



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Odontología

Centro de Investigación y Estudios avanzados
en Odontología “Dr. Keisaburo Miyata”

**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**

TESIS

Que para obtener el Grado de Doctor en
Ciencias de la Salud

Presenta:

Mtro. Gerson Gabriel Contreras Chávez

CVU: 893524

No. Cuenta: 0914680

Directora:

Dra. Irazú Contreras García

Co-Director:

Dr. José Antonio Estrada Guadarrama

Tutora:

Dra. Ericka Nelly Pompa Mera



2022-2026

Toluca, Estado de México, febrero de 2025

ÍNDICE

	No. pág.
Resumen	2
1. Marco teórico	3
Glioblastoma	3
Glioblastoma e inmunosupresión	5
Factor de transcripción NF-kB	7
Vía de señalización Wingless (WNT)	10
Vía de señalización TBK	12
Receptores tipo Toll (TLR)	13
Inhibidores farmacológicos	16
2. Planteamiento del problema	24
3. Justificación	26
4. Hipótesis	27
5. Objetivos	28
Objetivo general	28
Objetivos específicos	28
6. Diseño metodológico	29
Cultivo celular	29
Western blot	29
Citometría de flujo	30
Ensayo de viabilidad	32
7. Resultados	36
8. Discusión	40
9. Conclusiones	42
10. Referencias bibliográficas	43
11. Anexos	44

RESUMEN

El glioblastoma (GB) es un tumor del sistema nervioso central compuesto por células tumorales y otros tipos celulares, como macrófagos, neutrófilos, astrocitos, neuronas y células T. Es uno de los tumores más agresivos y con peor pronóstico, teniendo una media de 15 meses de supervivencia post-diagnóstico. A pesar de los avances en su tratamiento, la mayoría han sido ineficaces debido a la capacidad del GB de generar un microambiente inmunosuprimido que induce la proliferación de las células tumorales. Por ello, es necesario investigar tanto los mecanismos moleculares involucrados en las alteraciones de las vías de señalización, como el microambiente y su impacto en las respuestas inmunitarias.

El objetivo del presente estudio fue determinar los efectos del bloqueo farmacológico de las vías de señalización WNT y TBK1, a través de los inhibidores IWP12 y BX795, sobre los cambios en viabilidad celular, ciclo celular y su relación con la expresión de NF- κ B (p50 y p65) en las líneas celulares U87MG y A172 de glioblastoma humano, para ello se realizaron ensayos de cristal violeta, citometría de flujo y western blot respectivamente.

Los resultados muestran que el tratamiento con IWP12 y BX795 induce una reducción en la viabilidad celular en ambas líneas celulares de glioblastoma humano U87MG y A172, mostrando una dependencia de tiempo y concentración. Del mismo modo se han observado cambios en el ciclo celular en ambas líneas celulares principalmente durante 24 y 48 horas de estimulación con BX795 induciendo un incremento del porcentaje de células en las fases S/M/G2 del ciclo celular.

Los resultados sugieren que el tratamiento con BX795 promueve cambios en la viabilidad celular, así como cambios en el ciclo celular dependientes de la expresión de NF- κ B, lo cual indica que pudiera ser utilizado como un posible adyuvante al tratamiento actual de GB, mejorando la respuesta al mismo y potencialmente mejorar la supervivencia de los pacientes.

1. Marco teórico

1.1. Glioblastoma

Los gliomas son los tumores elementales más comunes del sistema nervioso central, caracterizados por crecimiento invasivo, progresión rápida, dificultad en la resección completa, recurrencia frecuente y mal pronóstico (1). Estos representan el 29% de todos los tumores cerebrales y dentro de este grupo de tumores se encuentra el glioblastoma (GB), el tipo de tumor cerebral más letal. El GB – IDH1 tipo silvestre o *-wildtype* (IDH1-wt) de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) es clasificado como un tumor de grado 4, debido a sus patrones de necrosis y cambios vasculares (2). Los gliomas y el GB surgen de células progenitoras neurogliales. El GB está conformado por diferentes tipos de células, incluidas células madre de glioblastoma (CMG) (3). Las CMG son células pluripotentes de división lenta y se han reconocido por su importancia en la resistencia a la terapia citotóxica. Así mismo, son responsables de la expansión y tumorigénesis. Otros tipos de células presentes en la masa tumoral incluyen células asesinas naturales (NK), células plasmáticas, células B, diversas subpoblaciones de células T colaboradoras, como T reguladoras (Tregs), Th1, Th2, Th17; además de células T CD8+, células dendríticas, granulocitos, monocitos, macrófagos tipo 2 y tipo 1, consideradas como las células más comunes en el GB (3).

Los GB se pueden dividir en subtipos primarios y secundarios que evolucionan a través de diferentes vías genéticas. Afectan a pacientes de diferentes edades y tienen diferencias en los resultados al tratamiento (3, 4). Los GB primarios representan el 80% de los GB y ocurren en pacientes mayores (edad media 65 años), viéndose mayormente afectado el grupo de edad entre 75 y 84 años. Los GB secundarios se desarrollan a partir de un astrocitoma de grado inferior o de oligodendrogliomas, y se presentan en pacientes más jóvenes (edad media 45 años) (4).

Al igual que otros tipos de cáncer, el GB tiene múltiples causas posibles, incluidas las alteraciones moleculares. Entre los daños genéticos detectables más

tempranos en gliomas de bajo grado, se encuentran ciertas mutaciones en el gen de la enzima isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1). Está documentado que las mutaciones de IDH1 ocurren en aproximadamente 75% a 80% de los GB de segundo grado, mientras que en los subtipos primarios solo se presentan en 3% a 5% y se asocian con una supervivencia prolongada. Esta observación llevó a la organización mundial de la salud (OMS) a modificar el esquema de clasificación de tumores del sistema nervioso central, para distinguir los subtipos de GB IDH-wt e IDH-mutante (5).

Se han identificado cuatro subtipos de GB de acuerdo con diferencias moleculares: neural (NE), proneural (PN), clásica (CL) y mesenquimal (MES). Esta clasificación se basó en cambios de expresión en el receptor del factor de crecimiento A-derivado de plaquetas (PDGFRA), IDH, Neurofibromina 1 (NF1) y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). El subtipo PN se ha asociado con una mayor media de supervivencia; este subtipo presenta alteraciones de PDGFRA y mutaciones en IDH1. Este subtipo contiene el porcentaje más alto de pacientes jóvenes. La clasificación molecular, más allá del pronóstico, puede ayudar a desarrollar mejores terapias dirigidas específicamente, que se puedan utilizar junto al tratamiento convencional contra glioblastoma (6).

De acuerdo con estudios epidemiológicos, la incidencia de GB presenta diferencias según la etnicidad de la población. La incidencia es mayor en caucásicos no hispanos, mientras que en personas nativo americanos se presenta en un 40% menor. Los países que presentan una incidencia mayor son EUA, Australia y los países del Norte y Oeste de Europa. La incidencia se ve incrementada con la edad. Los hombres se ven afectados con mayor frecuencia, aproximadamente 1.58 veces más, comparado con mujeres. Más allá de los pocos casos de predisposición genética y exposición a radiación ionizante, no se conocen factores de riesgo específicos para glioblastoma (7).

A pesar de los grandes avances en el entendimiento de la enfermedad, sigue teniendo un mal pronóstico médico, con una supervivencia media de 15 meses.

Regularmente, el tratamiento incluye cirugía, radioterapia y quimioterapia, administrada con el agente alquilante quimioterapéutico temozolomida. (8). Sin embargo, el glioblastoma invariablemente recurre con mayor resistencia a la quimioterapia. Solo el 5.5% de los pacientes supera los 5 años de vida post-diagnóstico (8). Las opciones de tratamiento en el contexto de la recurrencia están menos definidas, sin un estándar de atención bien establecido y poca evidencia que prolonguen la media de supervivencia. Debido a la baja tasa de supervivencia de los pacientes diagnosticados, es necesario explorar diferentes terapias innovativas y enfoques combinados; por ejemplo, la inmunoterapia y oncología de precisión.

1.2 Glioblastoma e inmunosupresión

La inmunovigilancia frente al cáncer es el proceso a través del cual el sistema inmunológico puede detectar y eliminar células tumorales. Esta teoría, también conocida como *inmunoedición*, fué originalmente propuesta por McFarlane Burnet y comprende tres fases: eliminación, equilibrio y escape (9). Durante la fase de escape, algunas células sobreviven y desarrollan la capacidad de evadir la respuesta inmunológica, a través de diversos procesos, que pueden incluir la inmunosupresión (10). Está documentado que el GB induce una inmunosupresión sistémica e intratumoral, modificando las principales vías de señalización inmunogénicas y alterando la inmunidad celular dentro y fuera del cerebro. Este grado de inmunosupresión explica en parte por qué algunos estudios clínicos de fase III para GB han fracasado, y también puede presentarse como parte de los efectos secundarios inmunosupresores de la quimioterapia y la radiación (11).

Debido a que el GB es también un tumor heterogéneo, facilita la evasión inmunitaria (12, 13). Las células de GB secretan una variedad de factores solubles, incluidos el factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β), interleucina 6 (IL-6) y quimiocinas como CCL2, CXCL12 y SDF-1, que reclutan activamente microglía y macrófagos. El glioblastoma y otros tumores cerebrales pueden provocar una inmunosupresión sistémica e intratumoral significativa, debida en gran parte por macrófagos asociados al tumor (TAMs) (14).

La microglía en GB es una fuente principal de TGF- β , la cual desempeña un papel clave en la contribución del microambiente inmunosuprimido. TGF- β participa en este proceso a través del bloqueo de la activación y proliferación de células T, inhibiendo la activación de células NK, inhibe NKG2D en células T CD8+ y NK, lo cual permite que las células sean menos efectivas en la respuesta citotóxica, TGF- β también regula negativamente la producción de IL-2, promoviendo la diferenciación de células Tregs (15). La abundancia de Tregs se asocia con un mal pronóstico clínico, ya que cambian el medio de las citocinas hacia la inmunosupresión. La inmunosupresión se presenta mediante la capacidad que tienen los Tregs por restringir la función infiltrante de las células T, previniendo la producción de IL-12. La elevada cantidad de Tregs en GB se puede deber a la producción de las quimiocinas CCL22 y CCL2, secretadas por el GB. Estas quimiocinas, suelen unirse a los receptores CCR2 y CCR4, comúnmente expresados por Tregs (14, 16).

Los puntos de control inmunológico restringen la función del sistema inmune a través de vías co-estimuladoras y co-inhibidoras. Estas vías reguladoras suprimen la activación y proliferación de las células T. Un punto de control inmune involucrado en la evasión inmune de GB es el ligando de la proteína 1 de muerte celular programada (PD-L1). La activación de PD-L1 suprime la proliferación y función de las células T citotóxicas residentes en el tumor. PD-L1 también puede mejorar la actividad de Tregs (14).

En el GB, varias células inmunes expresan PD-L1; por ejemplo, las células T CD4+ y CD8+. Así mismo, los TAMs expresan PD-L1 en su superficie. La expresión de PD-L1 en monocitos circulantes y TAMs podría desencadenar inmunosupresión sistémica, a través de un mecanismo de retroalimentación por IL-10. La IL-6, producida por células endoteliales vasculares y TAMs, se ha implicado en procesos pro-tumorales en GB, entre los que se encuentra promover el reclutamiento de macrófagos a través de la inducción de CCL5/CXCL5. Así mismo, la expresión de PD-L1 es dependiente de expresión de IL-6 (14,17).

