Facultad de Medicina

Departamento de Estudios Avanzados

Maestría en Ciencias de la Salud

Modificación de las proteínas reguladoras de ciclo celular en células de glioblastoma humano mediante el bloqueo farmacológico de las rutas de señalización WNT y TBK1

TESIS

Que para obtener el grado de Maestra en Ciencias de la Salud

Presenta:

Amanda Citlalli Hernández Gutiérrez

Comité de Tutores

Directora: Dra. Irazú Contreras García

Co-director: Dr. José Antonio Estrada Guadarrama

Asesor: Dr. Luis Ángel Zapi Colín

Toluca, Estado de México 2026

Índice

No. pág.

Resumen 4

Abstract 5

1. Introducción 6

1. Marco teórico 8

1.1 Glioblastoma 8

1.2 Tratamientos para el glioblastoma 10

1.3 Ciclo y muerte celular 11

1.4 Cinasas dependientes de ciclinas y regulación del ciclo celular 12

1.4.1 Función de CDK2 14

1.5 Cinasas dependientes de ciclinas en el glioblastoma 14

1.6 Vía de señalización WNT 15

1.7 Vía de señalización TBK1 17

2. Planteamiento del problema 19

3. Justificación 21

4. Hipótesis 23

5. Objetivos 24

6. Marco metodológico 25

a. Diseño de la investigación 25

b. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación 25

6.1 Cultivo celular 26

6.2 Extracción de proteínas 26

6.3 Western blot 27

7. **Operacionalización de las variables** 32

8. Análisis estadístico 34

9. Implicaciones Bioéticas 34

10. Resultados 35

a. Carta de envío de articulo 35

b. Resumen del artículo 36

11. Discusión 37

12. Conclusiones 39

13. Referencias Bibliográficas 40

14. Anexos 50

Resumen

El glioblastoma es la neoplasia maligna primaria del sistema nervioso central más agresiva y frecuente en adultos, caracterizada por su capacidad invasiva y resistencia a los tratamientos convencionales, por lo que es fundamental investigar los mecanismos implicados en su desarrollo. Entre estos, las vías WNT y TBK1 desempeñan un papel importante en la patogénesis del glioblastoma. Ambas están sobreexpresadas en este tipo de cáncer, favoreciendo la proliferación y resistencia a las terapias convencionales.

El objetivo de este estudio fue determinar los efectos del bloqueo farmacológico de WNT y TBK1 sobre la expresión de la proteína reguladora del ciclo celular CDK2 en las líneas celulares de glioblastoma humano U87MG y A172. Para ello, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los inhibidores farmacológicos IWP-12 y BX795 durante 24, 48 y 72 horas. La expresión de CDK2 se evaluó mediante western blot y análisis densitométrico. Los resultados mostraron cambios en la expresión de CDK2 tras el tratamiento los inhibidores. En U87MG, BX795 mostró una tendencia hacia una menor expresión de CDK2 con 1 y 10 μM a las 48 horas y con 0.1, 1 y 10 μM a las 72 horas, sin diferencias estadísticamente significativas. IWP-12 mostró tendencias hacia una menor expresión de CDK2 con concentraciones de 1 y 10 μM a las 24 y 48 horas. En A172, BX795 mostró una tendencia hacia una menor expresión de CDK2 con 1 y 10 μM a las 72 horas. IWP-12 produjo un aumento significativo de CDK2 a concentración 10 μM a 48 horas, mientras que a las 72 horas se observó una tendencia hacia una menor expresión en concentraciones 1 y 10 μM.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que la inhibición de WNT y TBK1 podría modular la expresión de CDK2, implicando el potencial de ambas vías como blancos terapéuticos para limitar el crecimiento tumoral.

Palabras clave: Glioblastoma, CDK2, WNT, TBK1, ciclo celular.

Abstract

Glioblastoma is the most aggressive and common primary malignant neoplasm of the central nervous system in adults, characterized by high invasiveness and resistance to conventional treatments. Investigating the mechanisms involved in its development is crucial. Among these, the WNT and TBK1 signaling pathways play important roles in glioblastoma pathogenesis. Both pathways are overexpressed in this type of cancer, promoting proliferation and resistance to conventional therapies.

The aim of this study was to determine the effects of pharmacological blockade of WNT and TBK1 on the expression of the cell-cycle regulatory protein CDK2 in human glioblastoma cell lines U87MG and A172. Cells were treated with different concentrations of the pharmacological inhibitors IWP-12 and BX795 for 24, 48, and 72 hours. CDK2 expression was evaluated by western blot and densitometry. The results showed changes in CDK2 expression following inhibitor treatment. In U87MG cells, BX795 showed a trend toward reduced CDK2 expression at 1 and 10 μM (48 hours) and at 0.1, 1, and 10 μM (72 hours), although these differences were not statistically significant. IWP-12 showed trends toward reduced CDK2 expression at concentrations of 1 and 10 μM after 24 and 48 hours. In A172 cells, BX795 showed a trend toward lower CDK2 expression at 1 and 10 μM after 72 hours. IWP-12 significantly increased CDK2 expression at a concentration of 10 μM at 48 hours, whereas after 72 hours, a trend toward reduced expression was observed at concentrations of 1 and 10 μM.

Together, these findings suggest that inhibition of WNT and TBK1 could modulate CDK2 expression, implicating their potential as therapeutic targets to limit tumor growth.

Keywords: Glioblastoma, CDK2, WNT, TBK1, cell cycle.

1. Introducción

El glioblastoma (GB) es el tipo de tumor cerebral primario más frecuente y agresivo en adultos. A pesar de los avances en las terapias convencionales, el pronóstico sigue siendo desalentador, con una vida media de 15 meses después del diagnóstico. Esto se debe a la heterogeneidad, el entorno inmunosupresor y la naturaleza invasiva que lo caracteriza (1).

Las cinasas dependientes de ciclina (CDK) son enzimas fundamentales que impulsan las transiciones del ciclo celular, y su expresión refleja el estado proliferativo del tumor. La expresión de CDK está correlacionada negativamente con la supervivencia de los pacientes con GB. Las CDK1, -2, -4, y 6 promueven directamente la progresión del ciclo celular, mientras que otras CDK, como las CDK7, -8 y –9, controlan la transcripción de genes relacionados. Dado que una de las características esenciales de las células cancerosas es su capacidad de proliferar de manera constante, no es sorprendente que casi todos los tipos de cáncer presenten alteraciones genómicas que activan continuamente las CDK, provocando un crecimiento y una división descontrolados de las células cancerosas. Estas observaciones han impulsado la investigación traslacional en el desarrollo de inhibidores de CDK, especialmente para tumores resistentes a tratamientos convencionales (2,3).

La señalización de WNT (wingless) se ha relacionado en la tumorigénesis de varios tipos de cáncer. En la mayoría de los tipos de cáncer, las alteraciones en la señalización de WNT suelen estar vinculadas principalmente con la activación excesiva de esta vía. La inhibición de la señalización por WNT ha mostrado resultados prometedores en cuanto a la supresión tumoral en numerosos modelos preclínicos. La señalización de WNT involucra diversos ligandos, receptores frizzled, correceptores, complejos de destrucción de β-catenina y otros componentes moduladores. WNT, un ligando secretado, facilita la transducción de señales autocrinas y paracrinas. Esta señalización se clasifica en canónica (dependiente de β-catenina) y no canónica (independiente de β-catenina), según la necesidad de β-catenina como efector clave en esta vía (4,5).

La vía de señalización canónica es importante en la inducción de la proliferación, diferenciación y maduración celular (6). Hasta ahora, se han identificado 19 ligandos WNT y más de 18 receptores/correceptores en mamíferos. Estas combinaciones de ligandos y receptores actúan en diversos contextos fisiológicos. Los ligandos WNT son glicoproteínas con modificaciones lipídicas, y su transporte extracelular depende de la palmitoilación, facilitada por la proteína O-palmitoiltransferasa llamada porcupine (PORCN) (7,8).

Por otra parte, TBK1 es una cinasa de serina/ treonina que desempeña funciones clave en la regulación de diversos procesos celulares, como la inmunidad innata, la producción de citocinas inflamatorias, la autofagia, el metabolismo mitocondrial y la supervivencia y proliferación celular. TBK1 puede activarse mediante PAMPs, DAMPs, citocinas inflamatorias y cinasas de naturaleza oncogénica (9).

La alta expresión de TBK1 se ha relacionado con un mal pronóstico en diversos tipos de cáncer. Funciona oncogénicamente, sirviendo para promover la tumorigénesis a través de mecanismos tanto intrínsecos como extrínsecos de la célula, por lo cual el papel de TBK1 en las células madre cancerosas y su relación con la quimiorresistencia son de interés para determinar si la inhibición farmacológica de TBK1 podría hacer a las células madre cancerosas más sensibles a la quimioterapia y, de esta manera, ayudar a prevenir la recaída de la enfermedad.

La inhibición de esta vía conduce a la amplificación del centrosoma, defectos mitóticos, detención del crecimiento y apoptosis. TBK1 tiene una conexión interesante entre la señalización de la inmunidad innata, la autofagia/mitofagia y el ciclo celular (9) . De acuerdo con revisiones bibliográficas, se sugiere que inhibir TBK1 podría ser una estrategia eficaz para reducir la viabilidad y la capacidad invasiva de las células cancerosas en distintos tipos de cáncer, incluidos el GB (9–12).

En este contexto, el objetivo de este estudio fue investigar el efecto potencial de BX795, un inhibidor de TBK1, y de IWP12, un inhibidor de WNT, sobre la modulación de la expresión de la proteína CDK2 en las líneas celulares de GB humano U87MG y A172.

1. Marco teórico

1.1 Glioblastoma

Los tumores cerebrales son una de las principales causas de mortalidad asociada al cáncer, con opciones de tratamiento limitadas. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), los tumores cerebrales primarios se pueden clasificar en más de 100 tipos, según parámetros fenotípicos y genotípicos (2,13). Aproximadamente el 80.9% de los tumores cerebrales malignos primarios son gliomas.

