1 β para inducir el cultivo durante 24 horas. Las células se volvieron a adherir a la pared y se presentaron en una forma dendrítica típica, una forma irregular con muchas rebabas. Las características morfológicas son de CD maduras.

Resultados

Inducción e identificación de CD

La morfología de las células cambió durante la inducción, posterior a la cual las CD mostraron una morfología típica, como se muestra en la Figura 1. Se utilizó citometría de flujo para evaluar las células con inducción completa por detectar la expresión de CD14, CD80, CD83 y CD86. Como se muestra en la Figura 2, los resultados indicaron que las características fenotípicas eran consistentes con las CD.

Defecto de las CD en la proliferación de células HepG2

El efecto de las CD sobre la proliferación de las células HepG2 se determinó mediante el ensayo CCK8. HepG2 y CD se cultivaron en el sistema de cocultivo Transwell durante 48 horas y se detectaron células HepG2 en el sistema de cocultivo. Como se muestra en la Figura 3, en comparación con HepG2 cultivada sola, la cantidad de células vivas en HepG2 cocultivada con CD disminuyó significativamente después de 48 horas y la cantidad de células vivas en el grupo de cocultivo fue 0.64 veces mayor que la del grupo de control. La diferencia fue significativa ($p < 0.01$).

CD que potencian la autofagia en HepG2

Después de cultivar CD y HepG2 en un sistema de cocultivo durante 48 horas, las células HepG2 se recolectaron y lisaron para extraer proteínas. Las proteínas marcadoras de autofagia LC3-I y LC3-II se detectaron con Western blot. Como se muestra en la Figura 4, en comparación con HepG2 cultivada sola, la expresión de LC3-I y LC3-II en células HepG2 en el sistema de cocultivo CD-HepG2 aumentó significativamente. Específicamente, LC3-I y LC3-II de las células HepG2 en el grupo de cocultivo fueron 3.3 y 1.8 veces mayores que las del grupo de control.

HepG2 inhibiendo la expresión de citocinas CD

En las CD de la cámara superior del sistema Transwell, se usó qRT-PCR para detectar la expresión de IFN- γ , IL-12, IL-10 e IL-2. Se encontró que la expresión de IFN- γ , IL-12, IL-10 e IL-2 en las CD cocultivadas durante 48 horas fue significativamente menor que en las CD cultivadas solas (grupo de control en blanco). Como se muestra en la Figura 5, en comparación con el grupo sin cocultivo, la expresión de IL-10 e IL-12 se inhibió en 0.234, 0.0021, 0.003 y 0.26, respectivamente, con una diferencia significativa ($p < 0.01$). En particular, la expresión de IL-10 e IL-12 se inhibió en

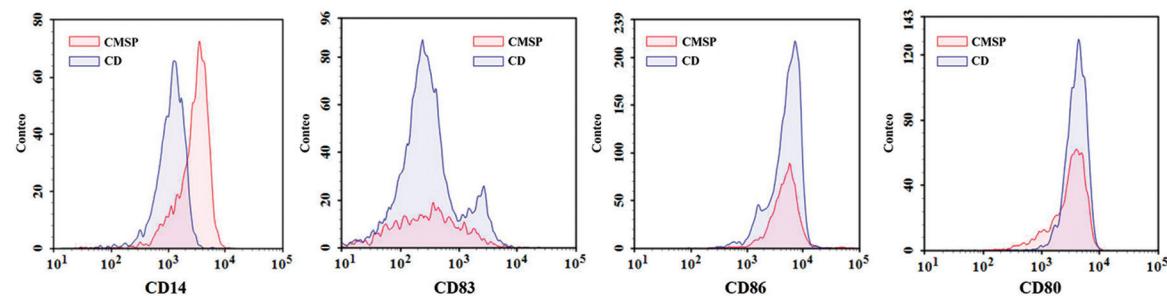


Figura 2. Fenotipo de citometría de flujo de células y CMSP después de siete días de inducción. Se cuantificó la expresión de CD14, CD83, CD86 y CD80 en la superficie. Las regiones rojas fueron CMSP y las regiones azules, CD. En comparación con las CMSP antes de la inducción, la expresión de CD14 disminuyó en las células inducidas y la expresión de CD80, CD83 y CD86 aumentó significativamente. CD: células dendríticas; CMSP: células mononucleares de sangre periférica humana.