Además de las citocinas inmunosupresoras, los contactos directos célula-célula, a través de PD-L1, moléculas HLA y el receptor inductor de apoptosis Fas, también pueden contribuir al escape inmunológico. Las células madre de glioblastoma también tienen la habilidad de escapar a la respuesta inmunitaria, mediante la regulación negativa de la expresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) I, de este modo llevando a una falla en la activación de las células T citotóxicas (17).

Existen terapias dirigidas a las vías de señalización que están frecuentemente alteradas en el glioblastoma, las cuales se han observado participan en el proceso de inmunosupresión, como las vías fosfoinositol 3-quinasa (PI3K)/proteína quinasa B (AKT), mTOR y p53, así como el EGFR; sin embargo, no se han logrado resultados positivos en el tratamiento del GB (7). Existen otras vías de señalización involucradas en la tumorigénesis, entre ellas el factor nuclear kappa B (NF- κ B), Wingless (WNT) y TBK1, que además podrían estar involucradas en el microambiente inmunológico del GB.

1.3 Factor de transcripción NF- κ B

El factor nuclear kappa B (NF- κ B) es un factor de transcripción que regula la inflamación y la inmunidad en respuesta a estímulos muy variados. NF- κ B está compuesto por una familia de cinco factores de transcripción conformada por homodímeros y heterodímeros de la familia de proteínas Rel: p65, p50, p52, RelB y c-Rel. Sin embargo, estos miembros de la familia pueden dimerizar en diferentes combinaciones, solo los dímeros que contienen p65, RelB o c-Rel pueden funcionar como factores de transcripción competentes. En el CNS, los heterodímeros predominantes son p65/p50 (18).

Generalmente y en condiciones de homeostasis, el factor NF- κ B se encuentra inactivo en el citoplasma. Posterior a un estímulo apropiado, las proteínas inhibitoras, denominadas inhibidores de κ B (I κ Bs), las cuales se conforman por I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ , estas se encuentran unidas a NF- κ B, son fosforiladas,

ubiquitinizadas y degradadas por el proteosoma, permitiendo la liberación de NF- κ B. Una vez que se activa NF- κ B es traslocado al núcleo y regula la expresión de genes diana, entre las cuales se encuentran citocinas, receptores solubles de citocinas, proteínas de estrés, moléculas de adhesión, moléculas inmunoregulatoras (19) (Figura1).

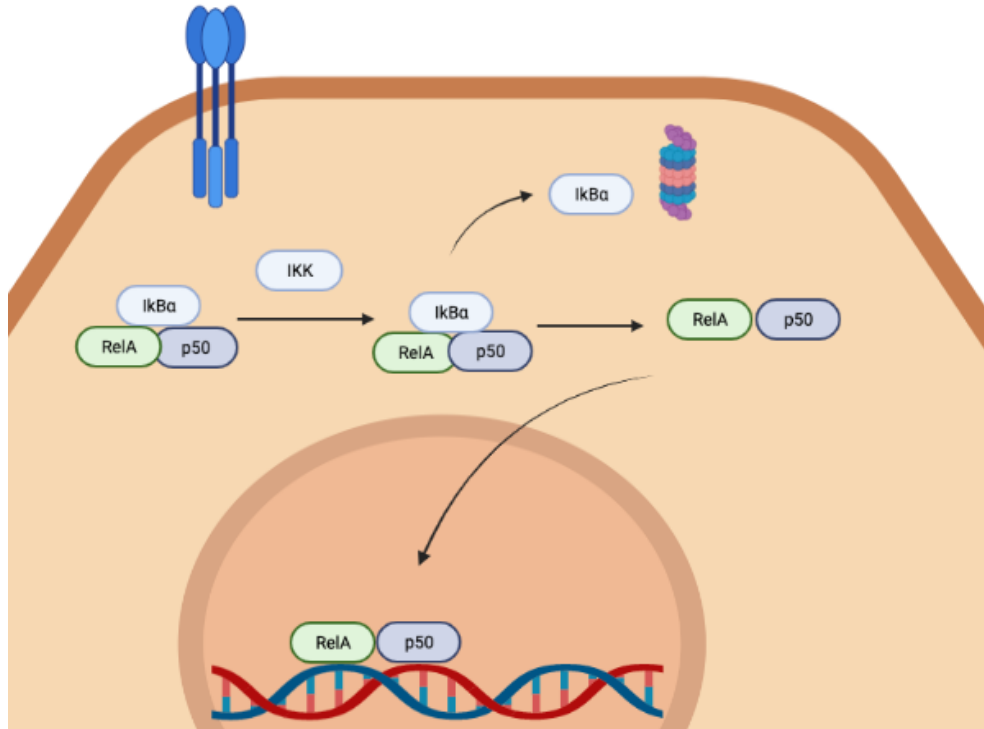


Figura 1. Vía de señalización clásica de NF- κ B. El factor de transcripción NF- κ B se encuentra de forma inactivada en presencia de I κ B. Una variedad de estímulos, como ROS y citocinas inflamatorias, activan NF- κ B al degradar el complejo I κ B. NF- κ B de forma activada se traslada al núcleo, se une al ADN y activa la transcripción de genes diana (Modificada de 19).

La activación de NF- κ B está controlada por una serie de reguladores positivos y negativos. NF- κ B puede ser activado por varios estímulos como lipopolisacáridos bacterianos, ésteres de forbol, virus, estrés oxidativo, luz UV y radiación ionizante; su activación se produce a través de diferentes vías de señalización, que son reguladas por receptores o factores de crecimiento que se encuentran desreguladas en los gliomas, entre los que se encuentran TLRs, EGF, EGFR, PTEN, IGFBP2, TNF- α / TNFR1, ING4. La vía de señalización de NF- κ B desempeña un papel

importante en diversas enfermedades mediante la regulación de la inmunidad, la proliferación y la apoptosis (20).

Se ha observado una activación aberrante de NF- κ B en varios tipos de cáncer incluido el glioblastoma y puede controlar la expresión de genes que promueven la supervivencia de las células tumorales y otros factores oncogénicos (18, 21). Una variedad de estímulos, como ROS y citocinas inflamatorias, activan NF- κ B. El papel en la carcinogénesis de NF- κ B depende de la activación de NF- κ B y la producción de citocinas relacionadas como IL-1, IL-2, IL-6, IL-10 y TNF- α (20, 21), los cuales están directamente relacionados con el control de proliferación, ciclo celular y regulación de apoptosis. Estudios recientes indican que la expresión anómala de estos reguladores puede contribuir a una mayor activación de NF- κ B, lo cual es observado comúnmente en glioblastoma, se ha asociado a radio resistencia y un peor pronóstico relacionado con la resistencia al tratamiento convencional (18, 21, 22).

En el glioblastoma, la vía de señalización NF- κ B se encuentra sobre-activada y se asocia con un peor pronóstico clínico. Se ha descrito que algunos subtipos de glioblastoma presentan mayores concentraciones de componentes en la vía de señalización de NF- κ B como TNFRSF1A, RELB y TRADD. La actividad de NF- κ B está controlada por una serie de reguladores positivos y negativos. NF- κ B puede ser activado a través de diferentes vías de señalización o factores de crecimiento que se encuentran desreguladas en glioblastoma, entre los que se encuentran TLRs, EGF/EGFR, PTEN/Akt, IGFBP2 e ING4, los cuales participan en el desarrollo y agresividad de glioblastoma, resultando en evasión de la respuesta inmune, progresión tumoral, resistencia a la apoptosis, neoangiogénesis y resistencia al tratamiento (19, 20, 21, 22).

NF- κ B como un factor que promueve la supervivencia celular y la proliferación a través de proteínas que son reguladas por NF- κ B en GB, incluyen Akt, Bcl2, Bclxl, survivin, Cox2 y el inhibidor de proteínas de apoptosis (IAPs) y las ciclinas tipo D. I κ Ba controla el complejo p52/RelB del factor de transcripción NF- κ B en la transición

de la fase G1 a S del ciclo celular (22). Además, p53 interactúa con el inhibidor del ciclo celular p16INK4a. Sin embargo, la actividad de NF- κ B relacionado al reclutamiento de genes diana proliferativos fluctúan durante el ciclo celular. La sobreexpresión de NF- κ B asociado al ciclo celular depende de varios factores que participan en el mismo. P53 participa en la activación de NF- κ B, a través de CDKN2A un supresor de tumores, este participa en la modulación del arresto celular. Del mismo modo la activación de la ciclina D1 mediante la vía de señalización WNT participa activamente en el ciclo celular, ya que es clave en la regulación de la fase G1 del ciclo celular (21, 22).

También participa en la supervivencia de células de glioblastoma, debido a que promueve la captura de glucosa a través de la sobre activación del receptor de glucosa 1 (GLUT1). Así mismo se ha descrito el papel del mecanismo IKK β /NF- κ B como piedra angular en gliomagénesis (23).

1.4. Vía de señalización Wingless (WNT)

La vía de señalización de la familia de sitios de integración MMTV tipo Wingless (WNT) es una de las vías de señalización conservadas evolutivamente que regulan varias funciones celulares, incluidas la proliferación celular, apoptosis, polaridad, migración y mantenimiento de células madre. La desregulación de la vía WNT representa un factor crítico para el desarrollo de tumores. Se han descrito varios genes de WNT, con un número diferente entre diferentes especies. Las proteínas Wnt se secretan como glicoproteínas modificadas con lípidos, normalmente de 350 a 400 aminoácidos de longitud (24).

En la superficie celular, las proteínas Wnt activan receptores de la membrana celular de manera paracrina y autocrina. Las proteínas Wnt secretadas por las células pueden inducir mecanismos celulares mediante la activación de proteínas de membrana FZD1-10 (Frizzled 1-10), proteínas intracelulares y factores de transcripción, regulando la expresión génica. La estructura de la vía Wnt se basa en tres vías de señalización: vía de señalización canónica, dependiente de β -catenina,

y dos vías de señalización no canónicas, independientes de β -catenina: la vía de señalización de PCP (polaridad celular plana) y la vía de Ca^{2+} -Wnt (24).

La activación del complejo transmembrana compuesto por el receptor Fzd y el correceptor de proteína relacionada con lipoproteínas de baja densidad 5/6 (LRP5 o LRP6), media la vía Wnt canónica dependiente de β -catenina. La estimulación del receptor Fzd a través de ligandos Wnt para otros correceptores, da como resultado una activación de vías Wnt no canónicas (24). La unión de Wnt a su receptor promueve la fosforilación de la proteína dishevelled (DVL), que conduce a la desfosforilación de la proteína axina. La β -catenina, de este modo, puede librarse del complejo de degradación conformado por dos cinasas: caseína cinasa 1 (CK1a), glicógeno sintasa cinasa 3 β (GSK-3 β) y dos proteínas andamios: eje de inhibición (Axina) y adenomatous polyposis coli (APC), evitando su degradación. La acumulación de β -catenina promueve su translocación al núcleo. La β -catenina es una proteína involucrada en la transcripción de genes, siendo los más relevantes los miembros de la familia de factores de transcripción factor de células T / factor potenciador linfocitario (TCF/LEF) (24, 25) (Figura 2).

En la vía Wnt no canónica, los ligandos Wnt se unen a los receptores FZD y a la proteína correceptora tirosina cinasa 7 (PTK7), receptor relacionado con RAR (ROR) o al receptor similar a tirosina cinasa (RYK), transmitiendo la señal a DVL. DVL forma el complejo activador de disheveled asociado de morfogénesis 1 (DVL-Daam-1), que desencadena un GTPasa, como (RhoA) y (ROCA). Así. Mismo DVL también desencadena (RAC), (JNK) y (AP-1). Esta vía no canónica está involucrada en el reordenamiento de citoesqueleto, motilidad y polaridad celular (25) (Figura 2).

