



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INHIBICIÓN DEL RECEPTOR LPA<sub>1</sub> SOBRE EL  
DESARROLLO DE GLIOBLASTOMAS Y LA DETECCIÓN DEL PR-pSER400 Y LA PKC $\alpha$

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA

Q. Sonia Mendoza Cardozo

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Alisha Araceli González Arenas  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Erika Patricia Rendón Huerta

Facultad de Medicina

Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Asesora técnica: Dra. Marisol de la Fuente Granada  
Instituto de Investigaciones Biomédicas



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al posgrado en Ciencias Bioquímicas.

Al PAPIIT por financiar el presente proyecto (No. Proyecto IA201120).

Al CONACyT por la beca otorgada (No. Becario 25550).

Al PAEP, por el apoyo otorgado para el III congreso de Neurobiología de la SMB, realizado en Guanajuato, México, en septiembre del 2019.

A la técnica académica del laboratorio, la Dra. Marisol de la Fuente Granada (Instituto de Investigaciones biomédicas, UNAM, Laboratorio C-138), por sus asesorías para llevar a cabo los procedimientos experimentales.

A mi comité tutor: a la Dra. Erika Patricia Rendón Huerta (Facultad de Medicina, UNAM) y a la Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM), por asesorarme y por las contribuciones al presente proyecto.

Al H. jurado, Dra. Marcela Lizano Soberón (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM), Dr. Marco Antonio Velasco Velázquez (Facultad de Medicina, UNAM), Dr. Luis Enrique Arias Romero (Unidad de Investigación en Biomedicina, FES-Iztacala, UNAM), Dra. Rocío Angeles García Becerra (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM), y al Dr. Ángel Alfonso Zarain Herzberg (Facultad de Medicina, UNAM) por la revisión del trabajo y sus valiosos comentarios.





---

## Dedicatorias

---



A mis padres, por su apoyo incondicional, por motivarme cada día, por su cariño y amor.

A mis amigos, Ana Laura, Ana Cristina, Gabriela, Alejandro y Eduardo, por siempre apoyarme, por las pláticas, los consejos, los buenos momentos que hemos pasado juntos.

A mi asesora, a la Dra. Aliesha A. González Arenas, por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por las asesorías y por su contribución a mi formación académica.

A mis compañeras y amigas de laboratorio: Isa, Ileri, Sandra, Juan, Emely, Denisse, Marisol y Anahí, por ser un gran equipo de laboratorio, por ser siempre tan lindas, y por el apoyo brindado. Agradezco mucho el haber sido parte de un grupo tan lindo, unido y trabajador.



# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>i</b>
<b>1.0 RESUMEN</b> .....	<b>11</b>
<b>2.0 ABSTRACT</b> .....	<b>12</b>
<b>3.0 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>4.0 ANTECEDENTES</b> .....	<b>14</b>
4.1.0 Gliomas .....	14
4.1.1 Glioblastoma multiforme (GBM) .....	14
4.1.2 Subtipos moleculares en glioblastomas .....	19
4.1.3 Nueva clasificación de los glioblastomas (OMS, 2016).....	22
4.2.0 Ácido lisofosfatídico (LPA) .....	23
4.2.1 Síntesis del LPA .....	24
4.2.2 Receptores para el LPA .....	27
4.2.3 Receptor 1 para el ácido lisofosfatídico (LPA <sub>1</sub> ) .....	30
4.2.4 El LPA <sub>1</sub> en glioblastomas .....	32
4.3.0 Las proteínas cinasas C (PKCs) .....	33
4.3.1 Isotipos de las PKCs .....	33
4.3.2 Mecanismo de activación de las proteínas cinasas C clásicas (cPKCs) ..	38
4.3.3 Las PKCs en glioblastomas .....	40
4.3.4 La PKC $\alpha$ en glioblastomas .....	41
4.4.0 El receptor a progesterona (PR) .....	43
4.4.1 Mecanismo de acción del PR.....	43
4.4.2 Fosforilación del PR .....	46



4.4.3 El PR en glioblastomas .....	47
4.5.0 El PR y su relación con la PKC $\alpha$ en glioblastomas .....	48
4.6.0 El LPA <sub>1</sub> y su relación con la PKC $\alpha$ y el PR en glioblastomas.....	49
<b>5.0 JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>50</b>
<b>6.0 OBJETIVOS.....</b>	<b>50</b>
6.1 Objetivo general .....	50
6.2 Objetivos particulares.....	50
<b>7.0 HIPÓTESIS .....</b>	<b>50</b>
<b>8.0 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
8.1 Cultivo celular.....	51
8.2 Inoculación de ratones NSG .....	51
8.3 Tratamiento .....	54
8.4 Obtención del tumor.....	55
8.5 Obtención de cortes del tumor en el criostato .....	56
8.6 Tinción de hematoxilina-eosina (H&E) .....	57
8.7 Determinación de figuras mitóticas .....	58
8.8 Detección de la PKC $\alpha$ y el PR fosforilado en la Ser400.....	58
8.9 Análisis de imágenes .....	60
8.10 Análisis estadístico.....	61
<b>9.0 RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
<b>10.0 DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>74</b>
<b>11.0 CONCLUSIONES.....</b>	<b>84</b>



<b>12.0 INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA .....</b>	<b>85</b>
12.1 Astrocitomas y su clasificación.....	85
12.2 Línea celular U251 .....	86
<b>13.0 ANEXO.....</b>	<b>88</b>
<b>14.0 REFERENCIAS.....</b>	<b>90</b>



## Abreviaturas

<b>AC:</b> Adenil ciclasa	<b>cPKC:</b> Proteína cinasa clásica o convencional
<b>ADN:</b> Ácido desoxirribonucleico	<b>d:</b> Día
<b>ARN:</b> Ácido ribonucleico	<b>Da:</b> Dalton
<b>ARNm:</b> Ácido ribonucleico mensajero	<b>DAG:</b> Diacilglicerol
<b>Akt:</b> También conocida como proteína cinasa B (PKB), es una proteína cinasa serina/treonina	<b>DBD:</b> Dominio de unión a ADN
<b>aPKC:</b> Proteína cinasa atípica	<b>DMSO:</b> Dimetilsulfóxido
<b>atm:</b> Atmósfera	<b>EDGs:</b> Genes de diferenciación endotelial
<b>ATP:</b> Adenosin trifosfato	<b>EGF:</b> Factor de crecimiento epidérmico
<b>ATX:</b> Autoxina	<b>EGFR:</b> Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>Arg:</b> Arginina	<b>EGFRvIII:</b> Receptor del factor de crecimiento epidérmico, variante III
<b>BSA:</b> Albúmina de suero bovino	<b>ENPP2:</b> Miembro de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/ fosfodiesterasa 2
<b>BTM:</b> Maquinaria de transcripción basal	<b>ERK1/2:</b> Proteína cinasa regulada por señal extracelular 1 y 2
<b>BUS:</b> Segmento río arriba del receptor B	<b>FBS:</b> Suero fetal bovino
<b>Cys:</b> Cisteína	<b>FT:</b> Factor de transcripción
<b>cAMP:</b> Adenosil monofosfato cíclico	<b>Gly:</b> Glicina
<b>CD44:</b> Proteína de unión a membrana, es un receptor de ácido hialurónico	<b>GBM:</b> Glioblastoma multiforme
<b>Cdc37:</b> Proteína del ciclo de división celular 37, co-chaperona de HSP90	<b>GBM1:</b> Glioblastoma multiforme primario
<b>CDK1/2:</b> Cinasa dependiente de ciclina 1/2	<b>GBM2:</b> Glioblastoma multiforme secundario
<b>CDKN2A:</b> Inhibidor de cinasa dependiente ciclina 2A	
<b>CK2:</b> Caseína cinasa II	
<b>CO<sub>2</sub>:</b> Dióxido de carbono	