El GB es el tumor maligno primario del sistema nervioso central (SNC) más común y agresivo en hombres adultos, que se asocia a un mal pronóstico. Solo el 33% de los pacientes sobreviven un año y el 6.8% sobrevive más de 5 años. El GB es el más agresivo de los tumores cerebrales y se diagnostica predominantemente en adultos, con una edad media de 60 años, y su incidencia aumenta con la edad. El GB es un subtipo de los gliomas difusos, clasificado como grado IV según la clasificación de la OMS (2,14–16).

Los GB pueden afectar cualquier estructura neuroanatómica. En adultos, suelen presentarse con mayor frecuencia en los hemisferios cerebrales, mientras que en los niños se localizan en la fosa posterior. Su crecimiento infiltrativo es muy rápido. Desde el punto de vista histológico, están formados por células con gran diversidad morfológica, algunas de las cuales son bizarras, pleomórficas y multinucleadas. Estas células presentan una alta actividad mitótica, proliferación microvascular y una marcada hiperplasia endotelial (17).

El GB de isocitrato deshidrogenasa de tipo salvaje (IDHwt) es un tipo de glioma que infiltra de manera difusa las células y se caracteriza por la presencia de proliferación microvascular o necrosis. El único factor causal identificado es la exposición a altas dosis de radiación ionizante en cabeza y cuello. Como sugiere el término antiguo “GB multiforme”, la morfología de GB tiene una notable heterogeneidad inter e intratumoral. El pleomorfismo celular incluye células pequeñas, fusiformes, granulares, epitelioides y gigantes. Las estructuras secundarias de Scherer ilustran

las diferentes rutas que las células de glioma pueden tomar para invadir el cerebro: 1) los tractos de sustancia blanca, 2) la vasculatura, 3) el espacio leptomeníngeo y 4) el parénquima cerebral (18,19).

La denominación “multiforme” se debe a la variabilidad de los diferentes patrones y características citológicas. Se clasifican en dos subtipos estructuralmente semejantes: primarios (GB1) y secundarios (GB2).

Los GB1 son los más comunes, aparecen sin lesiones previas y son más frecuentes en personas de edad avanzada (con una media de 60 años). Su evolución es rápida, debido al crecimiento tumoral acelerado. Los GB2 constituyen aproximadamente el 10% de los GB, surgen como una progresión de astrocitomas de bajo grado (como el astrocitoma anaplásico o difuso) y afectan principalmente a pacientes jóvenes. Su evolución es más lenta y la supervivencia media es significativamente mayor, debido a la menor edad al momento del diagnóstico y al crecimiento más lento del tumor (20).

De acuerdo con la red de investigación de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA, por sus siglas en inglés), los glioblastomas se pueden clasificar en subtipos moleculares que son clásico, mesenquimal, proneural y neural, dependiendo de las firmas moleculares únicas. Estos subtipos se definen por las alteraciones génicas más relevantes, y están asociados con mutaciones particulares y cambios en el número de copias genéticas (21–23).

Los tumores clásicos se caracterizan por la amplificación del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), así como por la ausencia de mutaciones en TP53 y la deleción homocigota de CDKN2A. Los tumores mesenquimales tienen un peor pronóstico y se caracterizan por la expresión de la Neurofibromina 1 (NF1), una proteína que ayuda a controlar diversas funciones celulares, como la multiplicación y muerte de las células, y por la deleción del homólogo de la fosfatasa y tensina en el cromosoma 10 (PTEN). Por otro lado, los tumores proneurales tienen un mejor pronóstico y se caracterizan por la expresión de los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRA) (24). Los GB son altamente heterogéneos, con múltiples subtipos que forman diferentes regiones de un solo tumor. Además, cada subtipo

es funcional e inmunológicamente distinto, incluyendo las diferencias en células T y la composición de macrófagos/microglía. Por ejemplo, la pérdida de NF1 está asociada con el aumento de los TAMs. Los TAMs son los componentes celulares inmunitarios predominantes en los gliomas, que representan del 30% al 50% de la masa tumoral; como macrófagos presentes en los tejidos, la microglía actúa como la principal forma de vigilancia inmunitaria activa en el SNC (25).

Por otro lado, el microambiente del GB es un medio complejo que promueve la adaptabilidad transcriptómica de las células tumorales y la progresión de la enfermedad. El TME está formado por células tumorales, matriz extracelular, vasos sanguíneos, monocitos, macrófagos, mastocitos, microglía, neutrófilos, linfocitos T, neuronas no tumorales, astrocitos y oligodendrocitos, así como quimiocinas y citocinas que promueven la inflamación (26).

Las células del GB secretan quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento que promueven la infiltración de varias células: astrocitos, pericitos, células endoteliales, células progenitoras circulantes y algunas células inmunitarias, como microglía, macrófagos periféricos, MDSC, leucocitos y Treg en el tumor (27).

1.2 Tratamientos para el glioblastoma

El tratamiento para el GB recién diagnosticado exige un abordaje multidisciplinario. La terapia estándar incluye la máxima resección quirúrgica posible, seguida de radioterapia combinada con temozolomida (TMZ), un agente quimioterapéutico alquilante administrado por vía oral, y posteriormente quimioterapia adyuvante con TMZ (28). La resección completa del glioblastoma resulta difícil, ya que estos tumores suelen ser invasivos y frecuentemente se localizan en áreas críticas del cerebro, como las áreas que controlan el habla, la motricidad y los sentidos. Debido a su alta agresividad, la eliminación radical de la masa tumoral primaria no es curativa, y siempre quedan células tumorales infiltradas en el tejido cerebral circundante, lo que conduce a la progresión o recurrencia de la enfermedad. A pesar

de los avances en las técnicas de resección, el pronóstico para los pacientes con GB sigue siendo desfavorable, con una supervivencia media de 15 meses (29).

1.3 Ciclo y muerte celular

El ciclo celular y la apoptosis son procesos cruciales en la biología celular, que están encargados de regular las condiciones de crecimiento y la homeostasis de un organismo. Las alteraciones en estos mecanismos pueden resultar en condiciones patológicas, como la tumorigénesis (30).

Durante la fase G0, las células permanecen en un estado de quiescencia caracterizado por una detención reversible de la proliferación y una disminución de la actividad metabólica. Esta condición permite a las células afrontar y tolerar diferentes situaciones de estrés o estímulos potencialmente dañinos. Una vez que el daño ha sido reparado y las condiciones son favorables, las células quiescentes pueden reanudar la progresión del ciclo celular al ser estimuladas por factores de crecimiento específicos, como la CDK2 y E2F. Las células en división continua pasan por diferentes fases, como la fase de crecimiento G1, la fase S (síntesis del ADN), la fase G2 y la fase M (mitosis). Las fases G1, S y G2 constituyen la interfase, periodo durante el cual la célula desarrolla las condiciones necesarias para su posterior división. En G1 se produce el crecimiento celular y el aumento de orgánulos celulares; durante la fase S ocurre la duplicación del ADN, mientras que en G2 se llevan a cabo los procesos de organización y preparación de la célula para entrar en mitosis (30).

En contraste, la senescencia corresponde a un estado de paro permanente del ciclo celular, en el que las células mantienen una actividad metabólica elevada. Tanto la quiescencia como la senescencia pueden ser inducidas por diversos estímulos celulares y ambientales, entre ellos la radiación ionizante, el daño en el ADN y la cromatina, el estrés de replicación endógena, el estrés celular por especies reactivas de oxígeno (ROS), la privación de suero, y la inhibición por contacto. Sin

embargo, cuando el daño o las señales de estrés persisten durante periodos prolongados, se favorece el establecimiento de un estado de senescencia (30).

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada dependiente de energía y mediante el cual se eliminan de manera controlada las células que presentan alteraciones graves o han dejado de cumplir adecuadamente sus funciones. Este proceso se diferencia de la necrosis, en la cual la muerte celular ocurre de manera no programada y puede conducir a la degradación y eliminación de los componentes celulares (31,32). La apoptosis constituye un proceso fisiológico esencial para mantener la integridad y el equilibrio de los tejidos, ya que permite retirar células dañadas o disfuncionales. Posteriormente, las células eliminadas pueden ser reemplazadas mediante la actividad mitótica de una parte de las células que permanecen en el tejido. Por ello, el mantenimiento de la homeostasis tisular depende de un equilibrio adecuado entre la eliminación celular por apoptosis y la proliferación de células que se encuentran fuera del estado quiescente G0.

En el cáncer la desregulación de estos procesos causa que las células tumorales mantengan una proliferación descontrolada y eviten mecanismos de muerte celular programada. Entre los principales reguladores del ciclo celular se encuentran las CDK y otras proteínas cinasas, cuya actividad y expresión se relacionan con el grado de proliferación tumoral y pueden asociarse con un peor pronóstico en los pacientes. En el GB, la desregulación de estas proteínas favorece la progresión del ciclo celular y, en consecuencia, el crecimiento tumoral (33).

1.4 Cinasas dependientes de ciclinas y regulación del ciclo celular

Las CDK (cinasas dependientes de ciclina) son una familia de enzimas reguladoras, pertenecientes al grupo de las cinasas de serina/treonina, que desempeñan un papel fundamental en el control de la progresión del ciclo celular y en la regulación de la transcripción (34). La familia de proteínas CDK está compuesta por veinte quinasas (CDK1-20). De ellas, las CDK 1-6 y CDK14-18 participan principalmente

en la regulación del ciclo celular, mientras que las CDK 7-13 y CDK 19-20 se asocian con la regulación de la transcripción y el control de la expresión génica (3).

Las CDK regulan la progresión del ciclo celular a través de las fases G1 (crecimiento), S (síntesis de ADN), G2 (crecimiento) y M (mitosis), actuando en coordinación con sus ciclinas asociadas. En particular, las CDK 1-4, CDK6 y CDK11 participan en distintos procesos de la división celular, como la replicación del ADN, la progresión de la mitosis y la respuesta a señales del crecimiento celular (29). Entre ellas, CDK1 es la única CDK esencial para la progresión del ciclo celular en mamíferos, ya que promueve las transiciones G2/M y G1/S, además de contribuir al avance de la fase G1 (35).