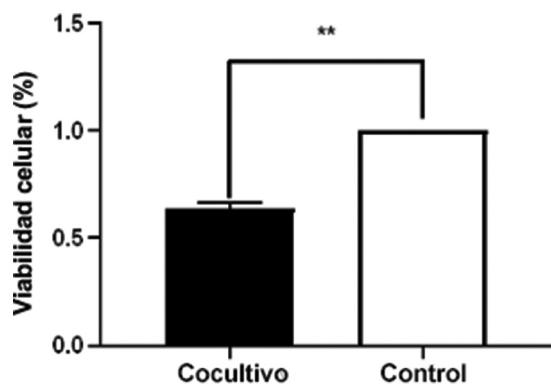


Figura 3. Análisis CCK8 de HepG2. En comparación con HepG2 cultivada sola, la cantidad de células vivas en HepG2 cocultivada con CD disminuyó a 0.64 veces en comparación con el grupo de control. Fórmula: viabilidad celular (%) = ([grupo experimental] – [grupo en blanco])/([grupo de control] – [grupo en blanco]) *100 %.

aproximadamente 100 %, y la expresión de IFN- γ e IL-2 solo se inhibió parcialmente en aproximadamente 75 %, lo que significa que 48 horas después del cocultivo las CD todavía expresaban IFN- γ y genes IL-2.

Citocinas reductoras de HepG2 secretadas por CD

Se usó ELISA para detectar IFN- γ e IL-12 secretados por CD. En comparación con las CD cultivadas solas (grupo de control en blanco), la IL-12 y el IFN- γ secretados por las CD (grupo experimental) en el sobrenadante después del cocultivo durante 48 horas se redujeron significativamente ($p < 0.01$). Los resultados se muestran en la Figura 6. El nivel de IL-12 e IFN- γ en el sobrenadante de CD en el grupo experimental fue 0.6 y 0.53 veces mayor que en el del grupo de control.

Aunque la secreción de IFN- γ e IL-12 en las células CD disminuyó significativamente, los resultados mostraron que aún se secretaban durante el cocultivo.

Discusión

Numerosos estudios han revelado que las CD son las células presentadoras de antígenos más potentes del cuerpo humano. Las células reconocen, ingieren, procesan y presentan antígenos para regular la respuesta inmunitaria del organismo. El mecanismo principal es la activación de los linfocitos T CD4+ o CD8+ para que participen en la respuesta inmunitaria contra los tumores mediante la síntesis del complejo peptídico-antígeno MHC, la expresión de moléculas coestimuladoras y la secreción de múltiples citocinas. El procedimiento se acompaña de la transición de la función de las CD desde la fagocitosis hasta la presentación durante la maduración. Las CD desempeñan un papel crucial en el efecto antitumoral de la inmunidad innata, pero rara vez se ha informado investigación sobre la actividad antitumoral directa de las CD.

En el sistema de cocultivo Transwell se seleccionó una membrana semipermeable microporosa con una apertura de 0.3 μ m, que evitaba el contacto directo entre CD y HepG2. Por lo tanto, las sustancias reguladoras de moléculas pequeñas, como las citocinas, se convirtieron en los factores más probables para inducir la autofagia de HepG2. Debido a la diferenciación, las funciones de las células inmunitarias son únicas. A diferencia de las células T citotóxicas a través de la expresión de FasL (ligando Fas) y la apoptosis de TRAIL,¹⁶ las CD no expresan las dos proteínas y las CD maduras tienen la característica de una alta expresión de citocinas.¹⁷