**GBM6:** Células derivadas de pacientes con glioblastoma de subtipo clásico

**GBM12:** Células derivadas de pacientes con glioblastoma de subtipo clásico

**GDP:** Guanosina difosfato

**Gö6976:** Inhibidor de la PKC alfa y beta

**GPCRs:** Receptores acoplados a proteína G

**GSK3 $\beta$ :** Cinasa de la glucógeno sintasa 3 $\beta$

**GTP:** Guanosina trifosfato

**H:** Bisagra (dominio del receptor a progesterona)

**His:** Histidina

**h:** Hora

**HB-EGF:** Factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina

**H&E:** Hematoxilina-Eosina

**HIF-1 $\alpha$ :** Factor inducible por hipoxia 1 alfa

**HPFs:** Campos de alta potencia

**HSP:** Proteínas de choque térmico

**IDH1:** Isocitrato deshidrogenasa 1

**IL:** Interleucina

**IL-2R:** Receptor de la interleucina 2

**IL2rg<sup>null</sup>:** Alelo nulo de la cadena gamma del receptor IL-2

**IM:** Índice mitótico

**IP<sub>3</sub>:** Inositol-1,4,5-trifosfato

**Kg:** Kilogramo

**Ki16425:** Antagonista de LPA<sub>1</sub> y LPA<sub>3</sub>

**Leu:** Leucina

**LBD:** Dominio de unión al ligando

**LPA:** Ácido lisofosfatídico

**LPA<sub>1-6</sub>:** Receptores del ácido lisofosfatídico 1-6

**LPs:** Lisofosfolípidos

**LPAAT:** LPA-Acetiltransferasa

**LPC:** Lisofosfatilcolina

**LPE:** Lisofosfaetanolamina

**LPP1:** Fosfohidrolasa de fosfolípidos 1

**LPS:** Lisofosfatidilserina

**MAPK:** Proteína cinasa activada por mitógeno

**MAG:** Monoacilglicerol

**MEC:** Matriz extracelular

**MET:** Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos o proteína tirosin-cinasa MET

**MEK5:** Proteína cinasa cinasa activada por mitógeno 5

**min:** Minuto

**mL:** Mililitro

**mm:** Milímetro

**$\mu$ L:** Microlitro

**mPRs:** Receptores de progesterona de membrana

**mTOR2:** Complejo 2 del blanco de la rapamicina de células de mamífero



**NEFL:** Polipéptido de ligero de neurofilamento

**NF1:** Neurofibromatosis 1

**NF- $\kappa$ B:** Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

**NK:** Células naturales asesinas

**No EDG:** Familia de diferenciación no endotelial

**NOS:** No especificado de otra manera. (Clasificación del glioblastoma WHO, 2016)

**NSG:** NOD Scid Gamma

**NTD:** Dominio amino terminal

**ODNs:** Oligodesoxinucleótidos antisentido

**OLIG2:** Factor de transcripción de oligodendrocitos

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**Pro:** Prolina

**P2Y:** Receptores purinérgicos

**P4:** Progesterona

**p62:** Proteína de unión a ubiquitina. También conocida como sequestesoma-1

**PA:** Ácido fosfatídico

**PAI-1:** Inhibidor del activador de plasminógeno 1

**PAR-6:** Proteína de partición defectuosa 6

**PB1:** Dominio de unión de Phox/Bem1

**PBS:** Solución amortiguadora fosfato salino

**PC:** Fosfatidilcolina

**PDGFRA:** Receptor A (o alfa) del factor de crecimiento derivado de plaquetas

**PDK-1:** Proteína cinasa 1 dependiente de fosfoinositidos

**Prkdc:** Subunidad catalítica de la proteína cinasa activada por ADN

**PDX:** Xenoinjertos derivados de pacientes

**PE:** Fosfatidiletanolamina

**PFA:** Paraformaldehído

**PHLPP:** Fosfatasas de dominios PH y repeticiones de leucinas

**PIBF:** Factor de bloqueo inducido por progesterona

**PI3K:** Fosfoinositol 3- cinasa

**PI3KR1:** Subunidad 1 reguladora del fosfoinositol-3-cinasa

**PIP<sub>2</sub>:** Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

**PKA:** Proteína cinasa A

**PKC:** Proteína cinasa C

**PKC $\alpha$ :** Proteína cinasa C alfa

**PKG:** Proteína cinasa G

**PLA<sub>1</sub>:** Fosfolipasa A 1

**PLA<sub>2</sub>:** Fosfolipasa A 2

**PLC:** Fosfolipasa C

**PLD:** Fosfolipasa D

**PMA:** Forbol 12- miristato 13- acetato



**PP2A:** Proteína fosfatasa 2 A

**PR-A:** Receptor a progesterona isoforma A

**PR-B:** Receptor a progesterona isoforma B

**PR:** Receptor a progesterona

**PRE:** Elementos de respuesta a progesterona

**PR-pSer400:** Receptor a progesterona fosforilado en el residuo de serina 400

**Pro:** Prolina

**PS:** Fosfatidilserina

**PTEN:** Homólogo de fosfatasa y tensina

**RB:** Retinoblastoma

**ROCK:** Proteína cinasa asociada a rho

**Rho:** Homóloga a ras

**RU486:** Antagonista selectivo del receptor de progesterona, también conocido como mifepristona

**S1P:** Esfingosina-1-fosfato

**S1P<sub>1-5</sub>:** Receptores de esfingosina-1-fosfato 1-5

**SCID:** Síndrome de inmunodeficiencia combinada grave

**Ser:** Serina

**Ser400:** Residuo de serina en el sitio 400

**siARN:** Pequeño ARN interferente

**SNC:** Sistema nervioso central

**SRC-1:** Coactivador de los receptores de las hormonas esteroideas

**SRF:** Factor de respuesta al suero

**TBS:** Solución salina amortiguadora con Tris

**TF:** Factor tisular

**TGF-β:** Factor de crecimiento transformante beta

**Thr:** Treonina

**TNF-α:** Factor de necrosis tumoral alfa

**TP53/P53:** Proteína tumoral 53

**TPA:** 12-O-tetradecanolforbol-13-acetato, éster de forbol. También llamado PMA (forbol-12-miristato-13-acetato).

**TMZ:** Temozolomida

**Val:** Valina

**VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular

**Vzq-1:** Receptor del gen 1 de la zona ventricular



## 1.0 Resumen

El glioblastoma (GBM) es el tumor cerebral más agresivo. El tratamiento estándar consiste en la máxima resección quirúrgica del tumor, radioterapia y quimioterapia con temozolomida (TMZ). El pronóstico para los pacientes con GBM no es prometedor, el tiempo de supervivencia media con tratamiento es de 12.1 a 14.6 meses. Por lo tanto, es necesario encontrar nuevos tratamientos.

La señalización del ácido lisofosfatídico (LPA) está incrementada en los GBMs, particularmente el receptor 1 para el ácido lisofosfatídico (LPA<sub>1</sub>) está sobreexpresado en estos tumores. La activación del LPA<sub>1</sub> en ensayos *in vitro* induce la fosforilación del receptor a progesterona en el residuo de serina 400 (PR-pSer400). Se ha observado que al tiempo donde se detecta mayor fosforilación del PR en las células derivadas de GBM, U251, correlaciona con el tiempo en el que la proteína cinasa C alfa (PKC $\alpha$ ) se transloca al núcleo después de la activación del LPA<sub>1</sub>. Lo anterior, sugiere que el LPA<sub>1</sub> puede inducir la activación de la PKC $\alpha$ , y a su vez, esta enzima es capaz de fosforilar al PR en la Ser400. LPA<sub>1</sub>, PKC $\alpha$  y PR, están involucrados en el desarrollo del GBM, en procesos de proliferación, migración e invasividad celular.

El uso de xenoinjertos de líneas celulares en ratones inmunodeficientes juega un papel importante en el desarrollo de nuevas terapias en contra del desarrollo tumoral. El objetivo de este proyecto fue implementar un xenoinjerto heterotópico usando la línea celular U251, en ratones NSG (NOD-Scid Gamma), para estudiar el efecto de la administración de Ki16425, un antagonista para LPA<sub>1</sub>, sobre i) la localización de la PKC $\alpha$  y la fosforilación del PR en la Ser400, ii) el tamaño del tumor y iii) la proliferación celular.

En el presente trabajo se observó que la administración de Ki16425 cada tercer día durante 13 días, no reduce el tamaño del tumor en nuestro modelo *in vivo*; no obstante, disminuye el número de células en proliferación. Además, inhibe la translocación de la PKC $\alpha$  al núcleo y la fosforilación del PR en la Ser400.



## 2.0 Abstract

Glioblastoma (GBM) is the most aggressive brain tumor. Standard treatment consists of maximal surgical tumor resection, radiotherapy, and chemotherapy with temozolomide (TMZ). The prognosis for GBM patients is not promising, the median survival with treatment is 12.1 to 14.6 months, therefore, it is necessary to find new treatments.

Lysophosphatidic acid (LPA) signaling is increased in GBMs, particularly the lysophosphatidic acid receptor 1 (LPA<sub>1</sub>) is overexpressed in these tumors. LPA<sub>1</sub> activation in *in vitro* assays induces progesterone receptor phosphorylation at the serine 400 residue (PR-pSer400). The highest PR phosphorylation detected in GBM-derived cells, U251, correlates with the time at which protein kinase C alpha (PKC $\alpha$ ) is translocated to the nucleus after LPA<sub>1</sub> activation. This suggests, that LPA<sub>1</sub> induces the activation of PKC $\alpha$ , this enzyme phosphorylates PR on Ser400. LPA<sub>1</sub>, PKC $\alpha$  and PR are involved in GBM development, and in cellular processes such as proliferation, migration, and invasiveness.

The use of cell line xenografts in immunodeficient mice plays an important role in the development and understanding new therapies against cancer. The aim of this project was to implement a heterotopic xenograft using the U251 cell line, in NSG (NOD-Scid Gamma) mice, to study the effect of the administration of Ki16425, an antagonist for LPA<sub>1</sub>, on i) the location of PKC $\alpha$  and phosphorylation of PR on Ser400, ii) the tumor size and iii) cell proliferation.

In this study, we observed that the administration of Ki16425 every third d for 13 d does not reduce the size of the tumor in our *in vivo* model; however, the number of proliferating cells decreases. Furthermore, it inhibits the translocation of PKC $\alpha$  to the nucleus and the phosphorylation of PR on Ser400.



### 3.0 Introducción

El glioblastoma (GBM) es el tumor cerebral más frecuente y agresivo<sup>1-3</sup>, éste se puede originar en cualquier parte del cerebro, sin embargo, se localiza principalmente en la corteza cerebral<sup>4</sup>. Aparecen con mayor frecuencia en adultos entre 45 y 75 años<sup>2</sup>.

Diferentes factores participan en el desarrollo de estos tumores, tal es el caso del ácido lisofosfatídico (LPA)<sup>5-7</sup>. Este lisofosfolípido (LP), a través de sus receptores acoplados a proteínas G<sup>7-12</sup>, induce diversos procesos celulares, tales como: la proliferación<sup>7-14</sup>, la migración<sup>7-9,11,12</sup> y la supervivencia<sup>7,8,10-12</sup>. El LPA es sintetizado principalmente por la enzima autoxina (ATX)<sup>9,15</sup>, la cual se encuentra sobreexpresada en estos tumores<sup>5</sup>, al igual que el receptor 1 para el ácido lisofosfatídico (LPA<sub>1</sub>)<sup>5</sup>.

El LPA<sub>1</sub> estimula la activación de las proteínas cinasas C (PKCs)<sup>16</sup>, éstas cinasas juegan un papel crucial en el desarrollo tumoral de los GBMs<sup>17-20</sup>. El isotipo  $\alpha$  de la PKC exhorta la fosforilación del receptor a progesterona (PR)<sup>21</sup>. Esta fosforilación induce la actividad transcripcional del PR<sup>21</sup> lo que se correlaciona con el incremento en la proliferación celular<sup>21</sup>, la migración<sup>22</sup> y la invasividad<sup>22</sup> de líneas celulares derivadas de GBMs.

En nuestro laboratorio se ha observado, en ensayos *in vitro*, que la activación del receptor LPA<sub>1</sub> induce la translocación de la PKC $\alpha$  al núcleo; aumentando la asociación basal de la enzima con el PR, incrementando así la fosforilación de éste último en el residuo Ser400<sup>16</sup>. El antagonismo del PR<sup>21</sup>, así como el silenciamiento de la PKC $\alpha$ <sup>16</sup>, disminuyen la proliferación celular 30%. Aunque sabemos que la vía LPA<sub>1</sub>/PKC $\alpha$ /PR-pSer400 es importante para regular la proliferación de las líneas celulares derivadas de GBMs, hasta el momento; no se ha estudiado si la inhibición de la actividad del receptor LPA<sub>1</sub> repercute en el crecimiento del tumor; así como en la localización de la PKC $\alpha$  y la fosforilación del PR en la Ser400 en un modelo *in vivo*.

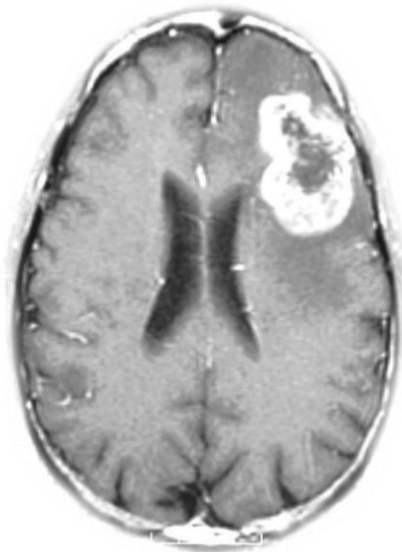


## 4.0 Antecedentes

### 4.1.0 Gliomas

Los gliomas son tumores cerebrales generados a partir de células troncales<sup>23</sup>, progenitores gliales<sup>23,24</sup> o células gliales<sup>23,24</sup>, representan el 25.5% de todos los tumores cerebrales<sup>24</sup> y el 80.8% de los tumores malignos<sup>24</sup>. Los gliomas pueden clasificarse según su célula de origen y la extensión de la infiltración cerebral<sup>23</sup>; incluyen astrocitomas, oligodendrogliomas y ependimomas<sup>23,24</sup>. Siendo los más comunes los astrocitomas, estos últimos representan el 76.4% de todos los gliomas<sup>24</sup>. Los astrocitomas se clasifican en cuatro grados (I-IV), de acuerdo a su malignidad<sup>1,2,25-27</sup> (ver *información suplementaria*).

### 4.1.1 Glioblastoma multiforme (GBM)



**Figura 1.** Glioblastoma multiforme, obtenida por medio de imagenología por resonancia magnética. Modificado de ABTA, Glioblastoma y astrocitoma maligno, 2012.

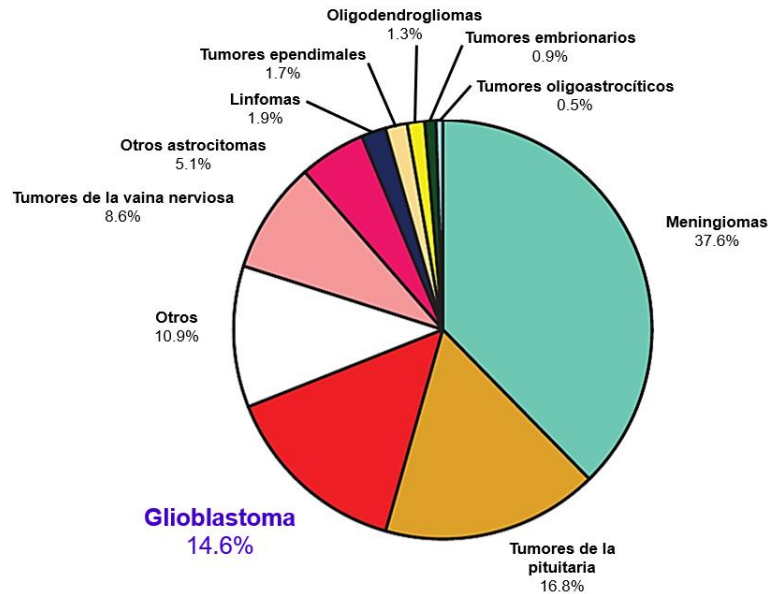
El GBM (ver *figura 1*) es el tumor cerebral más común y letal<sup>1-3,28</sup>. Se denominan multiforme, debido a la heterogeneidad que caracteriza a estos tumores<sup>29</sup>. En el año 2007, la organización mundial de la salud (OMS) publicó la clasificación de tumores del sistema nervioso central (SNC)<sup>1</sup>, donde se menciona que el GBM es el glioma más agresivo del linaje astrocítico, correspondiente al grado IV<sup>1,2,25,26</sup>. Los GBMs representan alrededor del 57.3% de todos los gliomas<sup>24</sup>.