La unión entre las ciclinas y CDK permite la activación coordinada de estas proteínas, las cuales fosforilan diferentes miembros de la familia de proteínas de bolsillo, como p107, p130 y la proteína del retinoblastoma (Rb) (31,36). La fosforilación de proteínas como Rb provoca su liberación de la cromatina, lo que favorece la activación de los factores de transcripción E2F y, consecuentemente, la expresión de genes involucrados en la replicación del ADN y en la transición de la célula hacia la fase S del ciclo celular (31,36).

Las CDK2, CDK4 y CDK6, en asociación con diferentes ciclinas, entre ellas A2, B1, B2, D1, D2, D3, E1 y E2, participan en la regulación de la progresión del ciclo celular y favorecen la proliferación celular. Esta actividad es regulada negativamente por los inhibidores de las CDK (CDKI), como p16, p21, p27 y p57. Estos inhibidores pueden competir con las ciclinas por su interacción con las CDK, modulando de esta manera la actividad de los complejos involucrados en el ciclo celular. Por ejemplo, el complejo CDK2-ciclina E favorece la progresión del ciclo celular, mientras que la interacción entre CDK4/6 y p16 contribuye a la inhibición de dicha progresión y al establecimiento de la detención del ciclo celular (30).

1.4.1 Función de CDK2

La CDK2 desempeña un papel fundamental en la regulación de la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular. Su actividad contribuye al control de procesos esenciales para la proliferación celular, entre ellos la fosforilación de la proteína Rb, el inicio de la replicación de ADN, los mecanismos de reparación del ADN y la progresión hasta la finalización de la fase S. Para ejercer estas funciones, CDK2 forma complejos activos principalmente con las ciclinas E y A, además de ser regulada mediante la fosforilación catalizada por diferentes cinasas. La sobreexpresión de estas ciclinas se ha descrito en procesos de oncogénesis, particularmente en cáncer de mama y cáncer de ovario (37).

Asimismo, la degradación mediante ubiquitinación de las ciclinas que se asocian con CDK2 constituye otro mecanismo que contribuye a limitar su actividad. De esta manera, el equilibrio entre los mecanismos que activan e inhiben CDK2 permite controlar de forma precisa la progresión de la célula desde G1 hacia la fase S (30).

CDK2 regula una serie de vías de señalización oncogénicas que controlan la proliferación de células cancerosas (38). Las alteraciones en la actividad de CDK2 pueden estar relacionadas con cambios en los niveles de expresión de sus proteínas asociadas o con modificaciones en los mecanismos que regulan su actividad después de la traducción (39).

1.5 Cinasas dependientes de ciclinas en el glioblastoma

La mayoría de las CDK presentan una mayor expresión en tejidos tumorales en comparación con los tejidos normales. En particular, la desregulación de CDK1 se ha relacionado con la tumorigénesis, mientras que la sobreexpresión de diversas CDK y de sus ciclinas asociadas favorece la proliferación celular anormal y la progresión del cáncer. Los GB albergan alteraciones genómicas que conducen a la activación constitutiva de CDK, lo que se relaciona con la proliferación tumoral (35). Por lo tanto, resulta relevante investigar el potencial de las CDK como una nueva opción de tratamiento para pacientes con GB.

Las moléculas inhibidoras de quinasas tradicionales abarcan fármacos competitivos de ATP reversibles, inhibidores estructurales reversibles e irreversibles, fármacos degradadores de CDK y anticuerpos inhibidores de la unión de CDK. Las CDK se expresan en altos niveles en los tejidos cancerosos y están relacionados con la supervivencia en diversos tipos de cáncer. Esto indica, que la inhibición de las CDK, podría ser una estrategia crucial para el tratamiento de cáncer (3).

En el caso de CDK2, se ha encontrado sobreexpresada en gliomas de mayor grado en comparación con gliomas de menor grado y se ha asociado con un peor pronóstico. Algunos estudios revelaron que la baja expresión de CDK2 se asocia con genes que regulan funciones celulares normales; en cambio, la alta expresión de CDK2 se asocia con genes que regulan células inmunes y cáncer. CDK2 también se asocia negativamente con células B, células T CD4+ y células T CD8+. Mientras que se relaciona positivamente con células endoteliales, macrófagos y células NK (40). En cáncer, se ha sugerido a CDK2 como una posible diana terapéutica (39).

1.6 Vía de señalización WNT

La vía de señalización WNT juega un papel importante a lo largo de la vida, ya que controla la recuperación de patrones tisulares durante la regeneración tisular, la deformación o el daño tisular, la proliferación celular, la diferenciación, la angiogénesis, la carcinogénesis, la metástasis y la resistencia a fármacos (41,42).

Esta vía de señalización no solo se limita a la regeneración y conservación de tejidos, sino que también es importante en otros órganos complejos más grandes. Las vías de señalización WNT se han vuelto un objetivo terapéutico relevante en muchos tipos de cáncer incluyendo el GB, ya que se han encontrado desreguladas.

En el GB, la desregulación de esta vía conduce a la progresión de este tipo de cáncer, debido al papel que tiene en la proliferación y pluripotencia (43). La hipermetilación de los receptores de WNT se encuentra en un 40 a 50% en los pacientes con GB (44).

La maquinaria molecular de la vía de señalización incluye Porcupine (PORCN), receptores Frizzled (FZD) y co-receptores LRP5/6, Deshevelled (Dvl), Tankirasas (TNKS), B- catenina y cAMP (45–47). La transducción de señales mediada por WNT/Frizzled integra diversas vías de señalización, que se han clasificado en dos grupos de procesos biológicos basados en la participación de la proteína β-Catenina. Estas dos vías en la señalización WNT se denominan “no canónicas” y “canónicas” (48,49).

La especificidad en la señalización WNT depende de varias proteínas que modulan ambas vías (50). En cáncer, las células desregulan el ciclo celular, incrementando la expresión del gen CCND1 o la estabilización de la ciclina D1, promovida por las vías de tirosina cinasas y PI3K/AKT, así como por la vía WNT/β-catenina. La activación de WNT/β-catenina en células cancerosas se asocia con concentraciones elevadas de ciclina D1, lo que impulsa una mayor proliferación celular (50). De acuerdo con revisiones bibliográficas, la actividad aumentada de la vía canónica de WNT es responsable de la resistencia del GB a la quimioterapia y la radioterapia, contribuyendo a su crecimiento, agresividad y alto potencial invasivo (51,52).

La señalización de WNT se inicia mediante la interacción de las proteínas WNT, que son glicoproteínas modificadas por lípidos, y los receptores Frizzled en la superficie celular. La enzima PORCN, una O-aciltransferasa localizada en el retículo endoplásmico, juega un papel esencial en este proceso, al añadir un grupo palmitoleilo a un residuo de serina en los ligandos WNT. Esta modificación es crucial para la activación y funcionalidad de la señalización WNT, ya que facilita la secreción y la capacidad de unión de las proteínas WNT a sus receptores (53). La inhibición farmacológica de PORCN muestra una alta especificidad hacia la vía de señalización de WNT, lo que resulta en una reducción significativa del crecimiento de tumores dependientes de WNT.

Los inhibidores de porcupine disminuyen particularmente la capacidad de las células para secretar ligandos WNT. En los últimos años, se han desarrollado diversas estrategias terapéuticas dirigidas a interferir con la vía de señalización

WNT, con el objetivo de retener el complejo de destrucción de β-catenina, evitando así su acumulación y, en consecuencia, el crecimiento celular anormal (54).

La primera categoría de agentes basados en la señalización canónica de WNT elimina principalmente la actividad y secreción normales de los ligandos WNT. Entre estos destacan los inhibidores de porcupine, ya que desactivan la actividad y secreción normales de los ligandos WNT al inhibir la palmitoilación mediada por la O-aciltransferasa que se encuentra unida en la membrana, en residuos de serina específicos. Existen los inhibidores de la producción de WNT (IWP) que son la primera clase de inhibidores de PORCN con concentraciones inhibitorias medias máximas (IC50) variables, incluyendo IWP-2, IWP-3, IWP-4, IWP-12, IWP L6, IWP-2-V2 e IWP-01, que han mostrado distintos grados de eficacia en distintos tipos de cáncer (55). Esto destaca el potencial terapéutico de los inhibidores de PORCN como una estrategia prometedora en el tratamiento del cáncer.

1.7 Vía de señalización TBK1

TBK1 es una proteína cinasa de serina/treonina codificada por el gen tbk1; es un miembro de la familia de las cinasas IKB(IKK). La unión entre IKKε (IkB quinasa ε) es un elemento clave de la señalización del factor nuclear kB (NF-kB), y TBK1 promueve la activación de la vía de señalización de NF-kB y el factor regulador del interferón (IRF). Este enlace estimula la autofagia y el proceso inflamatorio mediante la activación de factores clave involucrados en el desarrollo del cáncer, como la proteína cinasa B (Akt) y el factor TRAF2, ligado al receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R) (56–58).

Además, inhibe supresores tumorales, como el de la cilindromatosis (CYLD) y Forkhead box O3a (FoxO3a). Se ha observado que TBK1 muestra una mayor expresión en tumores sólidos; en este contexto, TBK1 promueve la supervivencia de las células cancerosas y el crecimiento tumoral al alterar la vía apoptótica e induce la producción de citocinas proinflamatorias mediante la activación de la vía NF-kB (59–61).

TBK1 puede ser activado por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), citocinas inflamatorias y quinasas oncogénicas (9). Estudios recientes han relacionado TBK1 con procesos de inflamación/inmunidad, metabolismo y proliferación inducidos por patógenos involucrados en muchas enfermedades humanas, incluidas enfermedades inflamatorias, enfermedades neurodegenerativas y algunos tipos de cáncer (62,63). En el caso de GB, la desregulación de esta vía apoptótica contribuye al crecimiento descontrolado del cáncer (60).