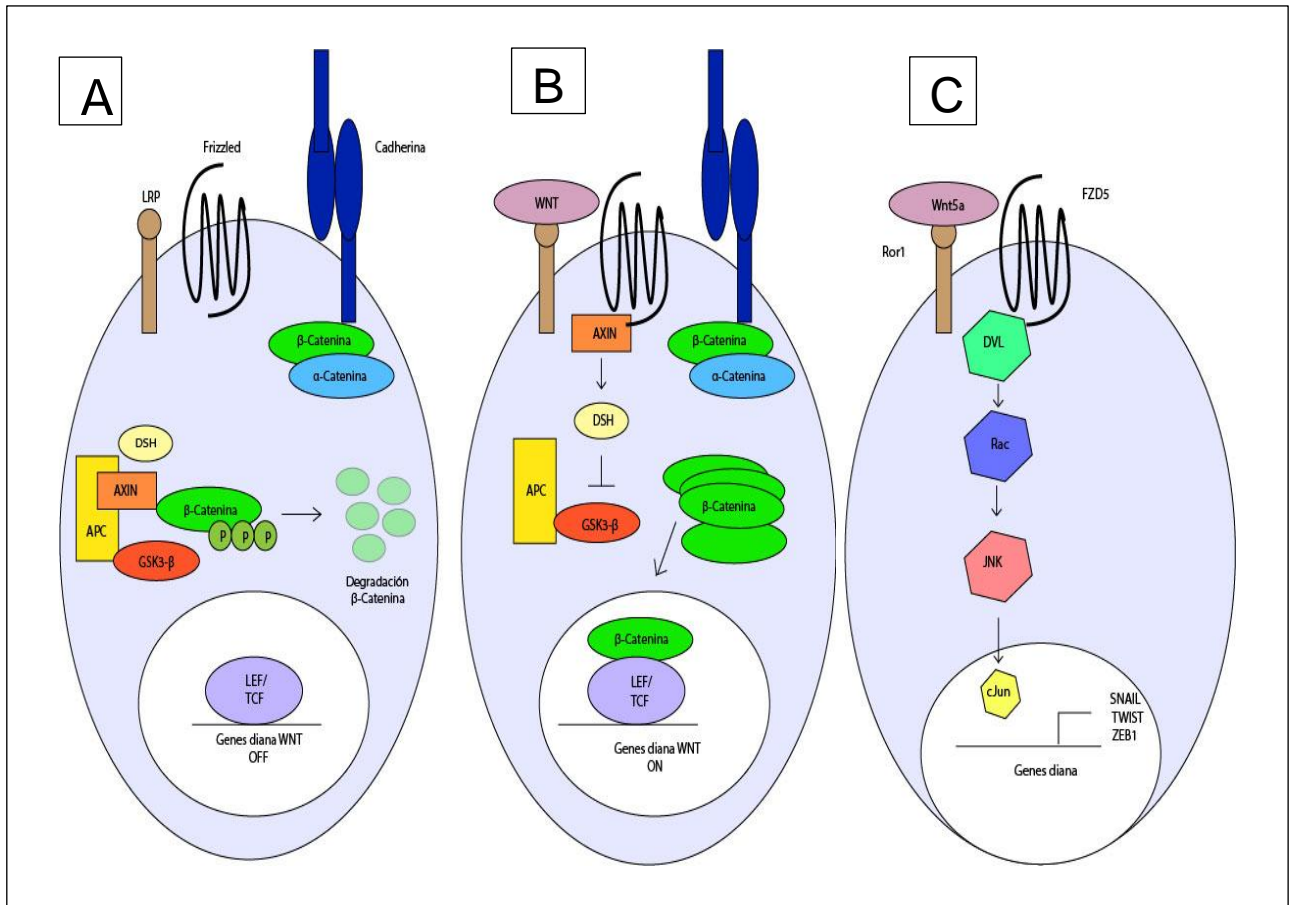


Figura 2. Vías de señalización WNT. A) Sin la presencia de la señalización de Wnt, β -Catenina forma un complejo con Axina, APC y GSK3- β y se fosforila, lo que lleva a su degradación. La β -Catenina también se puede unir a cadherinas y regular la adhesión célula-célula. B) En la vía que participa Wnt, β -Catenina se desacopla del complejo de degradación y transloca al núcleo, donde se une a los factores de transcripción LEF/TCF, activando genes diana. C) En la vía no canónica de WNT, Wnt se une a los receptores FZD, provocando la activación, a través de DVL, de Rho Y Rac, para finalmente activar JNK y los factores de transcripción de AP-1. (Modificado de 25, 229)

Cuando se activa la vía Wnt canónica, la β -catenina se transloca al núcleo y actúa como factor de transcripción. Sin embargo, cuando la vía Wnt no está activa, la proteína β -catenina se degrada. Alteraciones en los componentes de la vía de señalización Wnt son responsables de múltiples patologías relacionadas al desarrollo celular y cáncer (26). Así mismo, se ha informado que existe una activación continua de la β -catenina en los tumores. Estos hallazgos confirman que existen otros factores capaces de activar la β -catenina y sus vías posteriores (27).

La vía de señalización se vuelve un poco compleja debido a la diversidad de receptores FZD y sus ligandos Wnt, debido a que cada uno de estos ligandos exhibe particularidades diferentes. A la fecha, se han identificado al menos 19 proteínas Wnt en humanos. Se ha asociado la progresión tumoral con diferentes tipos de ligandos Wnt: Wnt1a, Wnt1b, Wnt5, Wnt11, en diferentes tipos de cáncer (28).

El ligando más estudiado es Wnt5a. Es una proteína evolutivamente conservada; desempeña un papel importante en el desarrollo embrionario y la homeostasis. Se han descrito que la señalización alterada de Wnt5 es un evento importante en la progresión tumoral, con efectos tanto de supresión en diferentes tipos de cáncer. Se ha descrito que la vía de señalización Wnt5/NF- κ B/IL-6/STAT3, en varios tipos de cáncer, promueve una retroalimentación positiva, amplificando el efecto de Wnt5a. Así mismo, se ha visto que tiene un doble efecto en el microambiente tumoral, al activar las vías de señalización ROR1/AKT/p65 y TLR/MYD88/p50. En glioblastoma, se ha observado un efecto pro-tumorigénico. La vía de Wnt5a es particularmente importante en casi todos los aspectos de función y diferenciación en los macrófagos. Se ha demostrado que Wnt5a induce quimiotaxis de macrófagos y la activación de JNK y NF- κ B (28, 29, 30).

Debido a que las alteraciones en la vía de señalización WNT se pueden encontrar en varios tipos de cáncer, estos pueden estar asociados con mutaciones en componentes centinela de las vías: viz, APC, β -catenina, AXIN, WTX y TCF4. Estudios recientes han demostrado mutaciones de APC en aproximadamente 13% de los casos de GB (29, 30). Sin embargo, el papel de la señalización Wnt en el glioblastoma permanece poco aclarado.

La figura 1 muestra las principales vías de activación de la vía de señalización de WNT: la vía canónica, que es dependiente de la activación de β -Catenina y cuya activación depende de la presencia de ligandos WNT, y la vía no canónica, en la que se activa JNK.

Más allá de la participación de Wnt/ β -Catenina en la activación transcripcional, se cree que esta vía de señalización desempeña un papel crucial durante la mitosis. Se ha descrito la participación de la vía de señalización WNT, en la proliferación celular, al existir una relación directa entre esta vía y factores de crecimiento mitógenicos. Estos factores de crecimiento sinergizan con la señalización de Wnt/ β -Catenina mediante la activación de LRP6 en la fase G2/M. Los reguladores del punto de control del ciclo celular que controlan la entrada a G2/M también pueden afectar la señalización de Wnt. La propia señalización de Wnt/ β -Catenina promueve la progresión de G1 al inducir c-myc y ciclina D1. Lo anterior sugiere que la señalización de Wnt/ β -Catenina genera un ciclo de retroalimentación positiva en células en proliferación, de esta forma promover la progresión del ciclo celular (31).

1.5. Vía de señalización TBK1

La cinasa de unión TANK-1 (TBK1) es una proteína serina/treonina cinasa de 84kDa. Consta de 729 residuos de aminoácidos, compuestos por un dominio quinasa (KD, 1-307) ubicado en su extremo N-terminal, un dominio similar a la ubiquitina (ULD, 308-383), un dominio en espiral (CCD1, 407-657) y un dominio en espiral 2 (CCD2, 658-713). TBK1 forma un homodímero o heterodímero con IKKi (30). TBK1 tiene múltiples colaboradores de unión, como el activador de NF- κ B (TANK) asociado a la familia TRAF, el adaptador TBK1 similar a NAP1 (SINTBAD), y la proteína asociada a NAK (NAP1), que son críticos para su activación (33, 34).

TBK1 desempeña un papel esencial en varias vías de señalización e inducción de interferones que pueden aportar la localización subcelular de TBK1 y pueden contribuir a su regulación y especificidad de señalización. TBK1 regula las respuestas inmunes innatas coordinando la activación de factores de transcripción que incluyen el factor regulador de interferón 3 (IRF3) y las vías NF- κ B (32). TBK1 es un miembro de la familia de la proteína quinasa I κ B quinasa (IKK), que incluye las IKK canónicas como IKK α , IKK β e IKK γ (NEMO) y los miembros no canónicos de IKK, como IKK ϵ (IKBKE) y TBK1, con roles establecidos que coordinan la

inmunidad innata, induciendo la respuesta de interferón tipo I (IFN) y modulando la señalización de NF- κ B (35). El reconocimiento de ácidos nucleicos citoplasmáticos por receptores de ADN/ARN activa TBK1, que conduce a la fosforilación y activación del factor regulador de interferón 3 y 7 (IRF 3 y 7). Estos factores de transcripción son clave en la regulación de la expresión de interferones de tipo I (IFN; IFN- α/β). TBK1 es activada por la señalización a través de los receptores tipo Toll y receptores tipo RIG-I, promoviéndose la producción de IFN1 e IRF3/IRF7. TBK1 tiene funciones adicionales en autofagia/mitofagia/xenofagia, metabolismo celular, ciclo y muerte celular (36).

En la respuesta inmune innata, el GMP cíclico - AMP sintasa (cGAS) se une al ADN citoplasmático derivado de patógenos para generar GMP-AMP cíclico (cGAMP), que se une al estimulador de genes de interferón (STING), lo que lleva al reclutamiento de TBK1 e IRF3/7, promoviendo la actividad de estos factores de transcripción (37). TBK1 también fosforila el transductor de señal y el activador de la transcripción 6 (STAT6) en Ser407, y STAT3 en Ser754, para promover aspectos reguladores que son clave en la transducción de señales y expresión génica (38) (Figura 3).