En México hay una incidencia de tumores cerebrales de 3.5 por 100,000 habitantes<sup>30</sup>, el GBM representa el 9% de estos<sup>31</sup>. La edad de diagnóstico del GBM en México, es a los 45.7 ± 15.1 años<sup>30</sup>.

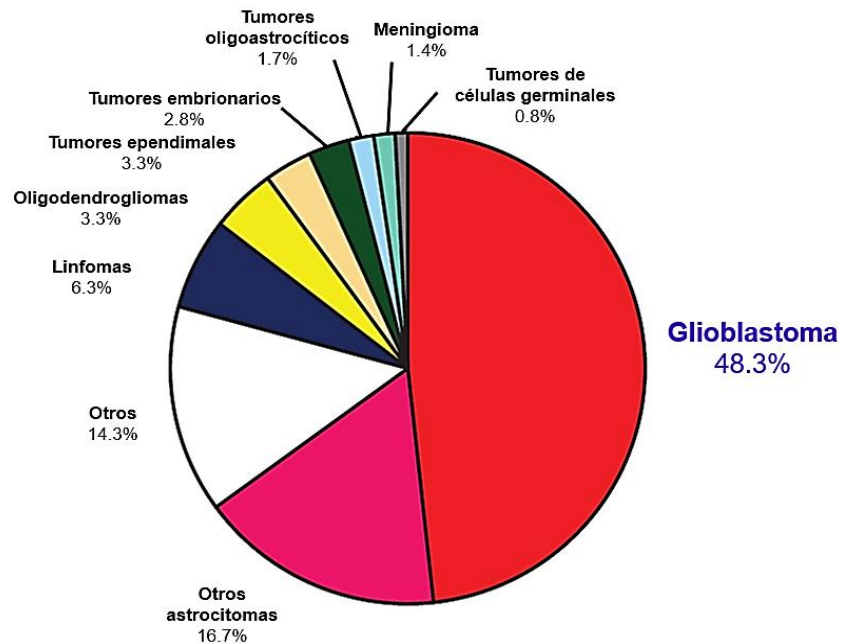


A nivel mundial los GBMs tienen una incidencia de 9.23 por 100,000 habitantes<sup>24</sup>. El GBM es la tercer neoplasia más frecuente del SNC representando el 14.6%<sup>24</sup> (ver figura 2a) y el 48.3% de los tumores malignos del SNC<sup>24</sup> (ver figura 2b).

a)



b)



**Figura 2.** a) Distribución de los tumores del SNC. b) Distribución de tumores malignos primarios del SNC. Modificado de Ostrom Q. T., et al., 2019.





El GBM tiene el mayor número de casos a nivel mundial de todos los tumores malignos del SNC con 13,140 casos proyectados para 2020<sup>24</sup>. Este tumor cerebral es 1.58 veces más común en hombres que en mujeres<sup>24</sup>, y 1.95 veces más común en personas de raza blanca en comparación con los de raza negra<sup>24</sup>.

El tiempo de supervivencia a GBMs es baja, menos de un año<sup>32-34</sup>; siendo el tiempo de supervivencia media de alrededor de 6 meses, sin tratamiento<sup>35,36</sup>. Solo el 6.8% de los pacientes sobreviven 5 años después de su diagnóstico<sup>24</sup>. Los tratamientos contra los GBMs son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia<sup>26,37-39</sup>. El tratamiento estándar consiste en la máxima resección del tumor; seguido de un tratamiento con radioterapia y/o quimioterapia; siendo la temozolomida (TMZ), el agente alquilante comúnmente utilizado<sup>3,32,35,38-40</sup>. Con tratamiento, el tiempo de supervivencia media de los pacientes aumenta a 12.1-14.6 meses<sup>23,32,35,38,39</sup>.

El 46% de los casos de GBM se localizan en el hemisferio derecho, el 46% en el hemisferio izquierdo, y el 8% restante se ubican en ambos hemisferios<sup>30</sup>. El 34% de los casos de GBM se localizan en el lóbulo frontal; seguido del lóbulo temporal con un 24%; el 21% se presentan en el lóbulo parietal; mientras que el 4%, se ubican en el lóbulo occipital; y el 17% restante, se sitúan en el tálamo y en el cuerpo calloso<sup>30</sup>.

Dependiendo de la localización de los tumores, se presentan diversos síntomas<sup>40</sup>. El lóbulo frontal está involucrado en procesos de razonamiento, memoria y motricidad<sup>40</sup>. La visión, la audición y las funciones de comprensión de lenguaje, se relacionan con el lóbulo temporal<sup>40</sup>. El lóbulo parietal se relaciona con la percepción sensorial y la relación espacial<sup>40</sup>. A medida que el tumor crece interfiere con funciones normales del cerebro, siendo los principales síntomas: dolores de cabeza<sup>2,3,30,40,41</sup>, náuseas<sup>2,3,41</sup>, vómito<sup>2,3,41</sup>, convulsiones<sup>30,40,41</sup>, ataques epilépticos<sup>2,3</sup>, cambios de comportamiento<sup>3,40</sup> y de personalidad<sup>3</sup>, déficit motriz<sup>30</sup>, pérdida de movimiento<sup>40</sup>, pérdida de memoria<sup>40</sup>, disfunción del lenguaje<sup>40</sup>, pérdida de la visión<sup>41</sup>, entre otros.



Algunos factores de riesgo para desarrollar GBMs son: los síndromes de Turcot<sup>3,38,40-43</sup> y Li-Fraumeni<sup>3,38,40-44</sup>; el complejo de esclerosis tuberosa<sup>38,40-44</sup>; la neurofibromatosis tipo 1 y 2<sup>3,38,40-45</sup>; así como la exposición a radiación ionizante<sup>38,41,44,46,47</sup>. Se ha reportado que el 26.5% de los pacientes con GBM tienen antecedentes familiares con cáncer<sup>30</sup>. Factores como asma<sup>41,44,48,49</sup>, eczema<sup>41,44,49</sup> y alergias<sup>44,49</sup>, están asociados con la reducción del riesgo de presentar GBM.

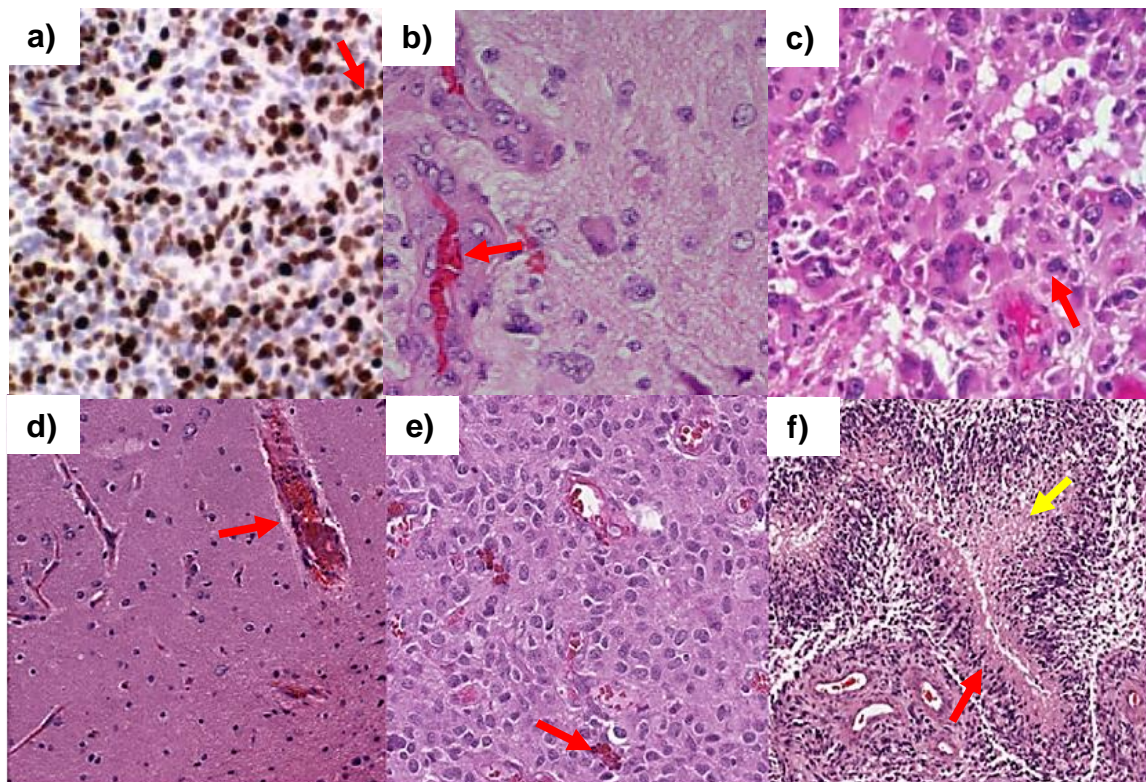
Mediante imágenes de resonancia magnética<sup>2,3,40</sup>, se puede observar que el GBM no tiene bordes delimitados<sup>2</sup>. Cuando se realiza una resección quirúrgica del tumor, se observan zonas necróticas las cuales ocupan un 80% de la masa del tumor, estas regiones son de color amarillo debido a la ruptura de la mielina<sup>2</sup>. La necrosis es una característica del GBM, su presencia es uno de los signos clínicos más agresivos en los astrocitomas difusos<sup>2,3,50</sup>.

Los GBMs presentan características histológicas, tales como: la presencia de células pleomórficas<sup>2</sup>, alta actividad mitótica<sup>2,3</sup>, angiogénesis<sup>2,3,50-53</sup>, trombosis vascular<sup>50,51,54,55</sup>, proliferación microvascular<sup>2,3,54,55</sup> y zonas pseudoempalizadas<sup>2,3,23,26,50-52,55</sup>.

A continuación, se describen con mayor detalle las características histológicas del GBM, anteriormente mencionadas. Los GBMs (ver *figura 3a*) presentan una alta actividad mitótica, se ha reportado que en biopsias de pacientes, el porcentaje de células positivas a Ki-67/MIB-1 es en promedio 15-20%<sup>2</sup>. El GBM es uno de los tumores más vascularizados<sup>2,56</sup>; la vascularización ocurre a través de la angiogénesis (ver *figura 3b*), la cual se define como la formación de vasos sanguíneos a partir de los pre-existentes<sup>2</sup>. La hipoxia es considerada como una de las fuerzas impulsoras de la angiogénesis del GBM, debido a que estimula la secreción factores pro-angiogénicos como VEGF e IL-8<sup>2,50-52</sup>.



Los GBMs, presentan pleomorfismo celular (ver *figura 3c*), el cual se caracteriza por la variación de tamaño y/o forma de las células<sup>2</sup>. Por otra parte, las células de GBM expresan factores procoagulantes<sup>50,51,54</sup>, tales como, el factor tisular (TF)<sup>50,51</sup> y el inhibidor del activador de plasmógenos 1 (PAI-1)<sup>50,51</sup>, los cuales pueden inducir la trombosis vascular<sup>50,51,54</sup>, es decir, la oclusión vascular<sup>50-52</sup> (ver *figura 3c*). Otra característica histológica de los GBMs es la proliferación microvascular, también conocida como hiperplasia vascular<sup>2,50,51</sup> (ver *figura 3d*), está típicamente formada por células endoteliales y perivasculares en múltiples capas<sup>2,50,51</sup>. Una particularidad de los GBMs, es la presencia de zonas pseudoempalizadas (ver *figura 3e*), estas son áreas de células que forman una especie de valla alrededor de una zona necrótica<sup>2,50-52,55,56</sup>. Comparado con el resto del tumor, las células pseudoempalizadas sobreexpresan el factor inducible por hipoxia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )<sup>2,7,50-52,54,55</sup>.