Se han descubierto múltiples inhibidores dirigidos a TBK1 que han mostrado funciones potenciales en distintas enfermedades asociadas con la desregulación de esta cinasa. En el cáncer, estos compuestos han despertado un gran interés debido a su capacidad para modular vías de señalización implicadas en la proliferación, supervivencia y progresión tumoral. En particular, el inhibidor BX795 destaca como uno de los inhibidores más prometedores. Inicialmente fue identificado como un inhibidor de la proteína quinasa dependiente de 3-fosfoinosítido (PDK1); sin embargo, posteriormente se demostró que su principal mecanismo de acción consiste en la inhibición de TBK1 e IKKε, mostrando además propiedades antinflamatorias (64).

Estudios recientes siguieren que BX795 posee actividad antitumoral, en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, incluyendo el adenocarcinoma ductal pancreático primario y melanoma, donde su acción se ha asociado con el bloqueo de la señalización mediada por TBK1 e inducción del arresto de la fase mitótica y la muerte de las células tumorales. En células de carcinoma escamoso oral, este compuesto produjo una acumulación de células en la fase mitótica, acompañada de inhibición de las vías AKT y NF-κB y de la inducción de apoptosis. Los autores propusieron que el arresto en fase M podría contribuir al efecto antiproliferativo de BX795 y señalaron que este fenómeno no se correlacionó directamente con los niveles de expresión de TBK1, por lo que podría involucrar efectos adicionales derivados de la actividad farmacológica de BX79 (64–66).

2. Planteamiento del problema

El GB es el tumor maligno primario del SNC más común y agresivo en adultos. Generalmente incurable, corresponde al grado más alto de astrocitomas, grado IV, con una tasa de supervivencia de 15 meses. En México, se detectan anualmente un promedio de 3,500 nuevos casos de cáncer cerebral, de los cuales sólo el 33% de los pacientes sobrevive al año tras el diagnóstico. El tratamiento estándar consiste en cirugía, radioterapia y quimioterapia con TMZ. A pesar de esto, ninguna intervención terapéutica prolonga la supervivencia de los pacientes, por lo que se necesitan nuevas opciones terapéuticas.

De acuerdo con la literatura científica, se ha observado que los tratamientos estándar en conjunto con el bloqueo de vías de señalización específicas involucradas en el desarrollo del cáncer, podrían ser un tratamiento eficaz para prolongar la supervivencia de los pacientes. En los mecanismos moleculares involucrados con la patogénesis de GB, se ha observado que la desregulación de mecanismos involucrados en la respuesta inmunológica es de gran importancia en el desarrollo de la enfermedad. La sobre activación del factor de transcripción NF-kB es uno de los principales factores que se vinculan con la inflamación y el desarrollo del cáncer. Asimismo, participa en mecanismos relacionados con el aumento de la proliferación celular y la progresión del ciclo celular. Esta progresión es regulada por proteínas como las ciclinas y las CDK, entre las que se encuentra CDK2, la cual participa principalmente en la transición de la fase G1 a S y favorece la progresión del ciclo celular y la proliferación celular.

En conjunto, la desregulación de las vías WNT y TBK1 podría modificar mecanismos relacionados con la progresión del ciclo celular y, potencialmente, con la expresión de proteínas reguladoras como CDK2. Sin embargo, la relación entre el bloqueo farmacológico de estas vías y los cambios en la expresión de CDK2 en GB particularmente en las líneas U87MG y A172, aún requiere ser investigada de manera específica.

Por lo tanto, la interacción entre las vías WNT y TBK1 podrían ofrecer nuevas oportunidades para intervenciones terapéuticas que regulen la expresión de CDK2 en el GB.

Por lo anteriormente planteado, surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Qué efecto tiene el bloqueo farmacológico en las vías de señalización WNT y TBK1 sobre la expresión de la proteína reguladora de ciclo celular CDK2 en células de glioblastoma humano?

3. Justificación

Entre los tumores del SNC, el GB es el glioma más común y maligno, representando el 49.1% de los tumores cerebrales (2). El tratamiento estándar cosiste en cirugía, radioterapia y quimioterapia con TMZ. A pesar de estos enfoques terapéuticos, el pronóstico continúa siendo desfavorable debido a la alta tasa de recurrencia postoperatoria y una baja supervivencia global de 15 meses y una tasa de supervivencia a cinco años cercana al 6.8% (13,17,67).

El análisis de las alteraciones genéticas y moleculares asociadas al GB pueden revelar los procesos biológicos que promueven el crecimiento tumoral, la invasión y la resistencia al tratamiento. Además, esto ayuda a identificar subtipos tumorales, identificación de vías de señalización implicadas e identificar posibles dianas terapéuticas.

En el GB se cree que el aumento en las vías de señalización como WNT, TGF-b, VEGF, EGFR, CDKN2A, NF-kB y la vía PI3K/ AKT/ mTOR son vías importantes en la patogénesis de la enfermedad, contribuyen al comportamiento agresivo del tumor y la resistencia terapéutica(68). WNT participa en procesos celulares fundamentales como la regulación del ciclo celular, cáncer e inflamación y cuya desregulación se ha asociado con una menor supervivencia en pacientes con glioblastoma (69).

En los últimos años, se han desarrollado diversas estrategias que bloquean la vía de señalización WNT, centrándose en la retención del complejo de destrucción de β-catenina, disminuyendo con ello el crecimiento anómalo. Clínicamente, los inhibidores de Porcupine que bloquean la señalización de WNT han demostrado potencial en el tratamiento de diversos tipos de cáncer como en el cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, carcinoma hepatocelular, cáncer de cabeza y cuello (54).

Por otra parte, la activación de TBK1 favorece la supervivencia y proliferación de células tumorales, contribuyendo a un microambiente inflamatorio y a su vez en la progresión del cáncer. Diversos estudios han demostrado que la inhibición farmacológica de TBK1 mediante BX795 representa una estrategia terapéutica

potencial en distintos tipos de cáncer, incluyendo el adenocarcinoma ductal pancreático primario y el melanoma (70,71).

Por lo tanto, es necesario conocer los efectos que el bloqueo farmacológico con los inhibidores IWP12 y BX795 puedan tener sobre las vías de señalización WNT y TBK1 relacionadas con la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular. Debido a esto, es importante estudiar estas alteraciones para comprender mejor los mecanismos moleculares asociados con el desarrollo y progresión del GB, para mejorar tanto las terapias como las estrategias para manejo clínico.

4. Hipótesis

Hipótesis alterna:

1. El bloqueo farmacológico de las vías de señalización WNT y TBK1 está relacionado con una reducción en la actividad de la proteína reguladora del ciclo celular CDK2 en células de glioblastoma humano.

Hipótesis nula:

1. El bloqueo farmacológico de las vías de señalización WNT y TBK1 no está relacionado con una reducción en la actividad de la proteína reguladora del ciclo celular CDK2 en células de glioblastoma humano.

5. Objetivos

General:

Analizar el efecto del bloqueo farmacológico de las vías de señalización WNT y TBK1 sobre la expresión de la proteína reguladora del ciclo celular CDK2 en las líneas celulares de glioblastoma humano U87MG y A172.

Específicos:

- Realizar el bloqueo farmacológico de las rutas de señalización WNT y TBK1 a diferentes tiempos y concentraciones con los inhibidores IWP12 y BX-795, en las líneas celulares de glioblastoma humano U87MG y A172.
- Analizar la expresión de la proteína reguladora del ciclo celular CDK2 en su forma activa, antes y después del bloqueo farmacológico de las rutas de señalización WNT y TBK1, a diferentes tiempos y concentraciones, por medio de la técnica de western blot.
- Comparar e integrar los resultados obtenidos en el presente estudio con los reportados en el trabajo previo del grupo de investigación sobre bloqueo farmacológico de las vías WNT y TBK1 dependiente de NF-κB (72), con el fin de fortalecer la comprensión de los mecanismos moleculares regulados por las vías de señalización WNT y TBK1 en células de glioblastoma humano.

6. Marco metodológico

a. Diseño de la investigación

Tipo de estudio: Experimental, *in vitro*, de enfoque cuantitativo.

Universo: Células de glioblastoma humano derivadas de las líneas celulares A172 y U87MG.

Tamaño de la muestra: Tres réplicas biológicas independientes por cada condición experimental.

Método de muestreo: No probabilístico, aleatorio, a conveniencia.

b. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios de inclusión:

Cultivos de células de glioblastoma humano de las líneas A172 y U87MG, con una confluencia mayor al 85% y sin contaminantes.

Criterios de exclusión:

Cultivos contaminados.

Cultivos con una confluencia inferior al 85%.

Criterios de eliminación:

Cultivos contaminados durante el experimento.

Muestras con proteína insuficiente para los métodos experimentales necesarios.

Fallas técnicas durante el procesamiento o análisis.

Muestras con degradación proteica o resultados no interpretables.

6.1 Cultivo celular

Las células de glioblastoma humano U87MG y A172 se cultivaron en placas para cultivo de células adherentes de 75 cm². Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada, con un 5% de CO_2, utilizando medio de cultivo DMEM (D9785-10L, Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de penicilina-estreptomicina.

El tratamiento celular se llevó a cabo en placas de cultivo de 6 pozos, con una densidad inicial de $2.5x10^5$ células por pozo. Posteriormente, las células fueron tratadas con el inhibidor BX795 (SML0694, Sigma), el cuál es un inhibidor selectivo de la ruta de señalización TBK1 e IKKε**.** Adicionalmente, bloquea la fosforilación de S6K1, Akt, PKCδ y GSK3β, además de modular la autofagia. También se utilizó el inhibidor IWP12 (22729, Cayman), que es un potente inhibidor de la proteína puercoespín (PORCN), e inhibe la señalización WNT autónoma de las células. El tratamiento celular se realizó en concentraciones de 0.1, 1 y 10 μM, disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO) (20 mg/10 μM), durante periodos de 24, 48 y 72 horas.

6.2 Extracción de proteínas

Al concluir el tiempo de tratamiento celular, se inició con la extracción total de proteínas a partir de los cultivos celulares. Para ello, se utilizaron 60 μL de buffer de lisis compuesto por 25 mM de Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1% de NP-40 y 5% de glicerol.

Se utilizaron los siguientes inhibidores de proteasas por cada mL de buffer de lisis:

• 5 μL/mL de leupeptina (5 mg/mL).