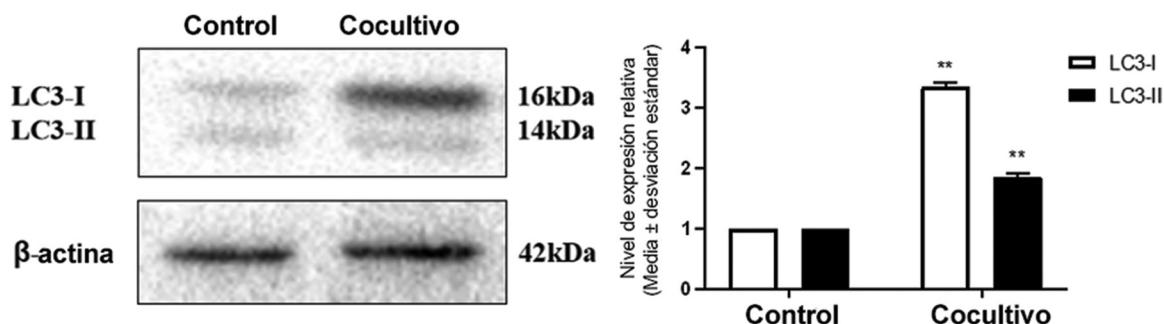


Figura 4. La expresión en HepG2 de LC3 fue detectada por Western blot. Las células HepG2 se aislaron y cultivaron en el grupo de control y en el grupo de cocultivo se cultivaron durante 48 horas. El valor gris del control β -actina fue 169 283; en la β -actina de cocultivo fue 169 283; en el control LC3-I fue 18 881; en el cocultivo LC3-II fue 202 596; en el control LC3-II fue 32 107 y en el cultivo de LC3-II fue 189 271.

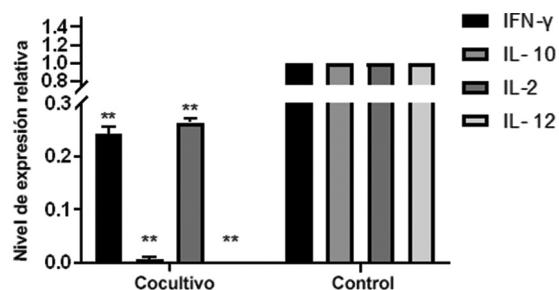


Figura 5. Expresiones de IFN- γ , IL-12, IL-10 e IL-2 en CD detectadas por PCR. Las CD del grupo de cocultivo se incubaron durante 48 horas y las CD del grupo de control se cultivaron por separado. IL-12 fue 0.0021 veces mayor que en el grupo sin cocultivo, IFN- γ fue 0.234 veces mayor que en el grupo sin cocultivo, IL-10 fue 0.003 veces mayor que en el grupo sin cocultivo, e IL-2 fue 0.26 veces mayor que en el grupo sin cocultivo, con una diferencia significativa ($p < 0.01$). CD: células dendríticas.

En este estudio, comparamos CD cocultivadas durante 48 horas mediante un sistema de cocultivo Transwell con CD cultivadas solas. Los resultados indicaron que se registró una marcada disminución de IL-2, IL-12, IL-10 e IFN- γ en las CD cocultivadas. Además, el nivel de IL-2 (0.26 veces) e IFN- γ (0.234 veces) fue significativamente menor que el de IL-12 (0.0021 veces) e IL-10 (0.003 veces). Las CD, como la mayoría de las células antitumorales, pueden ser obstaculizadas por las células y el microambiente tumorales. Para aclarar si estas citocinas de baja concentración pueden actuar sobre HepG2, mediante ELISA cuantificamos las expresiones de IL-12 e IFN- γ en el sobrenadante del cocultivo. Aunque la expresión de ambas citocinas disminuyó, se detectaron citocinas de tipo secretor en el sobrenadante; IL-12 y IFN- γ fueron mayores 0.6 y 0.53 veces, respectivamente, que las cultivadas individualmente. Aunque inhibidas en cierto grado, las CD pueden ejercer su función inmunológica mediante la liberación de citocinas, lo

que concuerda con las características de cantidades mínimas, pero con una alta eficiencia. En resumen, HepG2 no pudo inhibir completamente la función de las CD de expresar IFN- γ e IL-12, de las cuales se observó un alto nivel en el entorno de cocultivo.

Por lo tanto, tenemos razones para creer que las CD pueden inducir autofagia en HepG2 y ejercer un efecto antitumoral al expresar IL-12, IL-2 e IFN- γ . La investigación¹⁸ ha demostrado que el IFN- γ puede inducir la apoptosis de las células HepG2 al regular a la baja el nivel de la lipasa adipocítica de triglicéridos, aumentar la actividad de la caspasa-3 y disminuir la expresión de BCL-2. Además, Xu ha demostrado que el IFN- γ puede aumentar la expresión de Egr-1 para inducir la apoptosis de las células tumorales.¹⁹ Por otro lado, una considerable investigación ha indicado el estrecho vínculo entre la autofagia y la apoptosis. Por ejemplo, existe una cinasa c-Jun N-terminal (JNK) en la ruta común de la autofagia y la apoptosis que no solo puede fosforilar BCL-2 o BIM para inducir la autofagia, sino también evitar que BCL-2 inhiba las proteínas proapoptóticas BCL-2 y, por lo tanto, induzca la apoptosis.²⁰