**Figura 3.** Características histológicas que distinguen al GBM (indicadas con flechas rojas). a) alta actividad mitótica (immunohistoquímica para Ki-67/MIB-1), b)



pleomorfismo celular, c) angiogénesis, d) trombosis vascular, e) proliferación microvascular, y f) centro necrótico (indicado con flecha amarilla) rodeado por áreas de alta celularidad, conocidas como zonas pseudoempalizadas (señalado con flecha roja). Las figuras a) y c), fueron de modificada de Louis, D. N. , Ohgaki, H. , Wiestler, O. D., and Cavenee. W. K., 2007; b) fue modificada Dimber A., 2014; y, d), e) y f) fueron modificados de Barker J., et. al, 2016.

Los GBMs pueden desarrollarse a partir de astrocitomas de bajo grado<sup>2,4,23,26,28,38</sup> (grados II o III, según la clasificación de la OMS del 2007<sup>1</sup>), que van sufriendo una transformación anaplásica hasta transformarse en un glioblastoma secundario (GBM2)<sup>2,4,23,26,28,38</sup>, o bien se puede presentar directamente como un glioblastoma primario “de novo” (GBM1)<sup>2,4,23,26,38,57</sup>, que se puede originar de células gliales denominadas astrocitos<sup>23,24</sup>, así como de progenitores gliales<sup>23,24</sup> y de células troncales cancerosas<sup>23</sup>.

Los GBM1s se caracterizan por la amplificación del *EGFR* (34%)<sup>4</sup>, mutaciones en *PTEN* (24%)<sup>4</sup> y pocas de mutaciones en *IDH* (3-7%)<sup>23</sup>, mientras que los GBM2s se caracterizan por la pérdida de *TP53* (65%)<sup>4</sup> y mutaciones en *IDH* (70%)<sup>4</sup>. Aproximadamente del 40% al 50% de los GBMs tienen amplificación del *EGFR*<sup>26</sup>; aunque la amplificación del *EGFR* se ha descrito tanto en GBM1s como en GBM2s, es más común en los GBM1s<sup>26</sup>, estos últimos son más agresivos y menos responsivos al tratamiento comparados con los GBM2s<sup>2,4</sup>.

#### 4.1.2 Subtipos moleculares en glioblastomas

Se han identificado cuatro subtipos de GBM que se han clasificado gracias a las diferentes firmas genéticas que cada uno presenta; los subtipos son: el proneural, el neural, el clásico y el mesenquimal<sup>23,58</sup> (ver figura 4).

El subtipo proneural tiene mutaciones en *IDH1*<sup>4,23,58</sup>, *TP53*<sup>4,23,58</sup>, amplificación de *PDGFRA*<sup>4,23,58</sup>. Tiene activadas las vías de *PI3K*<sup>4,23,58</sup> y *HIF-1α*<sup>23</sup>. Este subtipo expresa marcadores de oligodendrocitos, como *OLIG2*<sup>58,59</sup>. Es más común en



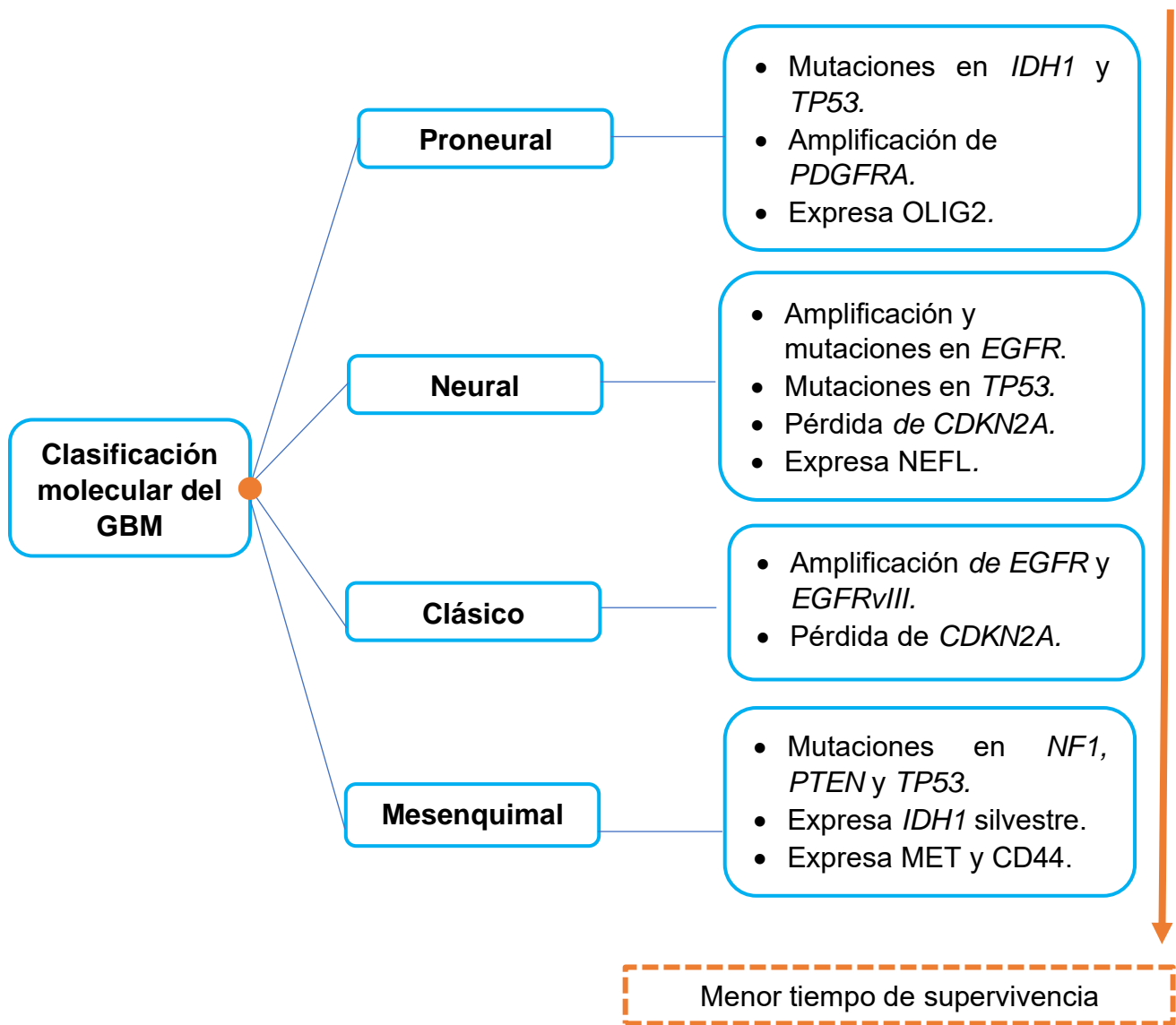
adultos jóvenes, los pacientes que presentan este subtipo tiene un mayor tiempo de supervivencia<sup>4,26,58</sup>.

En el subtipo neural se observa la amplificación y mutaciones en *EGFR*<sup>4,58</sup>, mutaciones en *TP53*<sup>4,58</sup>, en muy pocos casos se presentan mutaciones en *EGFRvIII*<sup>58</sup>, no hay mutaciones en *PDGFRA*<sup>58</sup>. Este subtipo expresa marcadores de neuronas como NEFL<sup>4,23,58,59</sup>.

El subtipo clásico tiene amplificación en *EGFR*<sup>4,23,58,59</sup> y de su variante III (*EGFRvIII*)<sup>4,58</sup>, la pérdida de *CDKN2A*<sup>58</sup>, y no presenta mutaciones en *TP53*<sup>58</sup>, *RB*<sup>58</sup>, ni en *IDH*<sup>58</sup>. Este subtipo se asemeja a astrocitos<sup>4,23,58</sup>.

El subtipo mesenquimal contiene mutaciones en *NF1*<sup>4,23,58,59</sup>, *PTEN*<sup>23,58</sup> y *TP53*<sup>23,58</sup>, baja tasa de mutación para *PI3KR1*<sup>4,58</sup>, no presenta mutación en *IDH*<sup>4,58</sup>, ni en *PDGFRA*<sup>4,58</sup>. Tiene activada la vía de NFκB<sup>4,23,58</sup>. Este subtipo posee marcadores de células mesenquimales como *MET*<sup>4,23,58</sup> y *CD44*<sup>23,58,59</sup>. Es común en adultos mayores, y es el de menor tiempo de supervivencia<sup>4</sup>.





**Figura 4.** Los subtipos moleculares de los GBMs y sus principales características. Modificado de Verhaak R. G., et al., 2010; y Agnihotri S., et al., 2013.



### 4.1.3 Nueva clasificación de los glioblastomas (OMS, 2016)

En 2016, la OMS clasificó a los GBMs en tres categorías, las cuales dependen de la ausencia o presencia de mutaciones en la isocitrato deshidrogenasa (*IDH*)<sup>60,61</sup>.

1. *GBM IDH silvestre* (corresponde ~90% de los casos)<sup>61</sup>: son tumores carentes de las mutaciones en *IDH*<sup>60,61</sup>. Clínicamente son definidos como GBM1s o *de novo*<sup>60,61</sup>. Son predominantes en pacientes de alrededor de los 55 años de edad<sup>60,61</sup>. Estos tumores se caracterizan por: tener una densa celularidad; ser pleomórficos con alta actividad mitótica; y presentar proliferación microvascular y/o necrosis<sup>62</sup>. El pronóstico para los GBMs *IDH silvestre* es pobre, con un tiempo de supervivencia generalmente inferior a dos años<sup>61,62</sup>.
2. *GBM IDH mutado* (corresponde ~10% de los casos)<sup>61,62</sup>: > 90% de las mutaciones de la *IDH*<sup>63</sup>, consisten en el cambio de la arginina por una histidina en la posición 132 (Arg132His)<sup>63</sup>, sin embargo, existen otras variantes como Arg132Cys, Arg132Gly, Arg132Ser, Arg132Leu, Arg132Val, Arg132Pro<sup>63</sup>. Las mutaciones en *IDH* se relaciona con los GBM2s<sup>60,61</sup>, los cuales surgen en pacientes jóvenes<sup>61</sup>. Son histológicamente similares al GBM de tipo *IDH silvestre*, aunque tienen menos probabilidades de contener áreas de necrosis con zona pseudoempalizadas<sup>62</sup>. Tienen un pronóstico más favorable, con un tiempo de supervivencia media aproximadamente dos veces más larga en comparación con los tumores de tipo *IDH silvestre*<sup>44,62</sup>.
3. *GBM NOS*: la designación NOS (por sus siglas en inglés, not otherwise specified)<sup>60-62</sup> implica que no existe suficiente información para asignarlo a una clasificación específica<sup>61</sup>.



## 4.2.0 Ácido lisofosfatídico (LPA)

El LPA (1- o 2-acil-sn-glicerol 3-fosfato)<sup>7,64</sup>, posee una estructura similar al de la esfingosina-1-fosfato (S1P)<sup>8,12</sup>. El LPA es una importante especie de lípidos bioactivos que forma parte de la familia de los lisofosfolípidos (LP)<sup>65</sup>. El LPA es un lípido fisiológico extracelular<sup>12</sup>, que consiste en un grupo glicerol, un fosfato y un ácido graso<sup>7,11,12</sup>, de una masa molecular de 430-480 Da<sup>8,10,11</sup>.