• 5 μL/mL de aproptinina (10 mg/mL).

• 20 μL/mL de PMSF (10 mg/mL).

• 20 μL de Na_3VO_4 (100 mM).

• 100 µL/mL de NaF (500 mM).

Las células adherentes fueron desprendidas con 500 µL de tripsina-EDTA al 0.25% y luego recolectadas en tubos de 0.6 mL. Las muestras se incubaron en hielo durante 45 min, con agitación en vortex cada 15 min. Posteriormente, se centrifugaron a 13,000 rpm durante 25 min, a 4 ºC, recuperando finalmente el sobrenadante y colocándolo en un tubo para microcentrífuga de 0.6 mL.

Para la cuantificación de proteínas, se utilizó el método de Bradford. Para la curva estándar, se empleó albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 2 mg/mL y se prepararon diluciones en concentraciones de: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mg/mL.

En una placa de 96 pozos, se adicionaron 5 µL de los estándares de albúmina por duplicado, reservando los dos primeros pozos como blanco. Se añadió 1µL de muestra por duplicado y se utilizó buffer de lisis como blanco.

Finalmente, se añadieron 200 µL de la mezcla de Bradford. La absorbancia se midió a 590 nm utilizando un espectrofotómetro (Awareness Technology, StatFax 4200). Después de obtener los resultados de la concentración de proteínas de cada muestra, estas se ajustaron a una concentración de 4 µg/µL. Se adicionó buffer de carga SLB 1X, para completar un volumen final de 100 µL. Las muestras se calentaron a 95°C durante 5 minutos y se congelaron a -20°C hasta su uso.

6.3 Western blot

Se realizaron ensayos de Western blot para determinar los cambios en la activación de la proteína reguladora del ciclo celular (CDK2, evaluada mediante la detección de su forma activa fosforilada en el residuo de treonina 160 (Thr160)). La técnica de Western blot sirve para detectar una proteína específica en una muestra de células o tejido. El primer paso del proceso consiste en la separación de las proteínas con un gel de corrida al 10% y un gel de apilamiento al 4%, por electroforesis, los cuales se prepararon como lo indican la tabla 1 y 2, respectivamente:

Tabla 1. Preparación del gel de corrida (running gel) 10%

	10%
Agua destilada	6.97 mL
Tris 1.5M pH 8.8	4.25 mL
SDS 10%	170 µL
Acrilamida/Bis 30%, 2.67	5.61 mL
APS 10%	170 µL
TEMED	34 µL
Volumen total	17 mL

Tabla 2. Preparación del gel de apilamiento (stacking gel) 4%

	4%
Agua destilada	6.1 mL
Tris 0.5 M pH 6.8	2.5 mL
SDS 10%	100 µL
Acrilamida/Bis 30%, 2.67	1.33 mL
APS 10%	100 µL
TEMED	25 µL
Volumen total	10 mL

Se prepararon los geles al porcentaje deseado (de acuerdo con el peso molecular de las proteínas de interés), limpiando previamente los platos con etanol al 70%.
Se preparó el buffer de corrida 5X, como a continuación se describe:

- 15 g de Tris base
- 72 g de Glicina

Se disolvió en 700 mL de agua destilada y se completó a 1 L; se filtró con gasa doble. Se almacenó a temperatura ambiente. Para la preparación del buffer de corrida 1X, se empleó la fórmula indicada en la tabla 3.

Tabla 3. Preparación de buffer de corrida 1X

Running buffer 5X	200 mL
SDS 10%	10 mL
Agua destilada	790 mL

Una vez ensamblada la cámara de electroforesis, se llenó con buffer de corrida 1X y se removieron los peines cuidadosamente, para no dañar los pozos. En el primer pozo, se agregaron 1.5 µL del marcador de peso molecular. En los pozos subsecuentes, se cargaron 35 µg de proteína por muestra (previamente calentadas y centrifugadas). Se corrió a 100V, hasta que el frente de corrida llegó al fondo del gel.

1. Transferencia de proteínas en membrana PVDF

Cuando la migración de las proteínas terminó, se desensamblaron los geles, se cortó el gel de apilamiento y se remojó el gel en buffer de transferencia.
El buffer de transferencia 1X contiene 25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina, y 20% metanol absoluto.

Por cada gel se preparó:

- **1 membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF)**: es un fluoropolímero termoplástico altamente inerte químicamente. Se emplea en condiciones que requieren mucha pureza, fortaleza y elevada resistencia a ácidos, bases y disolventes. Esta membrana se utiliza por su capacidad para adsorber polipéptidos de forma inespecífica (cortar del tamaño del gel para economizar) y se corta una pequeña pestaña en la esquina derecha.
- **4 papeles Whatman gruesos,** los cuales son filtros estándares de referencia mundial por su calidad y fiabilidad para la filtración en técnicas de laboratorio.

Se hidrató la membrana en metanol absoluto por 30 segundos y después se enjuagó con buffer de transferencia 1 o 2 minutos. Se empaparon las esponjas y los papeles Whatman con buffer de transferencia. Se preparó el sándwich de transferencia como se indica a continuación:

• Esponja/2 papeles Whatman/gel (con el marcador de peso molecular en el lado derecho) /membrana (con la esquina cortada en el mismo lado del marcador de peso molecular) /esponja.
• En cada paso se eliminaron las burbujas, rodando una pipeta.

En la transferencia en cámara húmeda se llenó e insertó el casete con cuidado, para no crear burbujas. Se añadió un poco más de buffer hasta la marca de la cámara y se transfirió a 60mA (constante) toda la noche a 4°C. Al terminar el tiempo de transferencia se sacó la membrana y se enjuagó en TBS-Tween 20.

2. Incubación de las membranas con los anticuerpos

Se bloqueó la membrana 1 h a temperatura ambiente con albumina bovina al 1% (BSA al 1%) en TBS-T (1 o 5 g de albumina bovina por cada 100 mL de TBS-T).
Se incubó con el anticuerpo primario anti-CDK2 (Thr160) 1:1000 (Cell Signaling, 2546) previamente diluido en BSA 1% toda la noche a 4°C en agitación. Se lavó 3 veces 5 min con TBS-T. Se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo biotinilado a una dilución de 1:1000 (Cell Signaling, 2561) durante 1hr a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó la membrana con estreptavidina durante 1h a temperatura ambiente y se realizaron tres lavados de 5 min con TBS. Finalmente, se lavó 3 veces 5 min con TBS-T y se desarrolló la membrana con diaminobencidina.
Para detección de β-actina, utilizada como control de carga, se empleó el anticuerpo anti-β-actina (BioLegend, 643801) a una dilución de 1:1000. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 5 min con TBS-T y se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón 1:1000 (Sigma, A2554) durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con TBS-T durante 5 min y se desarrolló la membrana mediante diaminobencidina.

Variables del estudio

Variables dependientes: Expresión de la proteína CDK2 en su forma activa.

Variables independientes: Bloqueo farmacológico con IWP12 y BX795, tiempo de exposición.

7. **Operacionalización de las variables**

Variable	**Definición conceptual**	**Definición operativa**	**Tipo de variable**	**Escala**	**Análisis estadístico**
DEPENDIENTES					
CDK2 Activa	Cantidad de CDK2 en su forma activa, implicada en la progresión de la fase S del ciclo celular.	Detección de la proteína CDK2, en su forma activa, fosforilada en treonina 160, a través de densitometría de la banda detectada mediante western blot.	Cuantitativa continua.	Unidades arbitrarias.	ANOVA de dos vías
INDPENDIENTES					
Bloqueo farmacológico con IWP12 y BX795.	Bloqueo farmacológico con los inhibidores en el cultivo células de glioblastoma humano.	Adición de los inhibidores IWP12 y BX795 a concentraciones de 0.1, 1 y 10 μM, directamente en el medio de cultivo celular.	Cuantitativa.	μmol/L.	ANOVA

Tiempo de exposición. Grupo de 24 h Grupo de 48 h Grupo de 72 h	Intervalo de tiempo durante el cual se mantiene la interacción con un agente hasta que se interrumpe.	Cantidad de tiempo que se mantendrán las células en el medio de cultivo con los inhibidores farmacológicos. Grupos de 24, 48 y 72 horas.	Cuantitativa.	Horas.	ANOVA

8. Análisis estadístico

Para la determinación de la expresión proteica por Western Blot, se realizaron análisis estadísticos con la prueba ANOVA de dos vías para datos paramétricos. Se consideraron como factores el tiempo de tratamiento (24, 48 y 72 h) y la concentración de los inhibidores (0.1, 1 y 10 μM), evaluando los efectos principales de cada factor y la interacción entre ambos. Para las comparaciones múltiples entre los grupos tratados y el grupo control se empleó la prueba post-hoc de Dunnett. El valor que se consideró estadísticamente significativo para cada prueba fue de $p< 0.05$.

9. Implicaciones Bioéticas

El estudio, al ser un seguimiento de un proyecto ya establecido, se sometió a la aprobación del Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México, con número de registro **CONBIOETICA-15-CEI-002-20210531** (Anexo 1), correspondiente al proyecto titulado: *"MODIFICACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN GLIOBLASTOMA HUMANO DEPENDIENTE DE LA ACTIVIDAD DE NF-κB A TRAVÉS DEL BLOQUEO FARMACOLÓGICO DE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN WNT y TBK1"*. Dicho proyecto fue sometido para su evaluación y aprobación por el Comité de Ética en Investigación y obtuvo el dictamen de aprobación en MARZO del 2023.

El estudio se realizó conforme a lo establecido en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación y en la Norma Oficial Mexicana NOM-097-ECOL-SSA1-2002, para el manejo de residuos biológicos.