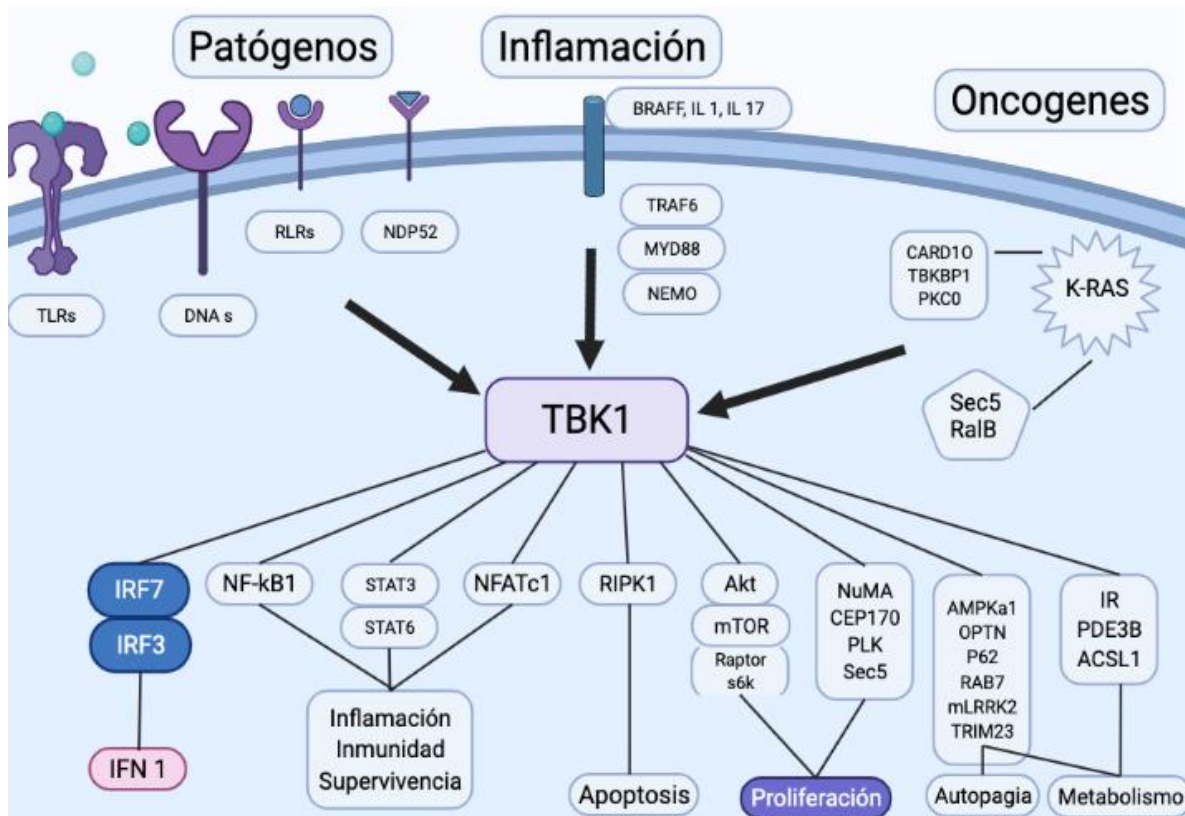


Figura 3. Vía de señalización de TBK1 en cáncer. TBK1 fosforila AKT y mTOR/mTORC1, promoviendo la señalización de la supervivencia y crecimiento celular a través de la señalización RAS, mediante la regulación de AKT/mTOR (Modificado de 38).

La señalización de TBK1 se ha relacionado con varias características distintivas de la progresión tumoral, incluida la evasión de la supresión del crecimiento, la evasión de la destrucción inmunitaria, la inflamación promotora de tumores, la inducción de angiogénesis, la inestabilidad genómica, la resistencia a la apoptosis y la reprogramación del metabolismo energético (4). Diversos estudios sugieren que TBK1 desempeña un papel importante en algunas células mutantes KRAS, promoviendo la proliferación y supervivencia celular (38).

Se ha descrito que TBK1 puede participar en el ciclo celular, esto debido a que su actividad al estar sobrepresada, incrementa la fosforilación de Polo-like kinase (Plk1) la cual es un regulador clave en la división celular. La actividad de Plk1 contribuye a diferentes eventos mitóticos durante la división celular, incluida la

transición G2/M, maduración de centrosomas, formación del huso bipolar, segregación cromosomal y citocinesis (41).

Adicionalmente, TBK1 tiene un papel oncogénico en melanoma (41) y en cáncer pulmonar no asociado a células pequeñas (42). IKK ϵ se ha reportado como un amplificador en el cáncer de mama, donde su expresión es importante para la supervivencia (43). Así mismo IKK ϵ está implicado en el fenotipo oncogénico de glioma, donde participa en la promoción de la supervivencia de las células de glioma a través de la regulación positiva de Bcl-2, en una vía dependiente de NF- κ B (44, 45). Los mecanismos por los que TBK1 se activa en las células tumorales aún no se comprenden completamente.

1.6. Receptores tipo Toll (TLRs)

Una de las principales complicaciones en el tratamiento de glioblastoma, es la capacidad que tiene el tumor de crear un microambiente de inmunosupresión, lo cual le permite evadir la respuesta inmune. Los tumores de GB activan y movilizan el sistema inmunológico innato mediante la activación de receptores, incluidos los receptores tipo Toll (TLR) (46).

Los TLR son receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), pueden detectar patógenos mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o daño celular mediante patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Los TLR son una familia de receptores transmembrana. Hasta la fecha se han identificado 10 en humanos. Contienen motivos extracelulares repetidos ricos en leucina (LRR) y un dominio homólogo del receptor citoplasmático Toll/IL-1 (TIR). Los TLRs (1-10) son moléculas fundamentales para provocar una respuesta inmunitaria en varios tipos de células. Normalmente, los TLRs se agrupan en dos categorías: 1) endosomales (TLR-9, TLR-8, TLR-7 y TLR-3), sensores de ácidos nucleicos y responden a DNA/RNA derivados de patógenos y células muertas. 2) TLR de acción de superficie celular (TLR-10, TLR-6, TLR-5, TLR-4, TLR-2, y TLR-1), los cuales residen en la membrana y responden a ligandos microbianos (47).

Los TLR tienen la capacidad de activar respuestas inmunológicas y se expresan principalmente en células presentadoras de antígeno (macrófagos o células dendríticas); sin embargo, también se expresan en células epiteliales y otros tipos celulares. En el sistema nervioso central se identifican varios tipos de TLRs, expresados en neuronas y estructuras gliales. TLR-4 es detectado principalmente en células microgliales (48).

Los TLR se pueden expresar tanto en células inmunitarias como en células tumorales. Se ha identificado la expresión de TLR-4 en diferentes líneas celulares de glioblastoma (47, 49). TLR-4 es el primer miembro identificado de la familia de TLR expresado en muchos tipos de tumores y la acumulación de evidencias demostró que la activación de TLR-4 en el microambiente tumoral puede no solo estimular la inmunidad antitumoral, sino que también puede dar lugar a una vigilancia inmunitaria y progresión tumoral. La activación de TLR4 ha mostrado asociación con la regulación de la supervivencia celular, proliferación, migración, evasión inmunitaria y resistencia a TNF- α (50).

La expresión proteica y de mRNA de TLR-4 ha sido detectada en las líneas celulares de gliomas U118, U87, A172 y LN229. En tejidos y biopsias primarias de pacientes con gliomas, la expresión de TLR4 fue significativamente mayor en GB, comparado con otros tipos de gliomas (50).

En estudios *in vitro*, en líneas celulares humanas, se ha observado una co-localización significativa de TLR-4 y modificaciones en los activadores de la vía de señalización WNT (51), lo que demuestra su papel eficaz en el crecimiento de GB, que podría representar una posible forma de protección contra el tumor.

La activación de la vía de señalización de TLRs se origina en el dominio citoplasmático TIR, el cual contiene el adaptador intracelular MyD88. La vía de señalización TLR dependiente de MyD88 es común en todos los TLR; sin embargo, solo TLR-3 y TLR-4 presentan una vía de señalización independiente de MyD88 (52) (Figura 4).

Después de la estimulación de TIR, MyD88 recluta al receptor IL-1 asociado a quinasa (IRAK). IRAK es activado por fosforilación y luego asociado a TRAF6, llevando a la activación de dos vías de señalización, para finalmente activar JNK y NF- κ B (52). La vía de señalización de TLR-3 también se puede activar mediante el ligando de dsRNA, que activa una vía independiente de la señalización mediante MyD88, en la cual IRF-3 desempeña un papel central. IRF-3 es asociada con IKKS. IKKS están compuestas por IKK α y IKK β ; ambas quinasas fosforilan en los residuos Ser32 y Ser36 de I κ B α , lo cual induce la activación de NF- κ B. Adicionalmente, existen dos vías no canónicas, TBK1 e IKK ϵ /IKKi, las cuales inducen la fosforilación de IRF-3 (52, 53) (Figura 4).

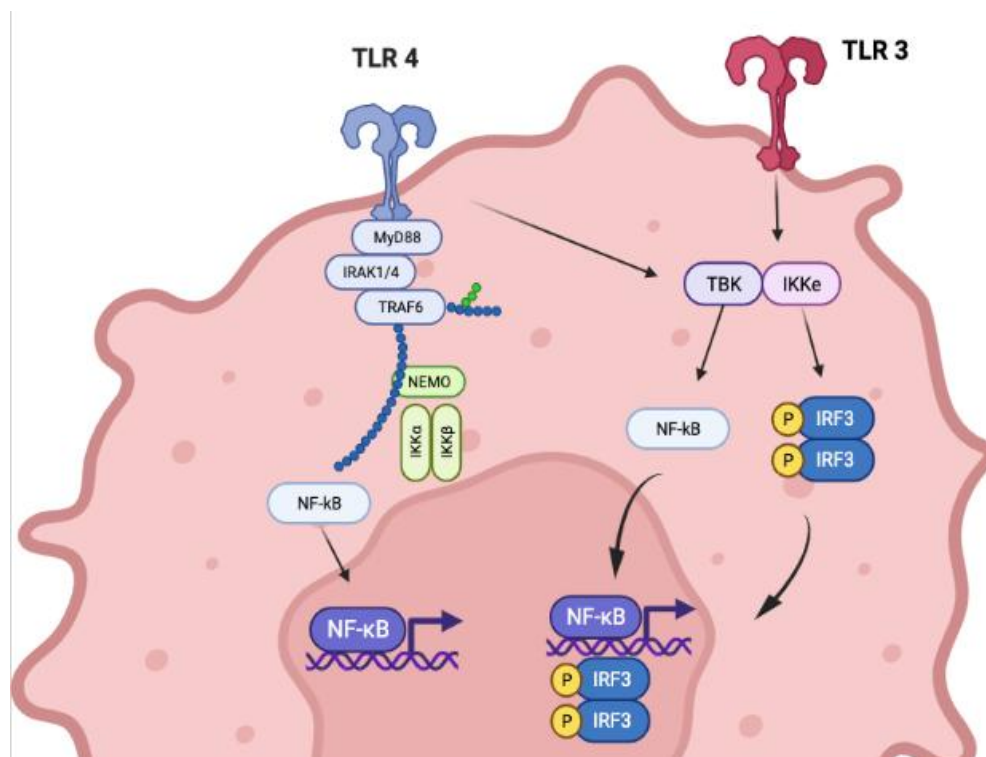


Figura 4. Vía de señalización de TLR3 y TLR4. Vía de activación de citocinas inflamatorias a través de TLR3 y TLR4. MyD88 conduce a la activación de IRF-3 a través de TBK1 e IKK ϵ /IKKi, mediante su activación por el adaptador que contiene el dominio TRIF. (Modificado 48).