Lo anterior ilustra el posible mecanismo por el que las CD inducen la autofagia al secretar IFN- γ . Mientras tanto, la IL-12 es también un potente inmunoestimulador antitumoral. El-Shemi *et al.* transfectaron TRAIL e IL-12 en células de CHC a través de adenovirus; sugirieron que el tratamiento de combinación mejoró notablemente el efecto citopático y antisupervivencia.²¹ En nuestro estudio, la IL-12 expresada en niveles bajos puede mejorar directamente la función de las CD y la liberación de HMGB1 (un inductor eficaz que conduce a la autofagia endógena y exógena), así como promover la autofagia en las células tumorales.²²

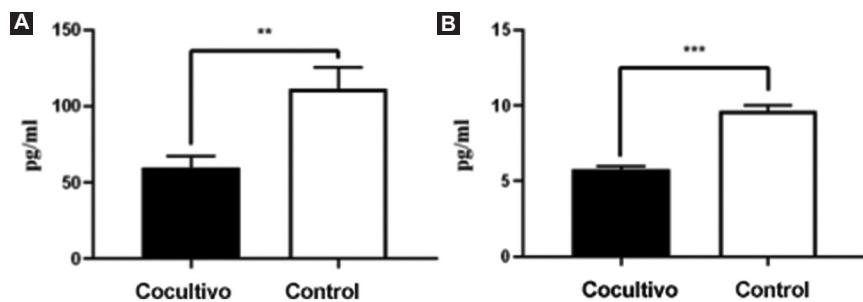


Figura 6. La expresión de citocinas en el sobrenadante de cocultivo fue detectada por ELISA. Se usó ELISA para detectar la secreción en el sobrenadante de las CD. A: IFN- γ . B: IL-12. En el sobrenadante de las CD en cocultivo, IL-12 y el IFN- γ fueron 0.6 y 0.53 veces mayores que en el grupo de control de CD cultivadas solas. CD: células dendríticas.

La regulación y expresión de las citocinas es compleja. Las CD son las células secretoras pero también las células diana de IL-12, IL-2 e IFN- γ , citocinas que regulan la secreción y la expresión entre sí.²³⁻²⁵ Quizás sea un factor importante que las CD habitadas por células tumorales aún puedan expresar estas citocinas y ejerzan sus efectos biológicos.

En conjunto, encontramos que las CD pueden mediar la autofagia de HepG2 a través de la expresión y secreción de citocinas IL-12, IL-2 e IFN- γ después del cocultivo con HepG2 durante 48 horas para ejercer su efecto antitumoral. El efecto inhibidor directo de las CD sobre las células de cáncer de hígado refleja la superioridad de las CD como posible vacuna antitumoral. En los últimos años, el efecto de la vacuna CD-CTL no es satisfactorio y, por lo tanto, se debe prestar más atención a las CD. Sin embargo, el mecanismo específico antitumoral directo de las CD aún debe investigarse con el fin de proponer nuevos objetivos y tratamientos para la terapia tumoral.

Conclusión

El mecanismo de las interacciones y la inducción de autofagia de las CD se investigó mediante el cultivo conjunto de estas y HepG2. Los resultados mostraron que en el sistema de cocultivo Transwell, HepG2 inhibía casi por completo la expresión de IL-10 e IL-12 en las CD y parcialmente la de IL-2 e IFN- γ , mientras que las CD aún podían mediar en la autofagia de HepG2 al secretar IL-12, IL-2 e IFN- γ . Se sugiere que las CD, con un potencial superior a las células inmunitarias antitumorales, pueden desempeñar un papel importante en la inmunidad antitumoral innata y en la preparación de vacunas contra tumores.

Agradecimientos

Gracias a la Plataforma de Innovación para la Investigación Médica Básica de la Universidad de Medicina del Norte de Sichuan, por apoyar nuestra investigación.

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de interés respecto a esta publicación.