10. Resultados

a. Carta de envío de articulo

Outlook

[rcfb] Acuse de recibo de envío

From Dr. Bryan A. Espinosa Rodríguez via Sitio de revista RCFB <revistas@uanl.mx>
Date Wed 9/23/2026 11:18 AM
To Irazú Contreras García <icontrerasg@uaemex.mx>

Irazu Contreras:

Gracias por enviar el manuscrito, "Modificación de la proteína reguladora de ciclo celular CDK2 en células de glioblastoma humano mediante el bloqueo farmacológico de las rutas de señalización WNT y TBK1" a Revista de Ciencias Farmaceúticas y Biomedicina. Con nuestro sistema de gestión de revistas en línea, podrá iniciar sesión en el sitio web de la revista y hacer un seguimiento de su progreso a través del proceso editorial:

URL del manuscrito: https://rcfb.uanl.mx/index.php/rcfb/authorDashboard/submission/416
Nombre de usuario/a: icontrerasg

En caso de dudas, contacte conmigo. Gracias por elegir esta revista para publicar su trabajo.

Dr. Bryan A. Espinosa Rodríguez
_____ Revista de Ciencias Farmaceúticas y Biomedicina Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas. Ave. Universidad s/n, San Nicolás de los Garza, NL. Mex. Tel. +52 (81) 8329-4000 Ext. 6230 http://rcfb.uanl.mx/

b. Resumen del artículo

Modificación de la proteína reguladora de ciclo celular CDK2 en células de glioblastoma humano mediante el bloqueo farmacológico de las rutas de señalización WNT y TBK1

Amanda Citlalli Hernández Gutiérrez1, José Antonio Estrada1, Luis Ángel Zapi-Colín1, Irazú Contreras1*

* Autor de correspondencia: Irazú Contreras, Ph.D. icontrerasg@uaemex.mx

El glioblastoma (GB) es la neoplasia maligna primaria del sistema nervioso central más agresiva y frecuente en adultos, caracterizada por su elevada capacidad invasiva y resistencia a los tratamientos convencionales, por esta razón, es fundamental investigar los mecanismos moleculares implicados en su desarrollo; entre ellos, las vías WNT y TANK-binding kinase 1 (TBK1) desempeñan un papel importante en la patogénesis del GB. El objetivo del presente estudio fue determinar los efectos del bloqueo farmacológico de WNT y TBK1, mediante los inhibidores IWP-12 y BX795, respectivamente, sobre la expresión de la proteína reguladora de ciclo celular CDK2 en las líneas celulares de glioblastoma humano U87MG y A172.

Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de IWP-12 y BX795 durante 24, 48 y 72 h. La expresión de CDK2 se evaluó mediante Western blot y análisis densitométrico. El tratamiento con BX795 mostró tendencias hacia una menor expresión de CDK2 con 1 y 10 μM en A172 a las 72 h y en U87MG principalmente a las 48 y 72 h. IWP-12 mostró tendencias hacia una menor expresión de CDK2 en U87MG, mientras que en A172 produjo un aumento significativo a 10 μM a las 48 h y una tendencia a la disminución a las 72 h.

En conjunto, estos hallazgos indican que la inhibición farmacológica de las vías WNT y TBK1 podrían modular la expresión de CDK2, favoreciendo una menor progresión del ciclo celular y respaldando el potencial de ambas vías de señalización como blancos terapéuticos para limitar el crecimiento tumoral.

Palabras clave: Glioblastoma, CDK2, WNT, TBK1, ciclo celular.

11. Discusión

Efectos del bloqueo farmacológico de WNT y TBK1 sobre la expresión de la proteína de ciclo celular CDK2

El glioblastoma es un tumor altamente agresivo en el que la desregulación del ciclo celular juega un papel central en su progresión. En particular, las quinasas dependientes de ciclina, como CDK2, han sido ampliamente implicadas en la transición G1/S, favoreciendo la proliferación celular y la progresión tumoral.

Si bien la expresión de CDK2 se mantiene relativamente estable durante el ciclo celular normal, una estimulación anormal prolongada puede provocar su desregulación, lo que da como resultado una alteración del ciclo celular y proliferación incontrolada, hasta llegar a la formación de tumores. De acuerdo con esto, diversos estudios recientes han reportado que CDK2 se encuentra sobreexpresada en gliomas y se asocia con peor pronóstico, lo que refuerza su papel como blanco terapéutico relevante en la biología del GB (73).

De acuerdo con los resultados obtenidos mediante los ensayos de western blot y el análisis densitométrico, se demostró que la inhibición farmacológica con IWP-12 y BX795 en las líneas celulares de glioblastoma U87MG y A172, produce reducción de la activación de la proteína de ciclo celular CDK2.

IWP-12 no generó un gran cambio en comparación con BX795. Sin embargo, se observó una disminución significativa en la expresión de la proteína CDK2. Actualmente están en prueba otros inhibidores más ponentes para la vía WNT para distintos tipos de cáncer que han mostrado buenos resultados (73). Los efectos directos de IWP-12 no se han probado en modelos in vivo de glioblastoma, lo que requiere medir su seguridad y citotoxicidad frente a tejidos sanos.

Los resultados revelan una dependencia de la dosis y el tiempo de estimulación en la reducción de la expresión de la proteína de ciclo celular CDK2, los cambios más significativos se vieron con 1 y 10 μM de BX795 a las 48 horas en U87MG mientras que en A172 se observó una disminución al mayor tiempo de estimulación de 72 horas. Para IWP-12 la disminución de esta proteína se vio a las 24 horas con 1 y 10

μM para U87MG mientras que para A172 fue a las 72 horas con las mismas concentraciones, y con la concentración más alta de 10 μM a las 24 horas.

Los efectos del inhibidor BX795 han sido evaluados previamente en dos líneas celulares y células primarias de GB donde redujo la viabilidad celular, mostró efectos antiproliferativos y antiinflamatorios, y un aumento de la expresión de proteínas pro-apoptóticas (74). Por otro lado, algunos inhibidores de la vía de señalización WNT han avanzado hasta ensayos clínicos de fase I/II para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, en combinación con otros fármacos, lo que respalda su potencial como estrategia terapéutica (54).

En este sentido, la disminución de la expresión de CDK2 tras el bloqueo de WNT/β-catenina y TBK1 sugiere que ambas contribuyen al mantenimiento de la proliferación celular. Su inhibición reduce la expresión de reguladores clave del ciclo celular, lo que podría favorecer un arresto en la transición G1/S y limitar el crecimiento de las células tumorales. En conjunto, estos datos indican que con dosis de 1 y 10 μM de BX795 promueve cambios en la proteína de ciclo celular CDK2 en células de glioblastoma humano U87MG.

12. Conclusiones

En conjunto, nuestros resultados muestran que los inhibidores IWP-12 y BX-795 podrían modular la expresión de la proteína reguladora del ciclo celular CDK2 mediante el bloqueo de las vías de señalización WNT y TBK1 en las líneas celulares U87MG y A172 de glioblastoma. La disminución observada en la expresión de CDK2 en su forma activa sugiere una posible reducción en la progresión del ciclo celular.

A partir de estos resultados, se plantea la necesidad de realizar estudios adicionales que permitan determinar si los cambios observados en CDK2 fosforilada se acompañan de modificaciones en la proliferación, distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular y apoptosis. También, sería relevante evaluar la expresión de CDK2 total y de otras proteínas reguladoras del ciclo celular, como CDK1, ciclinas y proteínas inhibidoras de CDK, con el propósito de profundizar en los mecanismos asociados con la inhibición de las vías WNT y TBK1.

Como líneas de investigación futuras, también podría estudiarse el efecto combinado de IWP-12 y BX-795, así como su interacción con los tratamientos utilizados convencionalmente en el glioblastoma, particularmente TMZ y radioterapia. Del mismo modo, evaluar estos tratamientos en otros modelos celulares y en modelos preclínicos, con el fin de determinar la reproducibilidad de los efectos observados y establecer su posible relevancia biológica.

El uso de inhibidores dirigidos contra estas vías de señalización, que presentan alteraciones en el GB, podría representar una estrategia terapéutica prometedora como tratamiento adyuvante al manejo convencional del glioblastoma.

13. Referencias Bibliográficas

1. Costantini S, Di Gennaro E, Fanelli G, Bagnara P, Argenziano C, Maccanico C, et al. Glioblastoma metabolomics: uncovering biomarkers for diagnosis, prognosis and targeted therapy. J Exp Clin Cancer Res. 2025 Dec 1;44(1). doi:10.1186/S13046-025-03497-2

2. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary. Neuro Oncol. 2021 Aug 1;23(8):1231–51. doi:10.1093/neuonc/noab106

3. Juric V, Murphy B. Cyclin-dependent kinase inhibitors in brain cancer: current state and future directions. Cancer Drug Resist. 2020 Mar;3(1):48–62. doi:10.20517/CDR.2019.105

4. Yu F, Yu C, Li F, Zuo Y, Wang Y, Yao L, et al. Wnt/β-catenin signaling in cancers and targeted therapies. Signal Transduct Target Ther. 2021 Dec 1;6(1):307. doi:10.1038/S41392-021-00701-5

5. Jackstadt R, Hodder MC, Sansom OJ. WNT and β-Catenin in Cancer: Genes and Therapy. Annu Rev Cancer Biol. 2020 Mar 4;4(Volume 4, 2020):177–96. doi:10.1146/ANNUREV-CANCERBIO-030419-033628/CITE/REFWORKS

6. Qin K, Yu M, Fan J, Wang H, Zhao P, Zhao G, et al. Canonical and noncanonical Wnt signaling: Multilayered mediators, signaling mechanisms and major signaling crosstalk. Genes Dis. 2023 Mar 1;11(1):103. doi:10.1016/J.GENDIS.2023.01.030

7. Muzny DM, Bainbridge MN, Chang K, Dinh HH, Drummond JA, Fowler G, et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature. 2012 Jul 19;487(7407):330. doi:10.1038/NATURE11252

8. Giles RH, Van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 2003 Jun 5;1653(1):1–24. doi:10.1016/S0304-419X(03)00005-2

9. Runde AP, Mack R, Peter PB, Zhang J. The role of TBK1 in cancer pathogenesis and anticancer immunity. J Exp Clin Cancer Res. 2022 Apr 1;41(1):135. doi:10.1186/S13046-022-02352-Y.