El LPA regula procesos celulares como: la proliferación<sup>7-14</sup>, la diferenciación<sup>9,11,14,15,66</sup>, la migración<sup>7-9,11-14</sup>, la supervivencia<sup>7,8,10-13,15</sup> y la reorganización del citoesqueleto<sup>7,8,10,12,13</sup>. Además, está involucrado en procesos fisiológicos como la curación de heridas<sup>11,14</sup>, la neurogénesis<sup>8,11</sup>, la proliferación de astrocitos<sup>10,13,15,65</sup>, la maduración de oligodendrocitos<sup>8,15</sup>, la mielinización<sup>8,9,15,65</sup>, la formación de sinapsis<sup>8,65</sup>, la vasculogénesis<sup>8,15,65</sup>, la vaso regulación<sup>8,9</sup>, la angiogénesis<sup>7,8,10,12,15</sup>, la implantación del embrión<sup>8,15,65</sup>, el funcionamiento de los ovarios<sup>8</sup>, el mantenimiento del embarazo<sup>8</sup>, la espermatogénesis<sup>8,15</sup>, la regulación de las funciones de las células T<sup>8,67</sup> y de las células dendríticas<sup>8,67</sup>, por mencionar algunos. Se encuentra en: el plasma<sup>8,11,15,64</sup>, el suero<sup>8,12,15,64</sup>, la saliva<sup>8,11,12,15</sup>, las lágrimas<sup>8,15</sup>, el cerebro embrionario<sup>10,15</sup>, las meninges<sup>10,15</sup>, los vasos sanguíneos<sup>10,15</sup>, la médula espinal<sup>10,15</sup>, el fluido cerebroespinal<sup>8,10,11,15</sup> y el líquido folicular<sup>11,12,15</sup>.

Algunos procesos patológicos en los que la señalización del LPA está involucrado son: neuroinflamación<sup>8</sup>, inflamación<sup>8,10,14</sup>, neuropatía<sup>8,10,64</sup>, fibrosis<sup>8-10,14,64</sup>, obesidad<sup>8,10</sup>, esquizofrenia<sup>7,8</sup>, enfermedades cardiovasculares<sup>7,8,10</sup>, desordenes de bipolaridad<sup>7</sup>, Alzheimer<sup>7,65</sup>, hidrocefala<sup>7,9</sup>, isquemia cerebrovascular<sup>7</sup>, infertilidad<sup>8,10</sup>, asma<sup>10</sup>, artritis<sup>9,10</sup>, arteroesclerosis<sup>7,8,10</sup>, y en gran variedad de tipos de cáncer como ovario<sup>8,10,11,14</sup>, pulmón<sup>8,11,13,14</sup>, mama<sup>10-14</sup>, próstata<sup>8,12</sup>, hígado<sup>11,13</sup>, páncreas<sup>11,66</sup>, tiroides<sup>11,12</sup>, colon<sup>10,11,13,14</sup> y GBM<sup>5,7,11,65</sup>. En condiciones fisiológicas las concentraciones del LPA en suero son alrededor de 5  $\mu\text{M}$ <sup>11</sup>, mientras que en

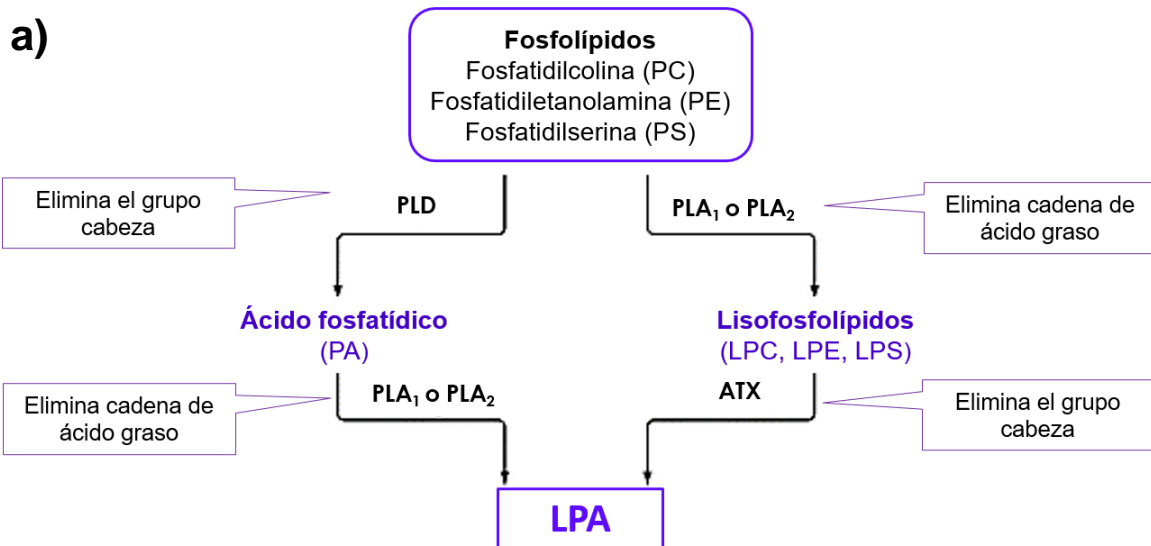


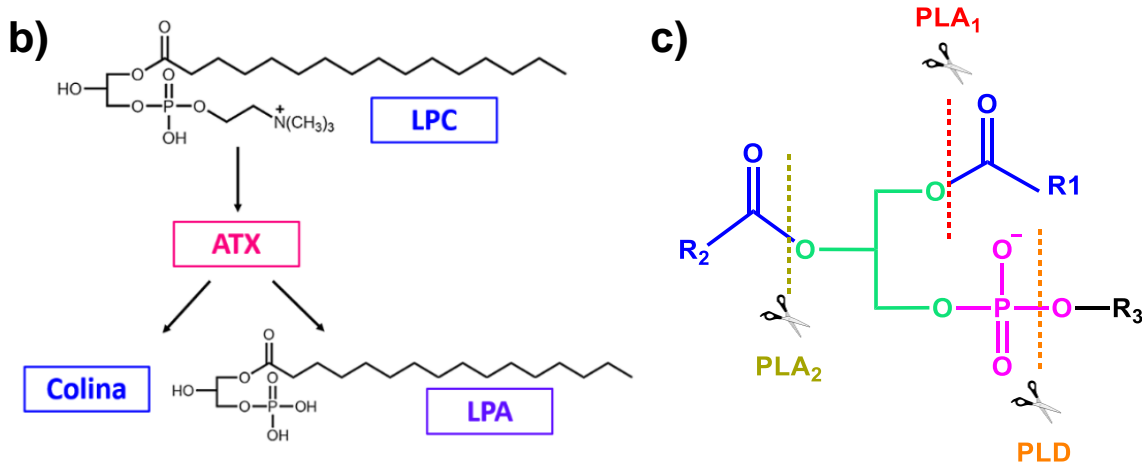


patologías como el cáncer de ovario, la concentración del LPA en el fluido ascítico se eleva a  $80 \mu\text{M}$ <sup>10,12,16</sup>.

### 4.2.1 Síntesis del LPA

El LPA es secretado por plaquetas activadas<sup>7,9,12,15,67-69</sup>, fibroblastos<sup>67,68</sup>, adipocitos<sup>9,15,67,68</sup> y células cancerígenas<sup>7,68</sup>. Es generado principalmente por dos vías enzimáticas (ver *figura 5*). El LPA se puede generar a partir de los fosfolípidos como: PE (fosfatidiletanolamina), PS (fosfatidilserina) y PC (fosfatidilcolina)<sup>10,11,13,15</sup>; los cuales mediante la acción de la fosfolipasa D (PLD) se convierten en ácido fosfatídico (PA); posteriormente, mediante la acción de la fosfolipasa A 1 (PLA<sub>1</sub>) o la fosfolipasa A 2 (PLA<sub>2</sub>) se elimina una cadena de ácido graso<sup>7,8,10,12,13,15,69</sup>. Por otra parte, PLA<sub>1</sub> o PLA<sub>2</sub> convierten a los fosfolípidos de membrana (PS, PE, PC) en lisofosfolípidos (LPS, LPE, LPC)<sup>10,11,13,15,69</sup>; finalmente, la ATX<sup>10,11,13,15</sup>, también conocida como *ENPP2*<sup>8,9,11,65</sup>, elimina el grupo cabeza de la LPC, la LPE, y la LPS<sup>10,11,13,15</sup>; respectivamente, obteniéndose así el LPA<sup>10,11,13,15</sup>. La principal vía de síntesis del LPA, es a través de la acción enzimática de la ATX a partir de la lisofosfatidilcolina (LPC)<sup>9,14,15,65</sup>.

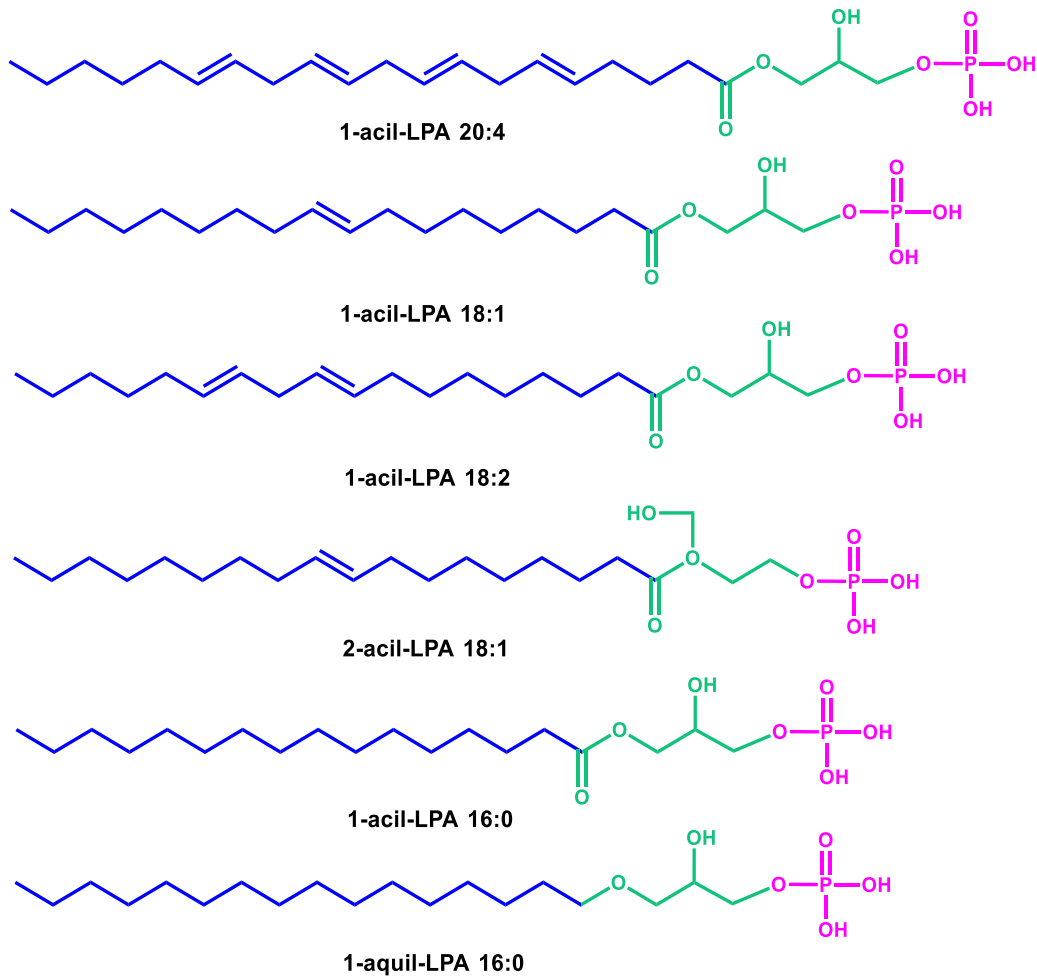




**Figura 5.** a) Las dos vías de síntesis del LPA<sup>8,11,13,15</sup>. b) Formación del LPA a partir de la LPC mediante la acción enzimática de la ATX<sup>9,14,15,65</sup>, c) Sitios hidrolizados por las fosfolipasas PLA<sub>1</sub>, PLA<sub>2</sub> y PLD<sup>69</sup>. Cabe destacar que la ATX presenta una actividad similar a la de PLD<sup>7,8,12,64,68</sup>. La figura a) fue modificada de Choi, J. W. et al., 2010; b) fue modificada de Yung Y. C., et al., 2015; y, c) fue modificada de Aoki J., 2006.

Debido a que el LPA se deriva de diversos fosfolípidos con diferentes longitudes y saturaciones, existen diversas especies del LPA<sup>8,11,13</sup>, las más abundantes en plasma son 18:2 > 18:1 ≥ 18:0 > 16:0 > 20:4 con un grupo acilo<sup>11</sup> (ver figura 6). La especie 1-acil-LPA 18:2 es la especie más abundante<sup>11</sup>, sin embargo, 1-acil-LPA 18:1 es la especie comúnmente utilizada en los laboratorios para la activación de los receptores del LPA<sup>8,11</sup>.