Financiamiento

Este trabajo fue apoyado por el Proyecto de Investigación Clave del Departamento de Educación de la Provincia de Sichuan (no. 13ZA0221) y el Programa Nacional de Formación en Innovación y Emprendimiento para Estudiantes Universitarios 2020 (beca no. 202010634076).

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se realizaron experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Bibliografía

- Rawla P, Sunkara T, Muralidharan P, Raj JP. Update in global trends and aetiology of hepatocellular carcinoma. *Contemp Oncol.* 2018;22:141-150.

2. Freedman J. Microwave ablation of hepatocellular carcinomas in octogenarians. *Hepatoma Res.* 2020;6:10.
3. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity.* 2013;39:1-10.
4. Wu X, Gu Z, Chen Y, Chen B, Chen W, Weng L, et al. Application of PD-1 Blockade in Cancer Immunotherapy. *Comput Struct Biotechnol J.* 2019;17:661-674.
5. Mizukoshi E, Kaneko S. Immune cell therapy for hepatocellular carcinoma. *J Hematol Oncol.* 2019;12:52.
6. Shang N, Fignini M, Shangguan J, Wang B, Sun C, Pan L, et al. Dendritic cells based immunotherapy. *Am J Cancer Res.* 2017;7:2091-2102.
7. Lee YJ, Jang BK. The role of autophagy in hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2015;16:26629-26643.
8. Ogata M, Hino SI, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, et al. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol.* 2006;26:9220-9231.
9. Meng YC, Lou XL, Yang LY, Li D, Hou YQ. Role of the autophagy-related marker LC3 expression in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2020;146(5):1103-1113.
10. Rautou PE, Mansouri A, Lebrec D, Durand F, Valla D, Moreau R. Autophagy in liver diseases. *J Hepatol.* 2010;53:1123-1134.
11. Ezaki J, Matsumoto N, Takeda-Ezaki M, Komatsu M, Takahashi K, Hiraoka Y, et al. Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels. *Autophagy.* 2011 Jul;7(7):727-736.
12. Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature.* 2009;458:1131-1135.
13. Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, et al. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol.* 2005;169:425-434.
14. Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, et al. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev.* 2011;25:795-800.
15. Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, et al. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol.* 2005;169:425-434.
16. Martínez-Lostao L, Anel A, Pardo J. How do cytotoxic lymphocytes kill cancer cells? *Clin Cancer Res.* 2015;21:5047-5056.
17. Gardner A, Ruffell B. Dendritic cells and cancer immunity. *Trends Immunol.* 2016;37:855-865.
18. Hong H. IFN-gamma induces HepG2 apoptosis through downregulation of ATGL protein level. *World J Cancer Res.* 2018;8:42-48.
19. Xu B, Shu Y, Liu P. INF- γ sensitizes head and neck squamous cell carcinoma cells to chemotherapy-induced apoptosis and necroptosis through up-regulation of Egr-1. *Histol Histopathol.* 2014;29:1437-1443.
20. Mariño G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15:81-94.
21. El-Sheri AG, Ashshi AM, Na Y, Li Y, Basalamah M, Al-Allaf FA, et al. Combined therapy with oncolytic adenoviruses encoding TRAIL and IL-12 genes markedly suppressed human hepatocellular carcinoma both *in vitro* and *in an orthotopic transplanted mouse model*. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016;35:74.
22. Liang X, de Vera ME, Buchser WJ, de Vivar-Chávez AR, Loughran P, Stoltz DB, et al. Inhibiting systemic autophagy during interleukin 2 immunotherapy promotes long-term tumor regression. *Cancer Res.* 2012;72:2791-801.
23. Haagsman AN, Witkamp AC, Sjollema BE, Kik MJ, Kirpensteijn J. The effect of interleukin-2 on canine peripheral nerve sheath tumours after marginal surgical excision: a double-blind randomized study. *BMC Vet Res.* 2013;9:155.
24. Lowes MA, Suárez-Farinás M, Krueger JG. Inmunología de la psoriasis. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:227-255.
25. Ahmed MS, Byeon SE, Jeong Y, Miah MA, Salahuddin M, Lee Y, Park SS, Bae YS. Dab2, a negative regulator of DC immunogenicity, is an attractive molecular target for DC-based immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2015;4:e984550.