Los TLRs son activadores potentes de la respuesta inflamatoria. Su activación puede resultar en la producción de citocinas, quimiocinas e interferones, y del factor de transcripción NF- κ B (54). La vía de señalización de NF- κ B desempeña un papel importante en diversas enfermedades mediante la regulación de la inmunidad, la proliferación y la apoptosis. La familia de NF- κ B cuenta con cinco miembros importantes, c-Rel, p50, p52, p65/RelA y RelA. El factor de transcripción NF- κ B se une al ADN y activa la transcripción génica. Se une a I Kappa B (I κ B) en el citoplasma sin estimulación. Una variedad de estímulos, como ROS y citocinas inflamatorias, activan NF- κ B al degradar el complejo I κ B. NF- κ B se traslada al núcleo y se une al ADN, activando la transcripción. El papel en la carcinogénesis depende de la activación de NF- κ B y la producción de citocinas relacionadas, como IL-1, IL-2, IL-6, IL-10 y TNF- α (55).

Las interleucinas y TNF- α pueden ser reguladas por el factor de transcripción NF- κ B. Esto suprimirá la apoptosis, inducirá la proliferación celular, invasión, metástasis, quimioresistencia e inflamación. Se ha descrito que los TLRs están relacionados en el crecimiento y desarrollo tumoral. Sin embargo, la activación de los TLRs puede tener efectos antitumorales o protumorales en el crecimiento tumoral o metástasis en diferentes tipos de células de cáncer. La promoción de tumores está asociada con la producción de citocinas por parte de células inmunitarias / inflamatorias, que activan los factores de transcripción NF- κ B, STAT3 y AP-1. Estos factores de transcripción regulan la vía de señalización COX-2 / PGE2 (prostaglandina E2) en las células de cáncer e inflamatorias (56, 57).

Así mismo, se ha descrito que Wnt5 activa la vía de señalización de TLR/MyD88/p50 en células de mielo-monocitos, promoviendo un fenotipo resistente, además de la síntesis de la citocina antiinflamatoria IL-10. Del mismo modo, se ha descrito que la síntesis de IL-10 en macrófagos también es mediada por la vía Wnt5a / TLR / MyD88, y conduce a la activación del homodímero NF- κ B-p50. Como resultado de estos mecanismos, Wnt5a desempeña un papel negativo en la función celular inmune, contribuyendo con un microambiente inmunosuprimido y confiriendo una

resistencia a la inmunoterapia. Resulta interesante explorar la relación de otros tipos de Wnts en la activación de TLRs en células de glioblastoma (58).

1.7. Inhibidores farmacológicos

Los avances en tecnología y salud han permitido una mejor comprensión de los fundamentos moleculares y genómicos del glioblastoma. La identificación de las alteraciones genómicas promete expandir la lista de tratamientos terapéuticos. La heterogeneidad intratumoral y la evolución del tumor a lo largo del tiempo, principalmente en respuesta a la terapia, también son cruciales para guiar la selección de nuevas terapias para el tratamiento del glioblastoma (59).

A pesar de los avances en la medicina actual y el surgimiento de terapias dirigidas, solo el bevacizumán, un agente anti angiogénico, ha sido aprobado para el tratamiento del glioblastoma. El incremento de la investigación en inmunoterapia ha abierto nuevas vías de tratamiento para pacientes con GB. Recientemente se han desarrollado fármacos o pequeñas moléculas que actúan como bloqueadores específicamente en la vía de señalización de interés. Se han explorado las terapias dirigidas a EGFR con inhibidores de tirosina quinasa (TKI), EGFR, PI3K/mTOR, BRAF/MEK; sin embargo, en gran medida no se ha logrado demostrar una eficacia significativa (60).

En estudios previos se ha demostrado que el GB es altamente resistente a un solo inhibidor, lo que sugiere que los tratamientos combinados, en los que se incluyen quimioterapia e inhibidores de diferentes vías de señalización, podrían ser un posible tratamiento de GB.

Se han realizado estudios farmacológicos en los que se busca inhibir la actividad de WNT. Se ha reportado que, en células de cáncer de colon, páncreas y mama, la vía de señalización WNT se encuentra sobre regulada. Del mismo modo, se ha demostrado que pamoato de pyrvinio, un inhibidor de la vía de señalización WNT, puede tener una actividad antitumoral contra diferentes tipos de cáncer. XAV939, un inhibidor de Wnt, de tipo enzimático, inhibe la señalización por WNT en una línea

celular de GB. Así mismo, SEN461 disminuyó la viabilidad de las líneas celulares y redujo el volumen de tumor, a través de la inhibición de WNT/ β -catenina (27, 28).

Así mismo, se han identificado una clase moléculas pequeñas que inhiben la producción de proteínas Wnt, denominadas IWPs, por ser inhibidores de la producción de Wnt. Además, se identificó que su diana molecular es Porcupine (Porcn), una proteína de la familia O-aciltransferasa unida a la membrana (MBOAT). Esta aciltransferasa cataliza la palmitoilación de Wnt para permitir su salida a la vía secretora y activación posterior de las respuestas celulares. La inactivación de Porcn captura a Wnt3A en el retículo endoplasmático, y esto conduce a la inhibición de la señalización de Wnt. Las alteraciones en la activación de Porcn comúnmente resultan en trastornos del desarrollo, incluida la hipoplasia dérmica focal, mientras que la hiperactividad de Porcn está asociada con el crecimiento de células cancerosas. Se cree que la inhibición de Porcn puede ser una estrategia efectiva contra algunos tipos de cáncer (61, 62).

Estudios recientes han revelado el posible uso de IWP12 un inhibidor específico de WNT para el tratamiento de varios tipos de cáncer, como adenocarcinoma ductal pancreático y melanoma. Así mismo, se ha descrito el bloqueo de la producción de Wnt vía IWP12 en cáncer de piel, mostrándose un efecto antiinflamatorio y una disminución en la activación de la vía de fibrosis (63). En hepatocarcinoma, se observó una reducción en el crecimiento celular en diferentes cultivos celulares (64, 65).

Por otro lado, debido a que TBK1 desempeña un papel fundamental en la dinámica de los microtúbulos y el proceso de división celular, en células de cáncer de mama y pulmón, se considera un blanco farmacológico atractivo como terapia en contra del cáncer. El bloqueo de TBK1 induce muerte celular en células de cáncer de pulmón. RalB y Sec5A activan TBK1 para inducir el crecimiento y la supervivencia de células cancerosas. Además, a través de la activación de mTOR mediante la fosforilación de AKT y S6K, induce a la supervivencia en células. TBK1 se puede unir a mTORC1 y reduce su actividad para el control de cáncer. Así mismo, TBK1

puede estimular AKT mediante la fosforilación directa en Thr308 y Ser 473 (34). La inhibición de TBK1 reduce la viabilidad celular. BAY-985, un inhibidor de TBK1/IKK ϵ , inhibe la fosforilación de IRF3 e induce la eficacia anti-proliferativa en las líneas celulares de melanoma. Así mismo, DDX19, inhibe TBK1 y la fosforilación de IRF3 mediada por IKK ϵ , sugiriendo que este inhibidor regula la producción de IFN de tipo I (46).

Estudios recientes han revelado el posible uso de BX795, un inhibidor específico de TBK1, para el tratamiento de varios tipos de cáncer, como adenocarcinoma ductal pancreático y melanoma. BX795 se identificó originalmente como un inhibidor de PDK1; sin embargo, inhibe principalmente TBK1 e IKK ϵ , mostrando un efecto antiinflamatorio, y es capaz de suprimir la actividad de IFN3 y reduce la expresión de Bcl-2, Bax y p53, promoviendo el proceso apoptótico en células de GB (66, 67).

2. Planteamiento del problema

El GB es el glioma difuso más agresivo de linaje astrocítico y corresponde al grado IV, según la clasificación de la OMS (46). Es la neoplasia maligna más común del SNC y representa el 45.2% de los tumores primarios malignos del SNC, el 54% de todos los gliomas y el 16% de todos los tumores primarios del SNC (4). El GB es una enfermedad generalmente incurable, con una media de supervivencia de 15 meses (9, 47). El tratamiento es complejo e inicialmente consiste en una extracción quirúrgica, radioterapia y quimioterapia concurrente con temozolomida (TMZ) (48). Además, no se ha demostrado ninguna intervención terapéutica que prolongue la supervivencia de los pacientes (7).

Con base en distintos estudios analizados, se ha observado que la inmunoterapia parece ser la terapia más prometedora para pacientes con glioblastoma, debido a su alta capacidad de evasión inmunológica. La patogénesis de esta enfermedad es compleja, pero en general se ha observado que la desregulación de mecanismos involucrados en la respuesta inmune juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. El factor de transcripción NF- κ B se ha visto involucrado principalmente en mecanismos que permiten a las células tumorales ser mucho más invasivas y metastáticas, aunque también participa en mecanismos que aumentan la proliferación y supervivencia de este tipo de células.

Las vías de señalización WNT y TBK1 son importantes en la regulación de las interacciones intercelulares, ciclo celular y migración a través de su participación directa en la activación de NF- κ B. Las mutaciones o cambios en estas vías están asociadas con el desarrollo de cáncer, por lo que surge las siguientes preguntas de investigación:

¿Qué efectos tienen los cambios en las vías de señalización WNT y TBK1 inducidos por el bloqueo farmacológico y su efecto sobre la activación de NF- κ B, en células de glioblastoma humano?

¿Qué efecto tiene el bloqueo farmacológico en las vías de señalización WNT y TBK1 sobre la viabilidad y ciclo celular, en células de glioblastoma humano?

3. Justificación

Uno de los padecimientos que presenta un elevado índice de mortalidad en la sociedad actual es el glioblastoma, que es una patología que se desencadena debido a múltiples factores genéticos que conllevan a una proliferación descontrolada de células, que originan neoplasias cerebrales.

Los GB comprenden subtipos primarios y secundarios que evolucionan a través de diferentes vías genéticas y afectan a pacientes de diferentes edades, presentándose mayormente después de los 65 años. Los GB primarios (*de novo*) representan el 80% de los GB y ocurren en pacientes mayores (edad media 62 años). Los GB secundarios se desarrollan a partir de un astrocitoma de grado inferior o de oligodendrogliomas y se presentan en pacientes más jóvenes (edad media de 45 años) (4). La tasa de incidencia de GB es 3.19/100,000 habitantes. Esta es la tasa más alta entre los tumores del SNC con comportamiento maligno, seguida de astrocitoma difuso grado 2 (0,56/100.000) y glioma maligno no especificado de otra manera (0.46/100,000) (49). El desarrollo de un tratamiento eficaz para GB continúa siendo un reto para la oncología molecular. Debido a la alta tasa de mortalidad relativa de los pacientes diagnosticados con glioblastoma, se denota la necesidad de explorar posibles blancos terapéuticos alternativos para esta patología.

Debido a esto, es necesario conocer los efectos que el bloqueo farmacológico pueda tener sobre las vías de señalización WNT, TBK1 asociadas con el factor transcripción NF-kB ya que es necesario explorar nuevas vías de tratamientos enfocadas con múltiples direcciones, entre las que se encuentran las vías de señalización asociadas con el desarrollo y proliferación celular, resistencia y un acercamiento inmunológico, para su aplicación terapéutica. Esto permitiría entender mejor el desarrollo del GB y mejorar la estrategia en el manejo clínico y el tratamiento.

4. Hipótesis

Hipótesis alterna:

1. El bloqueo farmacológico de las vías de señalización WNT y TBK1 está relacionado a una menor activación de NF- κ B en células de glioblastoma humano.
2. El bloqueo farmacológico de las vías de señalización WNT y TBK1 está relacionadas a cambios en viabilidad y ciclo celular en células de glioblastoma humano.

Hipótesis nula:

1. El bloqueo farmacológico de las vías de señalización WNT y TBK1 no está relacionado a una menor activación de NF- κ B en células de glioblastoma humano.
2. El bloqueo farmacológico de las vías de señalización WNT y TBK1 no está relacionadas a cambios en viabilidad y ciclo celular en células de glioblastoma humano.