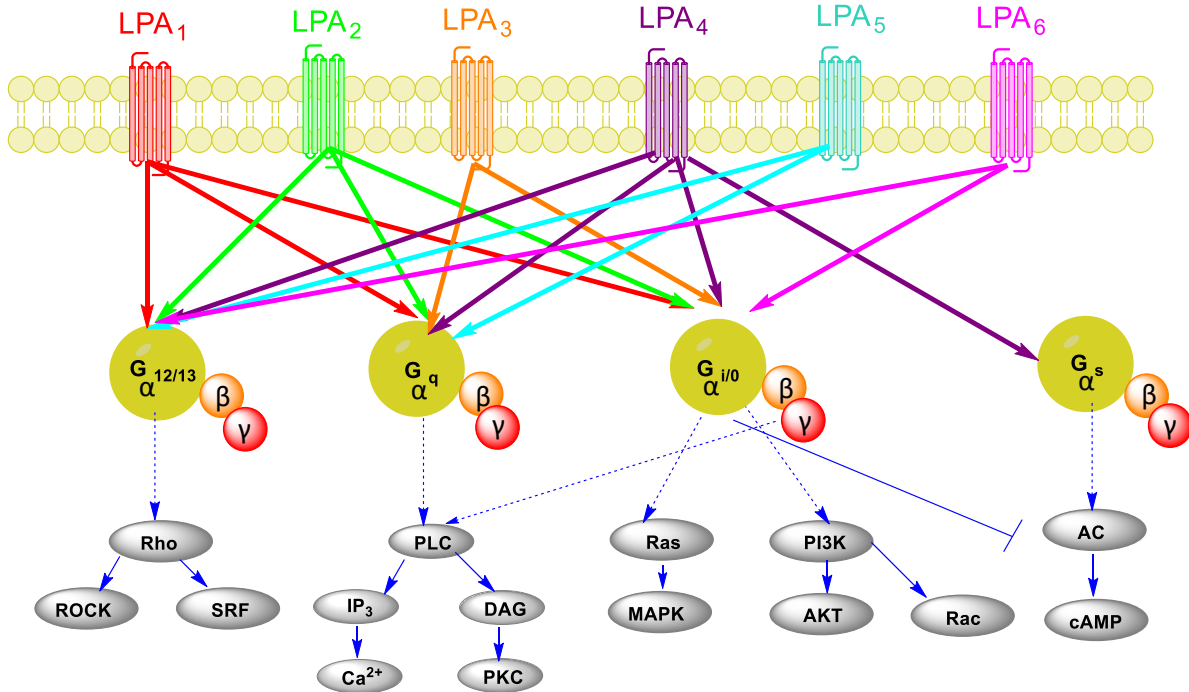
**Figura 6.** *Especies del LPA. La formación de las especies del LPA, depende del fosfolípido precursor, el cual puede variar en la longitud, saturaciones e insaturaciones de la cadena, la presencia de cadenas acílicas o alquílicas, así como las posiciones de estas (sn-1, sn-2)<sup>10,11,65</sup>. Modificado de Choi K. W., et al., 2010; Riaz A., et al., 2016; y Valdés-Rives S. A. & González-Arenas A., 2017.*

El LPA en ratones tiene un tiempo de vida media corta, de alrededor de 3 min en la circulación sanguínea<sup>70,71</sup>. El LPA se puede metabolizar por tres vías diferentes: 1) mediante la acción de la fosfolipasa de fosfolípidos tipo 1 (LPP1) se genera monoacilglicerol (MAG)<sup>10-12,15,65</sup>; 2) por acción de la LPA-aciltransferasa (LPAAT), transfiere una cadena acílica al LPA convirtiéndolo en un ácido fosfatídico<sup>10,11</sup>; o 3) por acción de las fosfolipasas, el LPA se convierte en glicerol-3-fosfato<sup>10</sup>.



## 4.2.2 Receptores para el LPA

El LPA señala a través de seis receptores ( $LPA_1$ - $LPA_6$ ) acoplados a distintas proteínas  $G$ <sup>7-13,65,72</sup>, los cuales influyen en múltiples procesos celulares incluyendo la proliferación<sup>7-14</sup>, la supervivencia<sup>7,8,10-13</sup>, la apoptosis<sup>12,13,65</sup>, la reorganización del citoesqueleto<sup>7,8,10,12,13</sup> y la migración<sup>7-9,11-14</sup> (ver figura 7). Todos los receptores son de siete dominios transmembranales<sup>8,10,72</sup>, cada uno puede iniciar cascadas de señalización mediante la activación de las proteínas  $G_i$ ,  $G_q$ ,  $G_{12/13}$  y  $G_s$ <sup>7-13,15,65,72</sup>.  $LPA_1$ - $LPA_6$ , están codificados por distintos genes siendo  $LPAR_1$ - $LPAR_6$  los codificados en humanos, mientras que en ratones son  $Lpar_1$ - $Lpar_6$ <sup>8,13,65,72,73</sup>.



**Figura 7.** El LPA señala a través de seis receptores ( $LPA_{1-6}$ ) acoplados a diferentes proteínas  $G$  ( $G_{12/13}$ ,  $G_q$ ,  $G_i$ , y  $G_s$ )<sup>7-13,15,65,72</sup>. Las proteínas  $G$  están compuesta por 3 subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ; cuando las proteínas  $G$  están inactivas se encuentra unidas a  $GDP$ , cuando se activan hay un intercambio de  $GDP$  por  $GTP$ , en seguida la subunidad  $\alpha$  se disocia de las subunidades  $\beta\gamma$ <sup>74-76</sup>.  $LPA_1$  y  $LPA_2$  se acoplan a  $G_{12/13}$ ,  $G_q$  y  $G_i$ , respectivamente<sup>8,10,11,13,15,72</sup>. Mientras que  $LPA_3$  se acopla



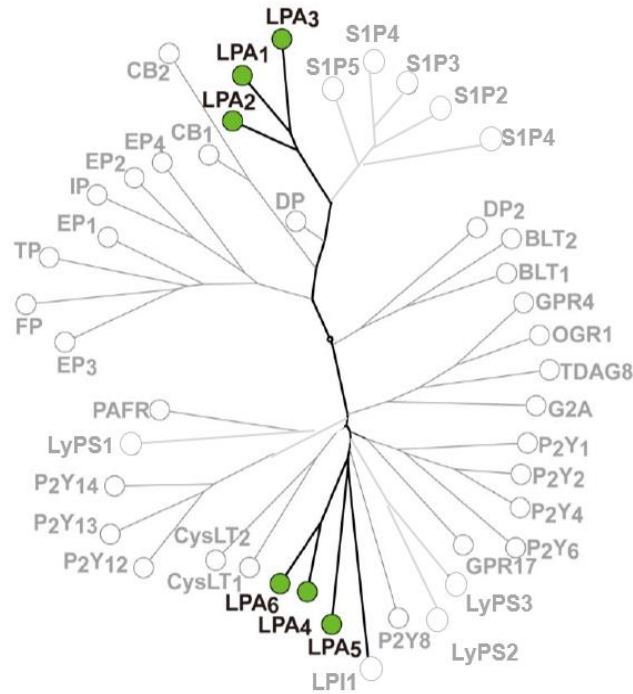
a  $G_q$  y  $G_i$ ,  $LPA_4$  se une a  $G_{12/13}$ ,  $G_q$ ,  $G_i$ , y  $G_s$ ; y  $LPA_5$  se une a  $G_{12/13}$ ,  $G_q$ <sup>8,10,11,13,15,72</sup>.  $LPA_6$  se acopla a  $G_{12/13}$  y  $G_i$ <sup>8,10,11,13,15,72</sup>.  $G_{12/13}$  activa a  $Rho$  involucrado en la reorganización del citoesqueleto<sup>8,10,11,13,15,72</sup>.  $G_q$  está involucrada en la movilización de  $Ca^{2+}$  y activación de la  $PKC$ <sup>8,10,11,13,15,72</sup>;  $G_i$  activa las vías de  $PI3K/AKT$  y  $MAPK$ , involucradas en supervivencia y proliferación celular<sup>8,10,11,13,15,72</sup>;  $G_s$  aumenta la concentración intracelular de  $cAMP$ <sup>8,10,11,13,15,72</sup>. Modificado de Valdés-Rives S. A. & González-Arenas A., 2017.

De acuerdo a la homología de los receptores de LPA ( $LPA_{1-6}$ ), se clasifican en dos familias, la familia del gen de diferenciación endotelial (EDG) y la familia no EDG<sup>7,8,10,11,13,66,77</sup>.  $LPA_1$ ,  $LPA_2$  y  $LPA_3$  son miembros de la familia EDG, también denominados como “clásicos”, estos tienen una homología entre si del 50-57%<sup>7,8,10,11,13,66,77</sup>. Filogenéticamente, se encuentran localizados cerca de los receptores de esfingosina-1-fosfato ( $S1P_{1-5}$ )<sup>72</sup> (ver figura 8).

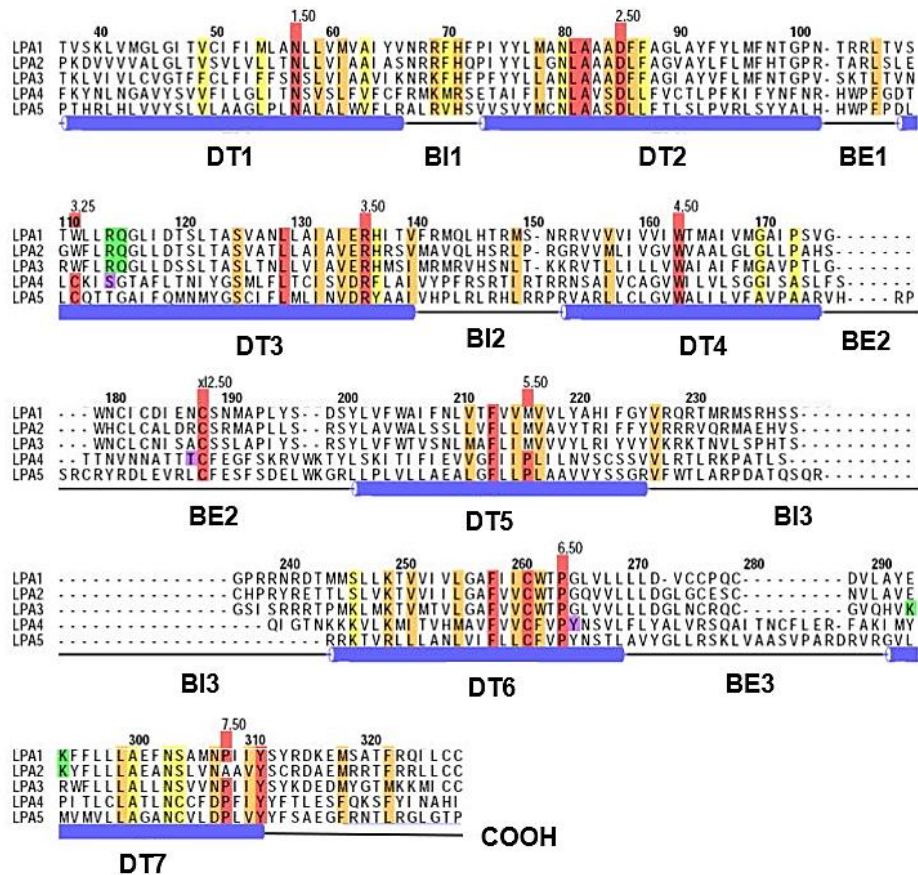
Por otra parte, los receptores  $LPA_4$ ,  $LPA_5$  y  $LPA_6$  conforman a la familia no EDG, los cuales poseen una estructura similar a la familia de receptores purinérgicos ( $P2Y$ )<sup>7,8,11,13,72,77</sup>; sin embargo, no se activan por nucleótidos o nucleósidos, sino por  $LPA$ <sup>8,10</sup>. Los receptores de la familia no EDG comparten un 33-55% de identidad<sup>8,10,11,13,72,77</sup>. Los receptores  $LPA_{1-3}$  tienen una homología de 20-24% con los receptores  $LPA_{4-5}$ <sup>10,11</sup>, debido a que estos últimos se encuentran filogenéticamente más alejados de  $LPA_{1-3}$  y se localizan más cerca de los  $P2Y$ <sup>72</sup> (ver figura 8).