10. Yang S, Imamura Y, Jenkins RW, Canadas I, Kitajima S, Aref A, et al. Autophagy Inhibition Dysregulates TBK1 Signaling and Promotes Pancreatic Inflammation. Cancer Immunol Res. 2016 Jun 1;4(6):520–30. doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0235

11. Hasan M, Gonugunta VK, Dobbs N, Ali A, Palchik G, Calvaruso MA, et al. Chronic innate immune activation of TBK1 suppresses mTORC1 activity and dysregulates cellular metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Jan 24;114(4):746–51. doi:10.1073/PNAS.1611113114

12. Vargas JNS, Wang C, Bunker E, Hao L, Maric D, Schiavo G, et al. Spatiotemporal Control of ULK1 Activation by NDP52 and TBK1 during Selective Autophagy. Mol Cell. 2019 Apr 18;74(2):347. doi:10.1016/J.MOLCEL.2019.02.010

13. Ostrom QT, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018. Neuro Oncol. 2021 Oct 5;23(Supplement_3):iii1–105. doi:10.1093/neuonc/noab200

14. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2006-2010. Neuro Oncol. 2013 Nov;15(Suppl 2):ii1. doi:10.1093/NEUONC/NOT151

15. Ah-Pine F, Khettab M, Bedoui Y, Slama Y, Daniel M, Doray B, et al. On the origin and development of glioblastoma: multifaceted role of perivascular

mesenchymal stromal cells. Acta Neuropathologica Communications. BioMed Central Ltd; 2023 Jun. doi:10.1186/s40478-023-01605-x

16. Castañeda CA, Casavilca S, Orrego E, García-Corrochano P, Deza P, Heinike H, et al. [Glioblastoma: Molecular analysis and its clinical implications]. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2015 Apr;32(2):316–25. doi:10.17843/rpmesp.2015.322.1627

17. Liu W, Zhang S, Zhang L, Cui Q, Wang J, Gui T, et al. A prognostic analysis of pediatrics central nervous system small cell tumors: evaluation of EGFR family gene amplification and overexpression. Diagn Pathol. 2014 Jul 1;9(1):132. doi:10.1186/1746-1596-9-132

18. Figarella-Branger D, Colin C, Coulibaly B, Quilichini B, Maues De Paula A, Fernandez C, et al. Classification histologique et moléculaire des gliomes. Rev Neurol (Paris). 2008 Jun 1;164(6–7):505–15. doi:10.1016/J.NEUROL.2008.03.011

19. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. Cancer Cell. 2010 Jan 19;17(1):98–110. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020

20. Sidaway P. CNS cancer: Glioblastoma subtypes revisited. Nat Rev Clin Oncol. 2017 Oct 1;14(10):587. doi:10.1038/NRCLINONC.2017.122

21. Wang Q, Hu B, Hu X, Kim H, Squatrito M, Scarpace L, et al. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. Cancer Cell. 2017 Jul 10;32(1):42-56.e6. doi:10.1016/j.ccell.2017.06.003

22. Hu Y, Li Z, Zhang Y, Wu Y, Liu Z, Zeng J, et al. The Evolution of Tumor Microenvironment in Gliomas and Its Implication for Target Therapy. International Journal of Biological Sciences. Ivyspring International Publisher; 2023 Aug. p. 4311–26. doi:10.7150/IJBS.83531

23. Torres Rodríguez MP, Murcia Garcia KA, Cruz Baquero CA, Infante Cruz A del P. Inmunopatología del Glioblastoma Multiforme y su importancia en el ámbito clínico. Revista Ciencias Biomédicas. 2022 Apr 15;11(2):163–78. doi:10.32997/rcb-2022-3738

24. Nabors LB, Portnow J, Ammirati M, Baehring J, Brem H, Brown P, et al. Central Nervous System Cancers, Version 1.2015. J Natl Compr Canc Netw. 2015 Oct 1;13(10):1191–202. doi:10.6004/JNCCN.2015.0148

25. Sales AHA, Beck J, Schnell O, Fung C, Meyer B, Gempt J. Surgical Treatment of Glioblastoma: State-of-the-Art and Future Trends. Journal of Clinical Medicine 2022, Vol 11, Page 5354. 2022 Sep 13;11(18):5354. doi:10.3390/JCM11185354

26. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2014 Oct 1;23(10):1985–96. doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-0275

27. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. Nature. 2017 Jan 1;541(7637):321–30. doi:10.1038/NATURE21349

28. Desbaillets N, Hottinger AF. Immunotherapy in Glioblastoma: A Clinical Perspective. Cancers (Basel). 2021 Aug 1;13(15). doi:10.3390/CANCERS13153721

29. Lang F, Cornwell JA, Kaur K, Elmogazy O, Zhang W, Zhang M, et al. Abrogation of the G2/M checkpoint as a chemosensitization approach for alkylating agents. Neuro Oncol. 2023 Jun 1;26(6):1083. doi:10.1093/NEUONC/NOAD252

30. Gousias K, Theocharous T, Simon M. Mechanisms of Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Glioblastoma. Biomedicines. 2022 Mar 1;10(3):564. doi:10.3390/BIOMEDICINES10030564.

31. Fan HC, Chi CS, Chang YK, Tung MC, Lin SZ, Harn HJ. The Molecular Mechanisms of Plant-Derived Compounds Targeting Brain Cancer. Int J Mol Sci. 2018 Feb 1;19(2). doi:10.3390/IJMS19020395

32. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicol Pathol. 2007 Dec;35(4):495. doi:10.1080/01926230701320337

33. Chinyama HA, Wei L, Mokgautsi N, Lawal B, Wu ATH, Huang HS. Identification of CDK1, PBK, and CHEK1 as an Oncogenic Signature in Glioblastoma: A Bioinformatics Approach to Repurpose Dapagliflozin as a Therapeutic Agent. Int J Mol Sci. 2023 Nov 1;24(22):16396. doi:10.3390/IJMS242216396

34. Carter T, Valenzuela RK, Yerukala Sathipati S, Medina-Flores R. Gene signatures associated with prognosis and chemotherapy resistance in glioblastoma treated with temozolomide. Front Genet. 2023 Dec;14:1320789. doi:10.3389/fgene.2023.1320789.

35. Juric V, Murphy B. Cyclin-dependent kinase inhibitors in brain cancer: current state and future directions. Cancer Drug Resist. 2020 Mar;3(1):48–62. doi:10.20517/CDR.2019.105

36. Pack LR, Daigh LH, Meyer T. Putting the brakes on the cell cycle: mechanisms of cellular growth arrest. Curr Opin Cell Biol. 2019 Oct 1;60:106–13. doi:10.1016/j.ceb.2019.05.005

37. Akli S, Van Pelt CS, Bui T, Meijer L, Keyomarsi K. Cdk2 is required for breast cancer mediated by the low-molecular-weight isoform of cyclin E. Cancer Res. 2011 May 1;71(9):3377–86. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4086

38. Horiuchi D, Huskey NE, Kusdra L, Wohlbold L, Merrick KA, Zhang C, et al. Chemical-genetic analysis of cyclin dependent kinase 2 function reveals an important role in cellular transformation by multiple oncogenic pathways. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Apr 24;109(17):E1019. doi:10.1073/PNAS.1111317109/-/DCSUPPLEMENTAL

39. Tadesse S, Caldon EC, Tilley W, Wang S. Cyclin-Dependent Kinase 2 Inhibitors in Cancer Therapy: An Update. J Med Chem. 2019 May 9;62(9):4233–51. doi:10.1021/acs.jmedchem.8b01469

40. Liu H, Weng J. A comprehensive bioinformatic analysis of cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) in glioma. Gene. 2022 May;822:146325. doi:10.1016/j.gene.2022.146325

41. Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. Nat Rev Cancer. 2008 May;8(5):387–98. doi:10.1038/NRC2389

42. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. Nat Rev Cancer. 2013 Jan;13(1):11–26. doi:10.1038/NRC3419

43. Krishnan S, Lee S, Amoozgar Z, Subudhi S, Kumar AS, Posada JM, et al. Wnt inhibition alleviates resistance to anti-PD1 therapy and improves antitumor immunity in glioblastoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2025 Sep 23;122(38):e2414941122. doi:10.1073/PNAS.2414941122

44. Lee Y, Lee JK, Ahn SH, Lee J, Nam DH. WNT signaling in glioblastoma and therapeutic opportunities. Laboratory Investigation. 2016 Feb 1;96(2):137–50. doi:10.1038/LABINVEST.2015.140

45. Qu B, Liu BR, Du YJ, Chen J, Cheng YQ, Xu W, et al. Wnt/β-catenin signaling pathway may regulate the expression of angiogenic growth factors in hepatocellular carcinoma. Oncol Lett. 2014 Apr;7(4):1175–8. doi:10.3892/OL.2014.1828

46. Driehuis E, Clevers H. WNT signalling events near the cell membrane and their pharmacological targeting for the treatment of cancer. Br J Pharmacol. 2017 Dec 1;174(24):4547–63. doi:10.1111/BPH.13758

47. Masuda M, Sawa M, Yamada T. Therapeutic targets in the Wnt signaling pathway: Feasibility of targeting TNIK in colorectal cancer. Pharmacol Ther. 2015 Dec 1;156:1–9. doi:10.1016/J.PHARMTHERA.2015.10.009

48. Serafino A, Sferrazza G, Colini Baldeschi A, Nicotera G, Andreola F, Pittaluga E, et al. Developing drugs that target the Wnt pathway: recent approaches in cancer and neurodegenerative diseases. Expert Opin Drug Discov. 2017 Feb 1;12(2):169–86. doi:10.1080/17460441.2017.1271321

49. Goldsberry WN, Londoño A, Randall TD, Norian LA, Arend RC. A Review of the Role of Wnt in Cancer Immunomodulation. Cancers (Basel). 2019 Jun 1;11(6):771. doi:10.3390/CANCERS11060771

50. Mitsis T, Efthimiadou A, Bacopoulou F, Vlachakis D, Chrousos GP, Eliopoulos E. Transcription factors and evolution: An integral part of gene expression (Review). World Acad Sci J. 2020 Jan 1;2(1):3–8. doi:10.3892/WASJ.2020.32/HTML