5. Objetivos

General:

Analizar los cambios en la viabilidad y ciclo celular mediante la modificación de la actividad de NF- κ B a través del bloqueo farmacológico de las vías de señalización WTN y TBK1 en las líneas celular de glioblastoma U87MG y A172.

Específicos:

1. Evaluar la viabilidad de líneas celulares de glioblastoma en presencia de inhibidores farmacológicos IWP12 y BX-795 a diferentes tiempos y concentraciones.
2. Evaluar los cambios en la expresión de las moléculas p50 y p65 (activas y no activas) antes y después del tratamiento con los inhibidores IWP12 y BX795
3. Evaluar la viabilidad celular antes y después del tratamiento con IWP12 y BX-795.
4. Analizar los cambios en el ciclo celular antes y después del tratamiento con IWP12 y BX-795.

6. Marco metodológico

Diseño de la investigación

Tipo de estudio: Experimental.

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

Tamaño de la muestra:

Método de muestreo: No probabilístico, aleatorio.

Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios de inclusión:

Cultivos de células de glioblastoma humano A172 y U87MG, con un porcentaje de confluencia superior al 85% y libres de contaminantes.

Criterios exclusión:

Cultivos de células contaminadas.

Cultivos de células con un porcentaje de confluencia <85%.

Variables del estudio

Variables independientes: Bloqueo farmacológico. Tiempo de exposición.

Variables dependientes: viabilidad celular, ciclo celular, expresión de las proteínas p50 y p65.

6.1. Cultivo celular

El cultivo de las células de glioblastoma humano U87MG y A172, se realizó en cajas para cultivo de células adherentes T75 cm². Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂, con medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado al 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 de 2.5×10^5 células por pozo. Posteriormente, fueron tratadas con BX795 (SML0694, Sigma) e IWP12 (22729, Cayman) en las siguientes concentraciones: 0.1, 1, 5 y 10 μ M y disuelto en dimetil sulfoxido (DMSO) (20 mg/ 10 μ M), durante 24, 48 y 72 horas.

6.2 Extracción de proteínas

Una vez finalizado el tiempo de tratamiento celular, se realizó extracción total de proteínas a partir de los cultivos celulares.

La extracción de proteínas totales se llevó a cabo utilizando 60 μ L de buffer de lisis (25mM de Tris-HCL, pH 7.4, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 % de NP-40 y 5% de glicerol). Se empleo Tripsina para despegar las células adheridas a la placa de cultivo y posteriormente se recuperaron. Las muestras se incubaron en hielo durante 45 min, agitando en vortex cada 15 min. Una vez finalizados los 45 min, se centrifugaron a 13,000 rpm durante 25 min, a 4 °C. Al final, se recuperó el sobrenadante.

Se empleo el método de Bradford para la cuantificación de las proteínas. Para la curva estándar, se utilizó albumina bovina (BSA) (2 mg/mL) en concentraciones: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mg/mL. En una placa de 96 pozos, se agregaron 5 μ L de los estándares de albumina por duplicado, dejando los dos primeros pozos como blanco. Se agrego 1 μ L de muestra por duplicado y se utilizó el buffer de lisis como blanco. Finalmente, se agregaron 200 μ L de mezcla Bradford. La absorbancia fue

leída a 590 nm en un espectrofotómetro (Awareness technology, StatFax 4200). Una vez que se obtuvieron los resultados de concentración de proteína de cada muestra, se ajustaron a una concentración de proteínas de 4 µg/mL. Se agregó buffer de carga para completar un volumen de 100 µL. Las muestras se calentaron durante 5 minutos a 95 °C y se congelaron hasta su uso.

6.3. Western blot

Se realizaron ensayos de western blot para determinar los cambios en la expresión de proteínas NF-κB (p50 y p65), implicadas en las vías de señalización WNT y TBK1. El western blot es una técnica utilizada para detectar una proteína específica en una muestra de lisado celular. El primer paso del proceso implica la separación de las proteínas en un gel de poliacrilamida por electroforesis, a un voltaje constante de 100 V. Una vez separadas las proteínas, se transfirieron a una membrana de transferencia de fluoruro de polivinilideno (PVDF), a partir de la cual se pueden detectar las proteínas de interés, al ser incubadas con anticuerpos específicos para cada proteína. La membrana de PVDF se hidrato durante 30 segundos y posteriormente se enjuago con buffer de transferencia (25 nM Tris, 192 nM glicina, 20% metanol) durante 1 minuto. Se colocó en la cámara de transferencia una esponja, dos papeles filtro, el gel de poliacrilamida, membrana PVDF, 2 papeles filtro y al final una esponja, Se transfirió a un voltaje constante de 60 mA, durante toda la noche, a 4°C. Una vez completada la transferencia, se enjuago la membrana con buffer de lavado adicionado con Tween-20 (TBS-Tween) al 0.1%. Las membranas fueron bloqueadas con leche baja en grasa al 5%, disuelta en TBS-Tween (5/100 mL de TBS-T), por una hora, en agitación suave.

Posteriormente, la membrana fue incubada con un anticuerpo primario específico contra las proteínas de interés p50 (MBS8509317, MyBioSource), p50 phospho (FNab10905, FineTest), p65 (MBS1489473, MyBioSource) and p65 phospho (FNab10840, FineTest), en diluciones 1:1000, 1 h a temperatura ambiente o 4°C, en agitación suave toda la noche. Se realizaron 3 lavados, cada uno de 5 minutos, con TBS-Tween. Finalmente, las uniones de anticuerpo-proteína fueron detectadas

mediante el anticuerpo secundario TBST, anti-rabbit (31460, Thermo Scientific). Se realizaron 3 lavados durante 5 minutos con TBS-Tween. La membrana fue revelada mediante la solución de revelado (150 μ L de 3,3-Diaminobencidina (DAB) al 0.5% en PBS 1X y 30 μ L de H₂O₂).

6.6 Ensayos de ciclo celular

Se realizaron ensayos de ciclo celular para cultivos de células de glioblastoma, mediante citometría de flujo y su tinción con yoduro de propidio (IP), para determinar el efecto de la inhibición farmacológica de las vías de señalización WNT y TBK1.

Se cultivaron 0.2×10^6 células U87MG y A172 en placas de cultivo de 6 pozos, durante 24 horas a 37 ° C. Posteriormente, se estimularon los cultivos celulares con IWP12 y BX795 con concentraciones de 0.1, 1, 5 y 10 μ M durante 72, 48 y 24 hrs respectivamente. Se retiró el medio de todos los pozos y se agregaron 100 μ L de medio fresco en cada pozo, con las diluciones de fármacos correspondientes. Una vez finalizado el tiempo de estimulación se empleó tripsina para desprender las células y recogerlas, se recolectaron en tubos de 1.5 mL. Posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 min. El botón celular fue resuspendido en 500 μ L de PBS y centrifugado nuevamente. El botón celular obtenido se resuspendió en 500 μ L de PBS, se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 min, el botón fue resuspendido en 500 μ L de etanol 70% a -20 ° C. Posteriormente se agregaron 1.5 μ L de RNAsa y de 25 μ L IP e incubado durante 30 min a 37 ° C, finalmente fueron leídos al citómetro de flujo BD Accuri C6 y posteriormente analizados.

6.7 Ensayo de viabilidad celular

Se realizaron ensayos de viabilidad celular de las células de glioblastoma, mediante el método de cristal violeta, para determinar el efecto que tiene la inhibición farmacológica de las vías de señalización WNT y TBK1 sobre ellas. La técnica con cristal violeta consiste en detectar la adherencia y viabilidad celular.

El primer paso consiste en preparar una dilución de cristal violeta 0.5% en H₂O₂ y Metanol (cristal violeta 0.25 g, agua destilada 40 mL, metanol 10 mL). Se cultivaron células en placas de cultivo de 96 pozos, durante 24 horas a 37 ° C. Posteriormente, se estimularon los cultivos celulares con IWP12 y BX795 con concentraciones de 0.1, 1, 5 y 10 µM durante 72, 48 y 24 h respectivamente. Se retiró el medio de todos los pozos y se agregaron 100 µL de medio fresco en cada pozo, con las diluciones de fármacos correspondientes. Finalizado el tiempo de incubación se retiró el medio de cultivo y se realizaron lavados con H₂O₂. Se agregaron 50 µL de cristal violeta 0.5% en cada pozo y se incubaron por 20 min a TA. Nuevamente se lavó la placa con agua. Una vez que la placa se encontró seca, se agregaron 200 µL de metanol en cada pozo y se incubaron durante 20 min a TA. Finalmente, se midió la densidad óptica a 570 nm en un lector de placas.

Tabla X. Operacionalización de variables

Variable	Definición Conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala	Análisis estadístico
Ciclo celular	Porcentaje de células en diferentes etapas del ciclo celular.	Cuantificación de células en diferentes fases del ciclo celular, mediante citometría de flujo.	Cuantitativa continua	Porcentaje	ANOVA
Viabilidad celular	Número de células viables en cultivo celular.	Cuantificación de células de glioblastoma en cultivos celulares mediante tinción de cristal violeta.	Cuantitativa continua	Porcentaje	ANOVA
P50	Proteínas implicadas en la vía de señalización NF-kB.	Expresión de la proteína p50 en cultivos celulares de glioblastoma, mediante western blot.	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias	ANOVA
P65	Proteínas implicadas en la vía de señalización NF-kB.	Expresión de la proteína p65 proteínas en cultivos celulares de glioblastoma, mediante western blot.	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias	ANOVA

Análisis estadístico

Para ensayos de ciclo celular, viabilidad celular y expresión proteica, se realizaron análisis estadísticos utilizando la prueba de ANOVA y kruskal-wallis para datos paramétricos y no paramétricos respectivamente. El valor de $p < 0.05$ y $p < 0.01$ fue considerado como estadísticamente significativo para cada prueba.

Implicaciones bioéticas

El siguiente estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México (**CONBIOETICA-15-CEI-002-20210531**). Se elaboro siguiendo los lineamientos de la Ley General de Salud en Materia de Investigación y de la Norma Oficial Mexicana NOM-097-ECOL-SSA1-2002, en manejo de residuos biológicos.

7 Resultados

7.1 Carta de aceptación del artículo

2/3/25, 5:39 PM

Molecular Biology Reports: Decision on your manuscript - Irazú Contreras García - Outlook



Molecular Biology Reports: Decision on your manuscript

From Molecular Biology Reports <ranjith.ayyapan@springernature.com>

Date Mon 1/27/2025 7:04 AM

To Irazú Contreras García <icontrerasg@uaemex.mx>

Ref: Submission ID ec925c46-c7d0-4159-a9b2-bc1de22e3f94

Dear Dr Contreras,

Re: "Advances on the therapeutic potential of cell receptor activation in glioblastoma"

We're delighted to let you know that your manuscript has been accepted for publication in Molecular Biology Reports.

Prior to publication, our production team will check the format of your manuscript to ensure that it conforms to the journal's requirements. They will be in touch shortly to request any necessary changes, or to confirm that none are needed.

Checking the proofs

Once we've prepared your paper for publication, you will receive a proof. At this stage, for the main text, only errors that have been introduced during the production process, or those that directly compromise the scientific integrity of the paper, may be corrected.

As the corresponding (or nominated) author, you are responsible for the accuracy of all content, including spelling of names and current affiliations.

To ensure prompt publication, your proofs should be returned within two working days.