a)



b)



**Figura 8.** a) Árbol filogenético de los GPCRs de los humanos. b) Alineación y similitud de las secuencias de aminoácidos de LPA<sub>1-5</sub><sup>78</sup>. Los bloques rojos denotan



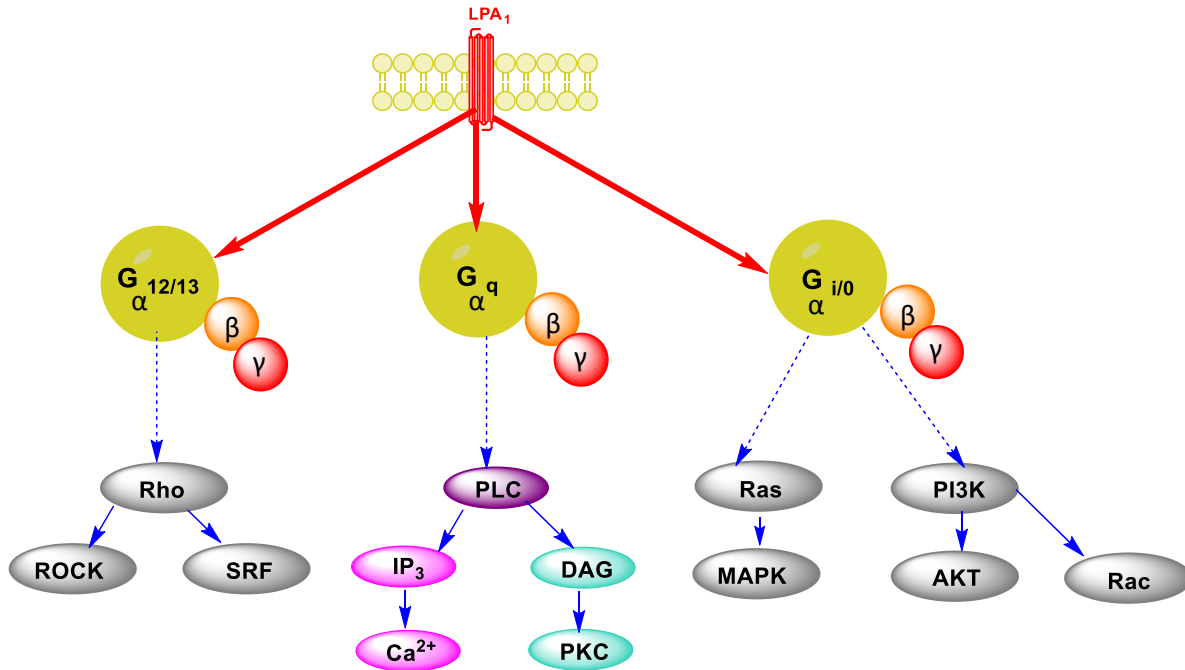
identidad entre las secuencias, los naranjas indican una fuerte similitud, y los amarillos señalan una similitud débil<sup>78</sup>. La numeración de aminoácidos corresponde a la secuencia de LPA<sub>4</sub>. Los bloques verdes y morados indican a los residuos que son críticos para la unión de LPA a LPA<sub>1-3</sub> y LPA<sub>4</sub>, respectivamente<sup>78</sup>. DT: dominio transmembranal; BI: bucle intercelular; BE: bucle extracelular. La figura a) fue modificada de Kihara Y., et al., 2014; y la b) fue modificada de Li. G., et al., 2009.

Los receptores del LPA difieren en su distribución en los distintos tejidos, las vías de señalización con las que se relacionan río abajo y por las especies del LPA que los activan preferentemente<sup>8</sup>. La especie 1-acil-LPA 18:1 activa preferentemente al LPA<sub>1</sub> y LPA<sub>2</sub><sup>10,11</sup>, mientras que la especie 2-acil-LPA 18:1 tiene mayor afinidad por el LPA<sub>3</sub><sup>11,77,79</sup> y LPA<sub>6</sub><sup>10,11,77</sup>. LPA<sub>4</sub> es activada por 1-alquil-LPA18:1<sup>10</sup>. Por otra parte, el LPA<sub>5</sub> prefiere a 1-alquil-LPA 16:0<sup>11,77</sup>.

#### 4.2.3 Receptor 1 para el ácido lisofosfatídico (LPA<sub>1</sub>)

En 1996, se identificó el primer receptor para el LPA, el LPA<sub>1</sub><sup>80</sup>, también conocido como EDG-2 o Vzg-1 (receptor del gen 1 de la zona ventricular)<sup>9,11,13</sup>. El LPA<sub>1</sub> es una proteína de 41kDa<sup>10,11,13,72</sup>, conformada por 364 aminoácidos<sup>8,10,11,72</sup>, este receptor se acopla con tres tipos de proteínas G: G<sub>12/13</sub>, G<sub>q</sub> y G<sub>i</sub><sup>8,10,11,13,15,65,72</sup>, induciendo la activación de las vías: Rho, PLC, MAPK y Akt<sup>8,10,11,13,15,65,72</sup>; las cuales están involucradas en procesos como los cambios del citoesqueleto<sup>8,10,13,15</sup>, la movilización de calcio<sup>8,10,11,13,72</sup>; la migración<sup>8,10,11,13,15,72</sup>, la proliferación<sup>8,10,11,13,15,72</sup> y la supervivencia<sup>8,10,13,72</sup> celular (ver figura 9).





**Figura 9.** LPA<sub>1</sub> se acopla a tres diferentes proteínas G, G<sub>12/13</sub>, G<sub>q</sub> y G<sub>i</sub>, para iniciar cascadas de señalización<sup>8,10,11,13,15,65,72</sup>. Modificado de Valdés-Rives S. A. & González-Arenas A., 2017.

En humanos, el LPA<sub>1</sub> se encuentra expresado en el cerebro<sup>8,10,11,13</sup>, el corazón<sup>8,10,11,13</sup>, los pulmones<sup>8,10,11,13</sup>, el estómago<sup>8,10,11,13</sup>, el intestino delgado<sup>8,10,11,13</sup>, el músculo esquelético<sup>8,10,11,13</sup>, la placenta<sup>8,10,13</sup>, los riñones<sup>8,10,11,13</sup>, la próstata<sup>8,10,11,13</sup>, los ovarios<sup>8,10,11,13</sup>, el bazo<sup>8,10,11,13</sup> y los testículos<sup>8,10,11,13</sup>. Durante el desarrollo, el LPA<sub>1</sub> se encuentra en la zona ventricular<sup>8,10-12,15,65,80</sup> y las meninges<sup>8,10,11,65,80</sup>, después del nacimiento, la expresión del LPA<sub>1</sub> se reduce en las áreas anteriormente mencionadas, y continúa en los oligodendrocitos<sup>8,10-12,64,65,72</sup>, las células de Schwann<sup>8,12,64,65,72</sup>, la microglía<sup>64,65</sup> y los astrocitos<sup>11,64,65,72</sup>.

Algunas funciones biológicas en las que está involucrado el LPA<sub>1</sub> son: la proliferación, la diferenciación y la migración de células neurales<sup>13</sup>; la proliferación de astrocitos<sup>10,13,15,65</sup>, la maduración de oligodendrocitos<sup>15,64,65</sup>, la mielinización<sup>15,65,72</sup>, la supervivencia de células de Schwann<sup>8,10,15,64,65,72</sup>, el funcionamiento y la formación de la corteza cerebral<sup>10,11,65,72</sup>; el neurodesarrollo<sup>10,13</sup>,





la activación de plaquetas<sup>8</sup>, la vaso regulación<sup>8</sup>, la activación y la supervivencia de células T<sup>8</sup>; entre otros. Se ha asociado a la sobreexpresión del LPA<sub>1</sub> con diferentes tipos de cáncer como mama<sup>8,10,11</sup>, ovario<sup>8,10,11</sup>, colon<sup>11</sup>, próstata<sup>81,82</sup>, páncreas<sup>11,66</sup>, GBM<sup>5-7,11</sup> y carcinoma de células renales<sup>11,83</sup>.

#### 4.2.4 El LPA<sub>1</sub> en glioblastomas

La señalización del LPA puede ser relevante para la investigación relacionada con cáncer, debido a que a través de sus receptores promueve el crecimiento tumoral<sup>7,11,12</sup>, la inflamación crónica<sup>7,11,12</sup>, la neovascularización<sup>7,12</sup>, y la metástasis<sup>7,11,12</sup>.

Kishi Y., y colaboradores determinaron la expresión de la ATX y la de los receptores para el LPA en muestras de tumores de cerebro derivados de pacientes, encontraron que el LPA<sub>1</sub> y la ATX se encuentran sobreexpresadas en los GBMs<sup>5</sup>. Adicionalmente, observaron que un paciente que inicialmente fue diagnosticado con un astrocitoma de grado II, y posteriormente, este tumor progresó a un GBM, tuvo un incremento significativo en la expresión del LPA<sub>1</sub><sup>5</sup>. Se ha reportado que el LPA a través de LPA<sub>1</sub>, induce la migración<sup>5,84</sup> y proliferación<sup>16,84</sup> de células derivadas de GBMs; mientras, que la ATX induce procesos de migración<sup>5,85</sup> e invasión<sup>85-87</sup> en líneas celulares derivadas de GBMs; y angiogénesis<sup>85</sup> en GBMs.

En 2018, Loskutov Y. V. y colaboradores realizaron un experimento *in vivo* con ratones inmunodeficientes (NSG), estos fueron inoculados en sus flancos derechos con células tumorales derivadas de pacientes con GBM (GBM6 o GBM12); posteriormente, monitorearon el crecimiento del tumor, cuando los tumores alcanzaron los 100 mm<sup>3</sup>, comenzaron a administrar vía intraperitoneal 30 mg/Kg de Ki16425 (antagonista de LPA<sub>1</sub>) diariamente durante 4 a 5 semanas<sup>6</sup>. Observaron que a partir de la segunda semana de administración de Ki16425, el tamaño de tumor comenzaba a disminuir<sup>6</sup>. Al final del tratamiento encontraron, que la masa y el volumen del tumor, así como el porcentaje de células en proliferación de los



tumores del grupo de los ratones tratados con Ki16425, disminuyen dos veces en comparación con el vehículo<sup>6</sup>. En 2020, se reportó que una alta expresión del LPA<sub>1</sub> correlaciona con un menor tiempo de supervivencia en pacientes con GBM<sup>84</sup>. Lo anterior, sugiere la participación del LPA<sub>1</sub> en la progresión de los GBMs.

### 4.3.0 Las proteínas cinasas C (PKCs)

Las PKCs pertenecen a la familia de cinasas AGC (PKA, PKG, PKC)<sup>17,88-92</sup>, estas fosforilan a diversas proteínas en residuos de serina y treonina<sup>17,89,92-97</sup>. Las PKCs participan en numerosas funciones celulares como la diferenciación<sup>89,91,92</sup>, la supervivencia<sup>17,89</sup>, la proliferación<sup>17,21,89,91,92,97</sup>, la migración<sup>17,22,91</sup>, la apoptosis<sup>89,91,92,97</sup>, la progresión del ciclo celular<sup>89</sup>, entre otros. La desregulación de las PKCs se asocia con diferentes patologías como diabetes<sup>89,98</sup>, Alzheimer<sup>89,95</sup>, Parkinson<sup>89</sup>, alergias<sup>89</sup>, cambios en el estado de ánimo<sup>98</sup>, cáncer<sup>89,90,92,97-99</sup>, así como enfermedades autoinmunes<sup>89</sup> y cardíacas<sup>89,92,98</sup>.