51. Perkins ND. The Rel/NF-kappa B family: friend and foe. Trends Biochem Sci. 2000 Sep 1;25(9):434–40. doi:10.1016/S0968-0004(00)01617-0

52. Crespo I, Vital AL, Gonzalez-Tablas M, Patino MDC, Otero A, Lopes MC, et al. Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. American Journal of Pathology. 2015 Jul 1;185(7):1820–33. doi:10.1016/j.ajpath.2015.02.023

53. Atsaves V, Leventaki V, Rassidakis GZ, Claret FX. AP-1 Transcription Factors as Regulators of Immune Responses in Cancer. Cancers (Basel). 2019 Jul 1;11(7). doi:10.3390/CANCERS11071037

54. Shah K, Panchal S, Patel B. Porcupine inhibitors: Novel and emerging anti-cancer therapeutics targeting the Wnt signaling pathway. Pharmacol Res. 2021 May;167:105532. doi:10.1016/j.phrs.2021.105532

55. Han J, Yuan Y, Zhang J, Hou Y, Xu H, Nie X, et al. Regulatory effect of Wnt signaling on mitochondria in cancer: from mechanism to therapy. Apoptosis 2025 30:5. 2025 Apr 21;30(5):1235–52. doi:10.1007/S10495-025-02114-Z

56. Tompa M, Kalovits F, Nagy A, Kalman B. Contribution of the Wnt Pathway to Defining Biology of Glioblastoma. Neuromolecular Med. 2018 Dec 26;20(4):437–51. doi:10.1007/s12017-018-8514-x

57. Hofmann K. A superfamily of membrane-bound O -acyltransferases with implications for Wnt signaling. Trends Biochem Sci. 2000 Mar;25(3):111–2. doi:10.1016/S0968-0004(99)01539-X

58. Yun EJ, Kim S, Hsieh JT, Baek ST. Wnt/β-catenin signaling pathway induces autophagy-mediated temozolomide-resistance in human glioblastoma. Cell Death Dis. 2020 Sep 17;11(9):771. doi:10.1038/s41419-020-02988-8

59. Rao TP, Kühl M. An Updated Overview on Wnt Signaling Pathways. Circ Res. 2010 Jun 25;106(12):1798–806. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.219840

60. Liu Y, Qi X, Donnelly L, Elghobashi-Meinhardt N, Long T, Zhou RW, et al. Mechanisms and inhibition of Porcupine-mediated Wnt acylation. Nature. 2022 Jul 28;607(7920):816–22. doi:10.1038/s41586-022-04952-2

61. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. Organogenesis. 2008 Apr 27;4(2):68–75. doi:10.4161/org.4.2.5851

62. Durand JK, Zhang Q, Baldwin AS. Roles for the IKK-Related Kinases TBK1 and IKKε in Cancer. Cells. 2018 Sep 15;7(9):139. doi:10.3390/CELLS7090139

63. Rehman R, Tar L, Olamide AJ, Li Z, Kassubek J, Böckers T, et al. Acute TBK1/IKK-ε Inhibition Enhances the Generation of Disease-Associated Microglia-Like Phenotype Upon Cortical Stab-Wound Injury. Front Aging Neurosci. 2021 Jul 13;13. doi:10.3389/fnagi.2021.684171

64. Ji TH, Grossmann M, Ji I. G Protein-coupled Receptors. Journal of Biological Chemistry. 1998 Jul;273(28):17299–302. doi:10.1074/jbc.273.28.17299

65. Alam M, Ansari MM, Noor S, Mohammad T, Hasan GM, Kazim SN, et al. Therapeutic targeting of TANK-binding kinase signaling towards anticancer drug development: Challenges and opportunities. Int J Biol Macromol. 2022 May 15;207:1022–37. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2022.03.157

66. Choi EA, Choi YS, Lee EJ, Singh SR, Kim SC, Chang S. A pharmacogenomic analysis using L1000CDS2 identifies BX-795 as a potential anticancer drug for primary pancreatic ductal adenocarcinoma cells. Cancer Lett. 2019 Nov 28;465:82–93. doi:10.1016/J.CANLET.2019.08.002

67. Figarella-Branger D, Colin C, Coulibaly B, Quilichini B, Maues De Paula A, Fernandez C, et al. Classification histologique et moléculaire des gliomes. Rev Neurol (Paris). 2008 Jun 1;164(6–7):505–15. doi:10.1016/J.NEUROL.2008.03.011

68. Pouyan A, Ghorbanlo M, Eslami M, Jahanshahi M, Ziaei E, Salami A, et al. Glioblastoma multiforme: insights into pathogenesis, key signaling pathways, and therapeutic strategies. Molecular Cancer. BioMed Central Ltd; 2025. doi:10.1186/s12943-025-02267-0

69. Tai D, Wells K, Arcaroli J, Vanderbilt C, Aisner DL, Messersmith WA, et al. Targeting the WNT Signaling Pathway in Cancer Therapeutics. Oncologist. 2015 Oct 1;20(10):1189–98. doi:10.1634/theoncologist.2015-0057

70. Choi EA, Choi YS, Lee EJ, Singh SR, Kim SC, Chang S. A pharmacogenomic analysis using L1000CDS2 identifies BX-795 as a potential anticancer drug for primary pancreatic ductal adenocarcinoma cells. Cancer Lett. 2019 Nov 28;465:82–93. doi:10.1016/J.CANLET.2019.08.002

71. Vu HL, Aplin AE. Targeting TBK1 Inhibits Migration and Resistance to MEK Inhibitors in Mutant NRAS Melanoma. Mol Cancer Res. 2014 Oct 1;12(10):1509. doi:10.1158/1541-7786.MCR-14-0204

72. Contreras Chávez GG. Modificación de la viabilidad celular en glioblastoma humano dependiente de la actividad de NF-kB a través del bloqueo farmacológico de las rutas de señalización WNT y TBK1 [Internet]. 2025 Apr 7 [cited 2026 Aug 16]. Available from: https://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/142574

73. Wang F, Yan G, Tian H, Lei G, Liu M, Peng Y, et al. Aucan targets CDK2 to suppress glioblastoma progression by inhibiting PI3K/AKT pathway-mediated

proliferation and inducing apoptosis. Biochem Pharmacol. 2026 Jul 1;249:117893. doi:10.1016/J.BCP.2026.117893

74. Scuderi SA, Lanza M, Casili G, Esposito F, Colarossi C, Giuffrida D, et al. TBK1 Inhibitor exerts antiproliferative effect on glioblastoma multiforme cells. Oncol Res. 2021 Sep;28(7):779–90. doi:10.3727/096504021X16161478258040

14. Anexos

Comité de Ética en Investigación (CEI) con número de registro CONBIOETICA-15-CEI-002-20210531.



Universidad Autónoma del Estado de México
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
CEI/033/2023
Toluca, Estado de México, 21 de abril de 2023
Asunto: Dictamen de Aprobación

PH. D. IRAZÚ CONTRERAS GARCÍA
INVESTIGADORA PRINCIPAL
P R E S E N T E

Por este medio, el Comité de Ética en Investigación (CEI) con número de registro **CONBIOETICA-15-CEI-002-20210531**, informa a usted que el protocolo:

MODIFICACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN GLIOBLASTOMA HUMANO DEPENDIENTE DE LA ACTIVIDAD DE NF-kB A TRAVÉS DEL BLOQUEO FARMACOLÓGICO DE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN WNT Y TBK1

Fue sometido a revisión y **APROBADO** en sesión extraordinaria en MARZO 2023, obteniendo así el número de **Registro: 006.2023** en su Archivo.

Se extiende la presente para los fines que a la interesada convengan,

ATENTAMENTE
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
"2023, Conmemoración de los 195 Años de la Fundación del Instituto Literario del Estado de México"

Dr. Virgilio Eduardo Trujillo Condes
Presidente del CEI

Dra. Adriana C. Pliego Carrillo
Secretaria del CEI

COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE MEDICINA

Ccp. Archivo

Jesús Carranza, esq. Paseo Tollocan s/n
Col. Moderna de la Cruz, C.P. 50180,
Toluca, Estado de México. Tel: 722 217 35 52
medicina.uaemex.mx

Tabla 4. Preparación de estándares de BSA para cuantificación de proteínas mediante el reactivo de Bradford.

Concentración (mg/mL)	Albumina (2 mg/mL)	Agua destilada
0.1	50 µL	950 µL
0.2	100 µL	900 µL
0.4	200 µL	800 µL
0.6	300 µL	700 µL
0.8	400 µL	600 µL
1.0	500 µL	500 µL
1.2	600 µL	400 µL

Otras soluciones utilizadas durante la separación de proteínas:

Persulfato de amonio 10% (APS 10%)

1 g de persulfato de amonio en 10 ml de agua destilada. Guardar a 4°C.

Tris 1.5 M pH 8.8

18 g de Tris base, disolver en 70 mL de agua destilada, ajustar pH a 8.8 con HCl y completar a 100 mL con agua.

Tris 0.5 M pH 6.8

6 g de Tris base, disolver en 70 mL de agua destilada, ajustar pH a 6.8 con HCl y completar a 100 mL con agua.

Lauril sulfato de sodio 10% (SDS 10%)

10 g de SDS, disolver en 70 mL de agua destilada, evitando hacer espuma, completar a 100 mL con agua.

Amanda C Hernandez

TESIS AMANDA FINAL 1.docx

Universidad Autónoma del Estado de México

Detalles del documento

Identificador de la entrega
trn:oid:::3117:631112943

Fecha de entrega
28 sep 2026, 8:54 a.m. GMT-6

Fecha de descarga
28 sep 2026, 9:19 a.m. GMT-6

Nombre del archivo
TESIS AMANDA FINAL 1.docx

Tamaño del archivo
1.4 MB

50 páginas

11.453 palabras

63.399 caracteres

20% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Texto citado
- Coincidencias menores (menos de 8 palabras)
- Methods and Materials

Exclusiones

- N.º de coincidencias excluidas

Fuentes principales

20% Fuentes de Internet
5% Publicaciones
0% Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alerta de integridad para revisión

Caracteres reemplazados
96 caracteres sospechosos en N.º de páginas
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.