Publication policies

Acceptance of your manuscript is conditional on all authors agreeing to our publication policies at:

<https://www.springernature.com/gp/policies/editorial-policies>

Molecular Biology Reports is a hybrid journal. This means when the journal accepts research for publication, the article may be published using either immediate gold open access or the subscription publishing route. For further information please visit <https://www.springernature.com/gp/open-science/about/green-or-gold-routes-to-oa>

Once again, thank you for choosing Molecular Biology Reports, and we look forward to publishing your article.

Kind regards,

about:blank

1/2

7.2. Resumen artículo publicado

Glioblastoma multiforme is the most common and aggressive malignant brain tumor. Current therapies have been unable to improve life expectancy in patients. This cancer is frequently accompanied by overexpression of receptors, such as EGFR, VEGFR and TLRs, involved in the regulation of inflammation, cell proliferation, differentiation, and survival.


The present review summarizes current knowledge from preclinical and clinical studies investigating the role of pattern recognition and tyrosine kinase receptors in glioblastoma development and evolution, and their possible use to improve treatment outcomes and patient survival.

Cita: Gerson G. Contreras-Chávez, Luis A. Zapi-Colin, José A. Estrada, Irazú Contreras. Mol Biol Rep. 2025;52 (1):207. doi: 10.1007/s11033-025-10312-w.

7.3 Carta de envío del segundo artículo

3/14/25, 10:51 AM

Submission received for Nutritional Neuroscience (Submission ID: 252082407) - Irazú Contreras García - Outlook

 Outlook

Submission received for Nutritional Neuroscience (Submission ID: 252082407)

From YNNS-peerreview@journals.tandf.co.uk <YNNS-peerreview@journals.tandf.co.uk>

Date Fri 3/14/2025 11:50 AM

To Irazú Contreras García <icontrerasg@uaemex.mx>

Dear Irazú Contreras,

Thank you for your submission.

Submission ID	252082407
Manuscript Title	Inhibition of WNT and TK1 induces changes in cell viability and cell cycle in human glioblastoma cells through NF-kB signaling
Journal	Nutritional Neuroscience

If you made the submission, you can check its progress and make any requested revisions on the [Author Portal](#)

Thank you for submitting your work to our journal.
If you have any queries, please get in touch with YNNS-peerreview@journals.tandf.co.uk.

Kind Regards,
Nutritional Neuroscience Editorial Office

Taylor & Francis is a trading name of Informa UK Limited, registered in England under no. 1072954.
Registered office: 5 Howick Place, London, SW1P 1W.

7.4 Resumen del artículo enviado

Inhibition of WNT and TK1 induces changes in cell viability and cell cycle in human glioblastoma cells through NF- κ B signaling

Gerson G. Contreras-Chavez, Luis Á. Zapi-Colin, Valentina Marin-Zuluaga, Ericka Pompa-Mera, José A. Estrada and Irazú Contreras

Glioblastoma multiforme (GBM) is a highly aggressive neoplasm of the central nervous system. Despite constant improvements, current therapies do not improve life expectancy of patients. GBM frequently presents overexpression of specific receptors and activation of signaling pathways involved in regulation of inflammation, proliferation, and cell survival, including WNT and TBK1 signaling pathways. The aim of this study was to evaluate the effect of pharmacological inhibition of WNT and TBK1 with IWP12 and BX795, on cell viability, cell cycle progression and NF- κ B activity. To this end, U87MG and A172 human glioblastoma cell cultures were treated with 0.1-10 μ M concentrations of IWP12 or BX795 for 24-72h. After stimulation, cell viability and cell cycle progression were assessed by spectrophotometry and flow cytometry, respectively. Analysis of NF- κ B p50/p65 in treated cells was performed by western blot. The results show that pharmacological blockade of WNT and TBK1 with IWP12 and BX795, severally, decreases cell viability in U87MG and A172 glioblastoma cells in a dose- and time-dependent manner. Decreased viability corresponded with changes in cell cycle progression and reduced NF- κ B p50/p65 activity. Our results suggest that BX795 treatment affects viability, cell cycle progression, and NF- κ B activity in human glioblastoma cells. Its possible use as a therapeutic adjuvant *in vivo* should be further assessed.

Keywords: Cancer, Glioblastoma, Cell signaling, WNT, TBK1, NF- κ B

8 Discusión general

Efectos del bloqueo de WNT y TBK1 sobre la viabilidad celular.

Nuestros resultados han demostrado que el tratamiento farmacológico con IWP12 y BX795, en las líneas de glioblastoma humano U87MG y A172, produce cambios en la reducción de la viabilidad celular. Si bien observamos una reducción en la viabilidad celular con el tratamiento con IWP12, este no resultó significativo en comparación con el tratamiento con BX795. Actualmente se están probando otros fármacos contra la vía WNT para diferentes tipos de cáncer y se han observado resultados positivos (67). Por otra parte, no se han explorado los efectos de IWP12 sobre el glioblastoma. Futuros estudios son necesarios para conocer el efecto citotóxico de IWP12 en modelos *in vivo*, ya que podría tener un efecto menor en las células normales del huésped.

Se observó una dependencia de la dosis y el tiempo de estimulación en la reducción de la viabilidad, los principales cambios se observaron con la mayor concentración de BX795 10 μ M, y al mayor tiempo de estimulación 72 h, tanto en U87MG como en A172, una reducción de Se observó hasta un 12%, lo que indica el efecto citotóxico que puede tener este fármaco sobre las células de glioblastoma humano. Los efectos de toxicidad de IWP12 y BX795 ya han sido evaluados en otros tipos de cáncer y también se observó una reducción en dos líneas celulares y en células GB primarias de pacientes, lo que muestra un aumento de las proteínas pro-apoptóticas (33-43, 62-67) y una disminución de la expresión de las proteínas pro-apoptóticas (66).

Efectos del bloqueo de WNT y TBK1 en el ciclo celular.

Siguiendo los resultados de la disminución de la viabilidad celular tanto en las líneas celulares U87MG como en A172, también se presentaron cambios en el comportamiento del ciclo celular tanto con el tratamiento con BX795 como con IWP12, durante las primeras horas de estimulación 24-48 h, se observó un aumento

en el porcentaje de células que se encuentran en las fases de ciclo celular S/M/G2, principalmente con las concentraciones de BX795 5 y 10 μ M, mientras que con IWP12 presenta cambios con menores concentraciones durante las primeras horas. En la línea celular A172, estos resultados muestran un comportamiento que parece depender del tiempo. y dosis de estimulación y detención del ciclo celular, observadas en la fase S/M/G2.

Esta respuesta también se ha visto en otros tipos de cáncer bajo tratamiento similar con BX795, en un carcinoma oral de células escamosas humano se observaron cambios en el ciclo celular, presentando una detención celular en la fase M, acompañado de un efecto anti-proliferativo (67). Esto sugiere que existen otras moléculas relacionadas con la disminución de la viabilidad y los cambios en el ciclo celular en las líneas celulares de glioblastoma U87MG y A172.

Efectos del bloqueo de WNT y TBK1 sobre la expresión de p50 y p65

NF- κ B ha sido considerado una piedra angular en el desarrollo de tratamientos para diversos tipos de cáncer, debido a su participación en la expresión de diferentes genes que regulan la respuesta inflamatoria, el ciclo celular, la proliferación, la agresividad y la resistencia al tratamiento oncológico (18-121).

El análisis de Western blot para la expresión de p50 y p65, mostró una reducción principalmente en las formas fosforiladas de p50 y p65, con las concentraciones más altas de BX795 5 y 10 μ M, durante todos los tiempos de tratamiento farmacológico de 24 - 72 h, en ambas líneas celulares. En conjunto, estos datos proporcionan evidencia de que una dosis alta directa de BX795 promueve cambios en la vía NF- κ B en células de glioblastoma humano U87MG.

9 Conclusión

De manera colectiva, nuestros resultados sugieren que los inhibidores IWP12 y BX795 disminuyen la viabilidad celular en las líneas U87MG y A172 de glioblastoma humano, dependiente del tiempo, mientras que los efectos sobre el ciclo celular muestran cambios en el ciclo celular, en el que posiblemente interviene la vía NF- κ B, ya que observamos una reducción en la expresión proteica de p50 y p65 en sus formas activas. Explorar nuevos tratamientos contra el GB, en este caso el uso de fármacos contra vías específicas implicadas en la viabilidad, ciclo celular, proliferación, agresividad, como es el caso del NF- κ B, podría resultar como posible uso terapéutico como adyuvante al tratamiento convencional del glioblastoma.

10 Referencias bibliográficas

1. Pienkowski T, Kowalczyk T, Cysewski D, Kretowski A, Ciborowski M. Glioma and post-translational modifications: A complex relationship. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2023 Nov;1878(6):189009.
2. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2013 Feb 15;19(4):764-772.
3. Klopfenstein Q, Truntzer C, Vincent J, Ghiringhelli F. Cell lines and immune classification of glioblastoma define patient's prognosis. *Br J Cancer*. 2019 Apr;120(8):806-814.
4. 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(Suppl 2):ii1-56.
5. Burgenske DM, Yang J, Decker PA, et al. Molecular profiling of long-term IDH-wildtype glioblastoma survivors. *Neuro Oncol*. 2019;21(11):1458-1469. doi:10.1093/neuonc/noz129.
6. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN; Cancer Genome Atlas Research Network. 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.
7. Le Rhun E, Preusser M, Roth P, Reardon DA, van den Bent M, Wen P, Reifenberger G, Weller M. Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treat Rev*. 2019 Nov;80:101896.
8. Tamimi AF, Juweid M. Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. In: De Vleeschouwer S, editor. *Glioblastoma*. Brisbane (AU): Codon Publications; 2017 Sep 27. Chapter 8.
9. Koshy M, Villano JL, Dolecek TA, Howard A, Mahmood U, Chmura SJ, et al. Improved survival time trends for glioblastoma using the SEER 17 population-based registries. *J Neurooncol*. 2012 Mar;107(1):207-212.
10. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002. 3(11):991-998.
11. Jackson CM, Choi J, Lim M. Mechanisms of immunotherapy resistance: lessons from glioblastoma. *Nat Immunol* (2019) 20(9):1100-1109.
12. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, Cahill DP, Nahed BV, Curry WT, Martuza RL, Louis DN, Rozenblatt-Rosen O, Suva ML, Regev A, Bernstein BE. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* (2014) 344(6190):1396-1401.
13. Broekman, Marika L et al. "Multidimensional communication in the microenvirons of glioblastoma." *Nature reviews. Neurology* vol. 14,8 (2018): 482-495.
14. Daubon T, Hemadou A, Romero G, Saleh M. Glioblastoma immune Landscape and the potential of new immunotherapies. *Front. Immunol*. 2020. 11:585616.
15. DeCordova S, Shastri A, Tsolaki AG, Yasmin H, Klein L, Singh SK, Kishore U. Molecular Heterogeneity, and immunosuppressive Microenvironment in Glioblastoma. *Front. Immunol*. 2020. 11:1402.
16. Gimple, Ryan C et al. "Glioblastoma stem cells: lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer." *Genes & development* vol. 33,11-12 (2019): 591-609.
17. Basseres DS, Baldwin AS. NF- κ B and I κ B kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene*. 2006;25(51):6817-6830.
18. Gray, G. K., McFarland, B. C., Nozell, S. E., & Benveniste, E. N. (2014). NF- κ B and STAT3 in glioblastoma: therapeutic targets coming of age. *Expert review of neurotherapeutics*, 14(11), 1293-1306.
19. Raghava Kurup, R., Oakes, E. K., Vadlamani, P., Nwosu, O., Danthi, P., & Hundley, H. A. (2022). ADAR3 activates NF- κ B signaling and promotes glioblastoma cell resistance to temozolomide. *Scientific reports*, 12(1), 13362.

20. Cahill KE, Morshed RA, Yamini B. Nuclear factor-kappaB in glioblastoma: Insights into regulators and targeted therapy. *Neuro Oncol.* 2016;**18**:329–339.
21. Brat, D. J., Bellail, A. C., & Van Meir, E. G. (2005). The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-oncology*, 7(2), 122–133.
22. Beylerli, O., Sufianova, G., Shumadalova, A., Zhang, D., & Gareev, I. (2022). MicroRNAs-mediated regulation of glucose transporter (GLUT) expression in glioblastoma. *Non-coding RNA research*, 7(4), 205–211.
23. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene.* 2017 Mar;**36**(11):1461-1473.
24. Zuccarini, Mariachiara et al. “The Role of Wnt Signal in Glioblastoma Development and Progression: A Possible New Pharmacological Target for the Therapy of This Tumor.” *Genes* vol. 9,2 105. 17 Feb. 2018,
25. Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell.* 2017 Jun 1;**169**(6):985-999.
26. Thompson MD, Dar MJ, Monga SP. Pegylated interferon alpha targets Wnt signaling by inducing nuclear export of β -catenin. *J Hepatol.* 2011 Mar;**54**(3):506-512.
27. Nie X, Liu H, Liu , Wang YD, Chen WD. Emerging Roles of Wnt Ligands in Human Colorectal Cancer. *Front Oncol.* 2020 Aug 14;**10**:1341.
28. Tang C, Guo J, Chen H, Yao CJ, Zhuang DX, Wang Y, Tang WJ, Ren G, Yao Y, Wu JS, et al. Gene mutation profiling of primary glioblastoma through multiple tumor biopsy guided by 1H-magnetic resonance spectroscopy. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;**8**(5):5327–35.
29. Reya, Tannishtha, and Hans Clevers. “Wnt signalling in stem cells and cancer.” *Nature* vol. 434,7035 (2005): 843-50.
30. Davidson, G., Shen, J., Huang, Y. L., Su, Y., Karaulanov, E., Bartscherer, K., Hassler, C., Stannek, P., Boutros, M., & Niehrs, C. (2009). Cell cycle control of wnt receptor activation. *Developmental cell*, 17(6), 788–799.
31. Koni, Malvina et al. “The Wnt Signalling Pathway: A Tailored Target in Cancer.” *International journal of molecular sciences* vol. 21,20 7697. 18 Oct. 2020,
32. Larabi A, Devos J, Ng S, Nanao M, Round A, Maniatis T, Panne D. crystal structure and mechanism of activation of TANK-binding kinase 1, *Cell rep.* 3 (2013) 734-746.
33. Zhou R, Zhang Q, Xu P. TBK1, a central kinase in innate immune sensing of nucleic acids and beyond. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2020 Jul 10;**52**(7):757-767.
34. Durand JK, Zhang Q, Baldwin AS. Roles for the IKK-Related Kinases TBK1 and IKKepsilon in Cancer. *Cells.* 2018 Sep 15;**7**(9):139.
35. Revach OY, Liu S, Jenkins RW. Targeting TANK-binding kinase 1 (TBK1) in cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2020 Nov;**24**(11):1065-1078.
36. Cai X, Chiu Y.-H. Chen Z.J. The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling. *Mol. Cell* 2014, 54, 289–296.
37. Hsia H.-C. Hutti J.E. Baldwin AS. Cytosolic DNA Promotes Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) Phosphorylation by TANK-binding Kinase 1 (TBK1) to Restrain STAT3 Activity. *J. Biol. Chem.* 2017, 292, 5405–5417.
38. Kim JK, Jung Y, Wang J, et al. TBK1 regulates prostate cancer dormancy through mTOR inhibition. *Neoplasia.* 2013 Sep;**15**(9):1064-1074.
39. Barbie DA. Tamayo P. Boehm JS. Kim SY. Moody SE. Dunn IF. Schinzel AC. Sandy P. Meylan E. Scholl C. et al. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature* 2009, 462, 108–112.
40. Weil, R., Laplantine, E., & Génin, P. (2016). Regulation of TBK1 activity by Optineurin contributes to cell cycle-dependent expression of the interferon pathway. *Cytokine & growth factor reviews*, 29, 23–33.
41. Eskicok B. McMillan E.A. Mendiratta S. Kollipara R.K. Zhang H. Humphries C.G. Wang C. Garcia-Rodriguez J. Ding M. Zaman A. et al. Biomarker Accessible and Chemically Addressable Mechanistic Subtypes of BRAF Melanoma. *Cancer Discov.* 2017, 7, 832–851
42. Cooper JM. Ou Y.-H. McMillan E.A. Vaden R.M. Zaman, A. Bodemann B.O. Makkar G. Posner B.A. White MA. TBK1 Provides Context-Selective Support of the Activated AKT/mTOR Pathway in Lung Cancer. *Cancer Res.* 2017, 77, 5077–5094.

43. Boehm JS, Zhao JJ, Yao J, Kim SY, Firestein R, Dunn IF, Sjostrom SK, Garraway LA, Weremowicz S, Richardson AL, et al. Integrative genomic approaches identify IKBKE as a breast cancer oncogene. *Cell* 2007, 129, 1065–1079.
44. Guan H, Zhang H, Cal J, Wu J, Yuan J, Li J, Huang Z, Li M. IKBKE is over-expressed in glioma and contributes to resistance of glioma cells to apoptosis via activating NF- κ B. *J. Pathol.* 2011, 223, 436–445.
45. Alam, Manzar et al. “A review on the role of TANK-binding kinase 1 signaling in cancer.” *International journal of biological macromolecules* vol. 183 (2021): 2364-2375.
46. Finocchiaro G. TLRgeting Evasion of Immune Pathways in Glioblastoma. *Cell Stem Cell.* 2017 Apr 6;20(4):422-424.
47. Fitzgerald KA, Kagan JC. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell.* 2020 Mar 19;180(6):1044-1066.
48. Lee H, Lee S, Cho IH, Lee SJ. Toll-like receptors: sensor molecules for detecting damage to the nervous system. *Curr Protein Pept Sci.* 2013 Feb;14(1):33-42.
49. Litak J, Grochowski C, Litak J, Osuchowska I, Gosik K, Radzikowska E, Kamieniak P, Rolinski J. TLR-4 Signaling vs. Immune Checkpoints, miRNAs Molecules, Cancer Stem Cells, and Wingless-Signaling Interplay in Glioblastoma Multiforme-Future Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2020 Apr 28;21(9):3114.
50. Rajput S, Volk-Draper LD, Ran S. TLR4 is a novel determinant of the response to paclitaxel in breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2013 Aug;12(8):1676-1687.
51. Casili G, Caffo M, Campolo M, Barresi V, Caruso G, Cardali SM, Lanza M, Mallamace R, Filippone A, Conti A, Germanò A, Cuzzocrea S, Esposito E. TLR-4/Wnt modulation as new therapeutic strategy in the treatment of glioblastomas. *Oncotarget.* 2018 Dec 25;9(101):37564-37580.
52. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol.* 2004 Feb;16(1):3-9.
53. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.* 2003 Aug 1;301(5633):640-3.
54. Louis, David N et al. “The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system.” *Acta neuropathologica* vol. 114,2 (2007): 97-109.
55. Tran, B, and M A Rosenthal. “Survival comparison between glioblastoma multiforme and other incurable cancers.” *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* vol. 17,4 (2010): 417-21.
56. Stupp, Roger et al. “Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma.” *The New England journal of medicine* vol. 352,10 (2005): 987-96.
57. Tamimi, Ahmad Faleh, and Malik Juweid. “Epidemiology and Outcome of Glioblastoma.” *Glioblastoma*, edited by Steven De Vleeschouwer, Codon Publications, 27 September 2017.
58. Lopez-Bergami P, Barbero G. The emerging role of Wnt5a in the promotion of a pro-inflammatory and immunosuppressive tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev.* 2020 Sep;39(3):933-952.
59. Ou A, Yung WKA, Majd N. Molecular Mechanisms of treatment Resistance in Glioblastoma. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 31;22(1):351.
60. Tang X, Zuo C, Fang P, Liu G, Qiu Y, Huang Y, Tang R. Targeting Glioblastoma Stem Cells: A Review on Biomarkers, Signal Pathways and Targeted Therapy. *Front Oncol.* 2021 Jul 8;11:701291.
61. 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.
62. Wang X, Moon J, Dodge ME, Pan X, Zhang L, Hanson JM, Tuladhar R, Ma Z, Shi H, Williams NS, Amatruda JF, Carroll TJ, Lum L, Chen C. The development of highly potent inhibitors for porcupine. *J med Chem.* 2013 Mar 28;56(6):2700-4.
63. Alyoussef A, Taha M. Blocking Wnt as a therapeutic target in mice model of skin cancer. *Arch dermatol Res.* 2019. Oct;311 (8):595-605.
64. Wang, Wenhui et al. “Blocking Wnt Secretion Reduces Growth of Hepatocellular Carcinoma Cell Lines Mostly Independent of β -Catenin Signaling.” *Neoplasia (New York, N. Y.)* vol. 18,12 (2016): 711-723.

65. Scuderi SA, Lanza M, Casili G, Esposito F, Colarossi C, Giuffrida D, Irene P, Cuzzocrea S, Esposito E, Campolo M. TBK1 inhibitor Exerts Antiproliferative Effect on Glioblastoma Multiforme Cells. *Oncol Res.* 2021 Sep 7;28(7):779-790.
66. Latour M, Her NG, Kesari S, Nurmemmedov E. WNT Signaling as a Therapeutic Target for Glioblastoma. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 5;22(16):8428.
67. Bai LY, Chiu CF, Kapuriya NP, Shieh TM, Tsai YC, Wu CY, et al. BX795, a TBK1 inhibitor, exhibits antitumor activity in human oral squamous cell carcinoma through apoptosis induction and mitotic phase arrest. *Eur J Pharmacol.* 2015 Dec;769:287–96.

11 Anexos
Anexo 1:

Gerson Gabriel Contreras Chávez

Tesis Gerson-VI.docx

 Universidad Autónoma del Estado de México

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::3117:426288467

Fecha de entrega

3 feb 2025, 5:20 p.m. GMT-6

Fecha de descarga

9 abr 2025, 9:37 a.m. GMT-6

Nombre de archivo

Tesis Gerson-VI.docx

Tamaño de archivo

1.4 MB


45 Páginas

11.334 Palabras

60.942 Caracteres

 iThenticate Página 1 of 51 - Portada

Identificador de la entrega trn:oid::3117:426288467

 iThenticate Página 2 of 51 - Integrity Overview

Identificador de la entrega trn:oid::3117:426288467




13% Overall Similarity

The combined total of all matches, including overlapping sources, for each database.

Filtered from the Report

- ▶ Bibliography
- ▶ Quoted Text
- ▶ Cited Text
- ▶ Small Matches (less than 10 words)
- ▶ Methods and Materials

Top Sources

- 13%  Internet sources
- 3%  Publications
- 0%  Submitted works (Student Papers)

Integrity Flags

1 Integrity Flag for Review

-  **Replaced Characters**
106 suspect characters on 33 pages
Letters are swapped with similar characters from another alphabet.

Our system's algorithms look deeply at a document for any inconsistencies that would set it apart from a normal submission. If we notice something strange, we flag it for you to review.

A Flag is not necessarily an Indicator of a problem. However, we'd recommend you focus your attention there for further review.