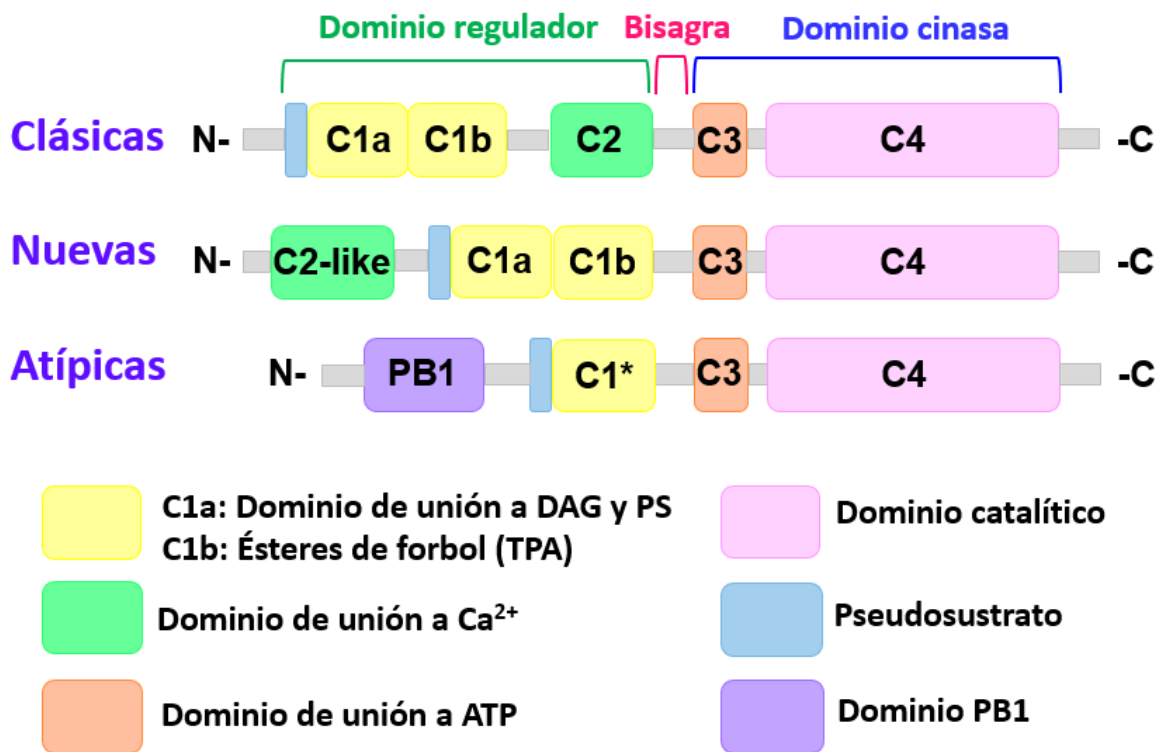
### 4.3.1 Isotipos de las PKCs

Existen tres familias diferentes de las PKCs, las convencionales o clásicas, las nuevas y las atípicas<sup>17,88-90,92,95,100</sup> (ver *tabla 1*). Cada una de las familias presenta diferencias en su estructura, la mayoría de las variaciones entre las estructuras de los isotipos de las PKCs, se encuentran en el dominio regulador<sup>89,90,96,100,101</sup> (ver *figura 10* y *tabla 1*). Sin embargo, existen dominios que comparten las tres familias, como lo son: el dominio de unión a ATP, el dominio cinasa, y la región de la bisagra; esta última une al dominio cinasa y a el dominio regulador<sup>88,89,96,100,101</sup> (ver *figura 10*).

Todas las PKCs en estado inactivo poseen una secuencia de pseudosustrato acoplado al sitio de unión al sustrato, este último se ubica en el dominio catalítico<sup>17,95,100,101</sup>; el pseudosustrato es una región corta de una secuencia de aminoácidos similar a los sustratos de la PKC, excepto que la alanina<sup>88,90,95</sup>



reemplaza a los sitios fosfoaceptores serina o treonina<sup>89,90,100</sup>, su función es bloquear el acceso de posibles sustratos en el estado basal de la cinasa<sup>89</sup>, hasta que los activadores induzcan cambios conformacionales y promuevan la accesibilidad del sustrato<sup>95,96</sup>.



**Figura 10.** Estructura de los isotipos de las PKCs clásicas, nuevas y atípicas. Modificado de Isakov. N, 2018.



**Tabla 1.** Las tres familias de la PKC y sus isotipos.

PKC	Isotipos	Características
<b>Clásicas (cPKC)</b>	$\alpha$ , $\beta I$ , $\beta II$ y $\gamma$	<p>Se activan con <math>Ca^{2+}</math>, diacilglicerol (DAG) y fosfolípidos (fosfatidilserina)<sup>17,89</sup>.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• El dominio C1 posee estructuras funcionales de dedos de zinc ricos en cisteína que median la unión de DAG y ésteres de forbol<sup>89-91,96,100,101</sup>. El éster de forbol que pueden activar a las PKCs, es el TPA, también llamado PMA<sup>17,88,89,94,100</sup>.</li> <li>• El dominio C2 se une a los fosfolípidos aniónicos dependientes del <math>Ca^{2+}</math><sup>89-91,96,100,101</sup>.</li> </ul>
<b>Nuevas (nPKC)</b>	$\epsilon$ , $\delta$ , $\theta$ y $\eta$	<p>Requieren de DAG para su activación, pero no de <math>Ca^{2+}</math><sup>17,89,90</sup>.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• La estructura de las PKCs nuevas al igual que las PKCs clásicas, poseen los dominios C1 y C2, pero en orden opuesto<sup>89,95,96,100,101</sup> (ver figura 10).</li> <li>• El dominio C1 media la unión de alta afinidad de DAG y ésteres de forbol<sup>89-91,96,100,101</sup>.</li> <li>• El dominio similar a C2 (C2-like)<sup>88,89</sup>, también conocido como novel-C2<sup>90,95,96,101</sup>, carece de los residuos de unión a <math>Ca^{2+}</math><sup>88-90,95,96,101</sup>.</li> </ul>
<b>Atípicas (aPKC)</b>	$\zeta$ y $\iota/\lambda$	<p>No requieren de <math>Ca^{2+}</math>, ni de DAG para su activación<sup>17,88,90,98</sup>. Pueden activarse mediante interacciones proteína-proteína<sup>17,88-91</sup>, ceramidas<sup>17,88,89</sup>, o por fosforilaciones mediadas por la proteína cinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos (PDK-1)<sup>88</sup>.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• El dominio C1* carece de zonas para el reconocimiento de DAG y ésteres de forbol. Al dominio C1* se le une el fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>) y las ceramidas<sup>17,88,89</sup>.</li> </ul>

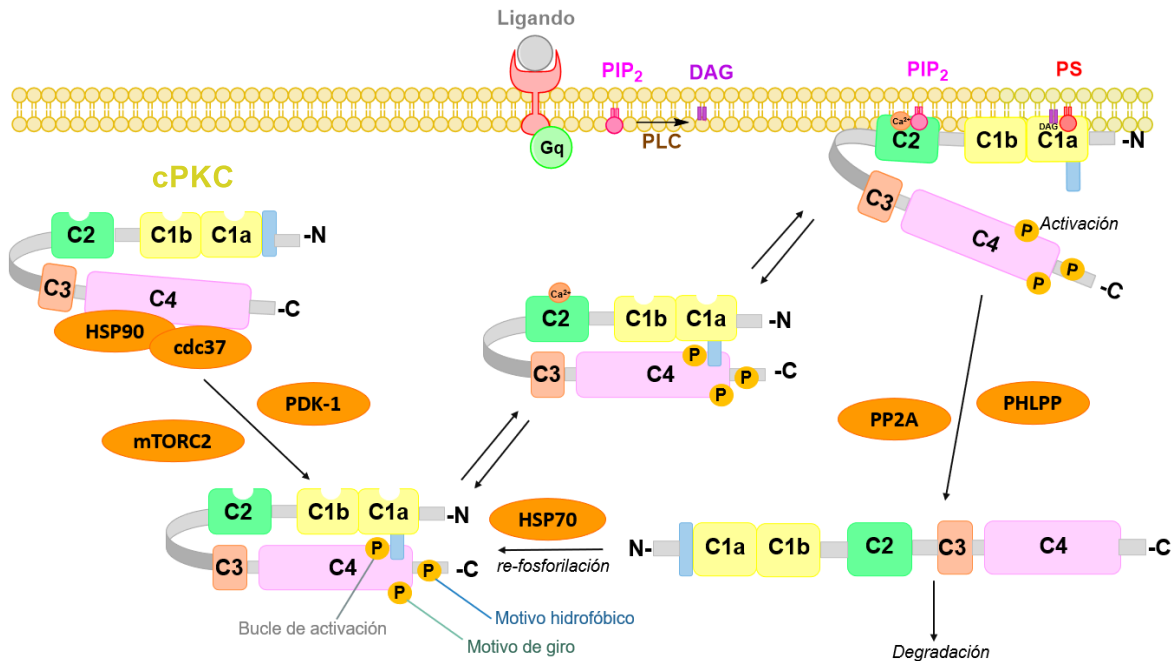


		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Carecen completamente del dominio C2 sensible al calcio<sup>89,96,100,101</sup>.</li> <li>• La actividad de la aPKC está regulada predominantemente por la interacción proteína-proteína mediada por el dominio PB1 (dominio de unión de Phox/Bem1), el cual media la interacción con otras proteínas de andamiaje que contiene el dominio PB1 como: p62, PAR-6 y MEK5<sup>17,88-91</sup>.</li> </ul>
--	--	--

Las isoenzimas de las PKCs clásicas maduran por una serie de fosforilaciones (ver *figura 11*) que son esenciales para la estabilidad y la activación de la enzima<sup>95,100</sup>. La maduración de las cPKCs está mediada por tres fosforilaciones: 1) en el bucle de activación; 2) en el motivo de giro; y 3) en el motivo hidrofóbico<sup>90,95,100</sup>.

Las PKCs se encuentran unidas a la proteína chaperona HSP90 (proteína de choque térmico 90) y a la co-chaperona cdc37, las cuales son importantes para que las fosforilaciones se lleven a cabo<sup>90,95,100</sup>. Inicialmente, la PDK-1 fosforila al residuo conservado de Thr en el bucle de activación, ésta fosforilación es esencial para generar una enzima catalíticamente competente<sup>90,98</sup>. Posteriormente, se fosforila el motivo de giro; este puede ser fosforilado por mTOR2<sup>90,95,100</sup>. Finalmente, se fosforila el motivo hidrofóbico; la fosforilación puede ser mediada por mTOR2 o por autofosforilaciones a través de reacciones intramoleculares<sup>90,95,100</sup>. La cPKC completamente fosforilada y madura se encuentra en el citoplasma, y el pseudosustrato ocupa el sitio de unión al sustrato<sup>88-90,95,100</sup>. La unión de ligandos o sustratos activa a la enzima, en consecuencia, la cPKC se ancla a la membrana y el pseudosustrato se separa del sitio de unión al sustrato<sup>91,95,96</sup>.





**Figura 11.** Ciclo de la vida de las cPKCs. C1a: dominio de unión a DAG y PS; C1b: dominio de unión a ésteres de forbol; C2: dominio de unión a  $Ca^{2+}$ ; C3: dominio de unión a ATP; C4: dominio catalítico; el rectángulo azul claro representa el pseudosustrato. mTOR2: complejo 2 del blanco de rapamicina de mamífero; PHLPP: fosfatasa de dominios PH y repeticiones de leucinas; PP2A: proteína fosfatasa 2 A. Modificado Newton A. C., 2010; Igumenova T. I., 2015; Singh R. K., et al., 2017; y Newton A. C., 2018.

En ausencia de una estimulación crónica, los isotipos de las cPKCs tienen una vida media relativamente larga (d)<sup>95</sup>. Sin embargo, una activación prolongada o una desfosforilación mediada por la PHLPP y la PP2A, resulta en la degradación de la enzima<sup>90,95,102</sup>. La unión de HSP70 al motivo de giro desfosforilado permite que la cPKC se fosfore nuevamente, manteniendo la vida útil de la enzima<sup>90,95,102</sup>. Cuando el sitio de unión al sustrato se encuentra ocupado por el pseudosustrato, la cPKC se encuentra protegida de la desfosforilación<sup>90,95</sup>.

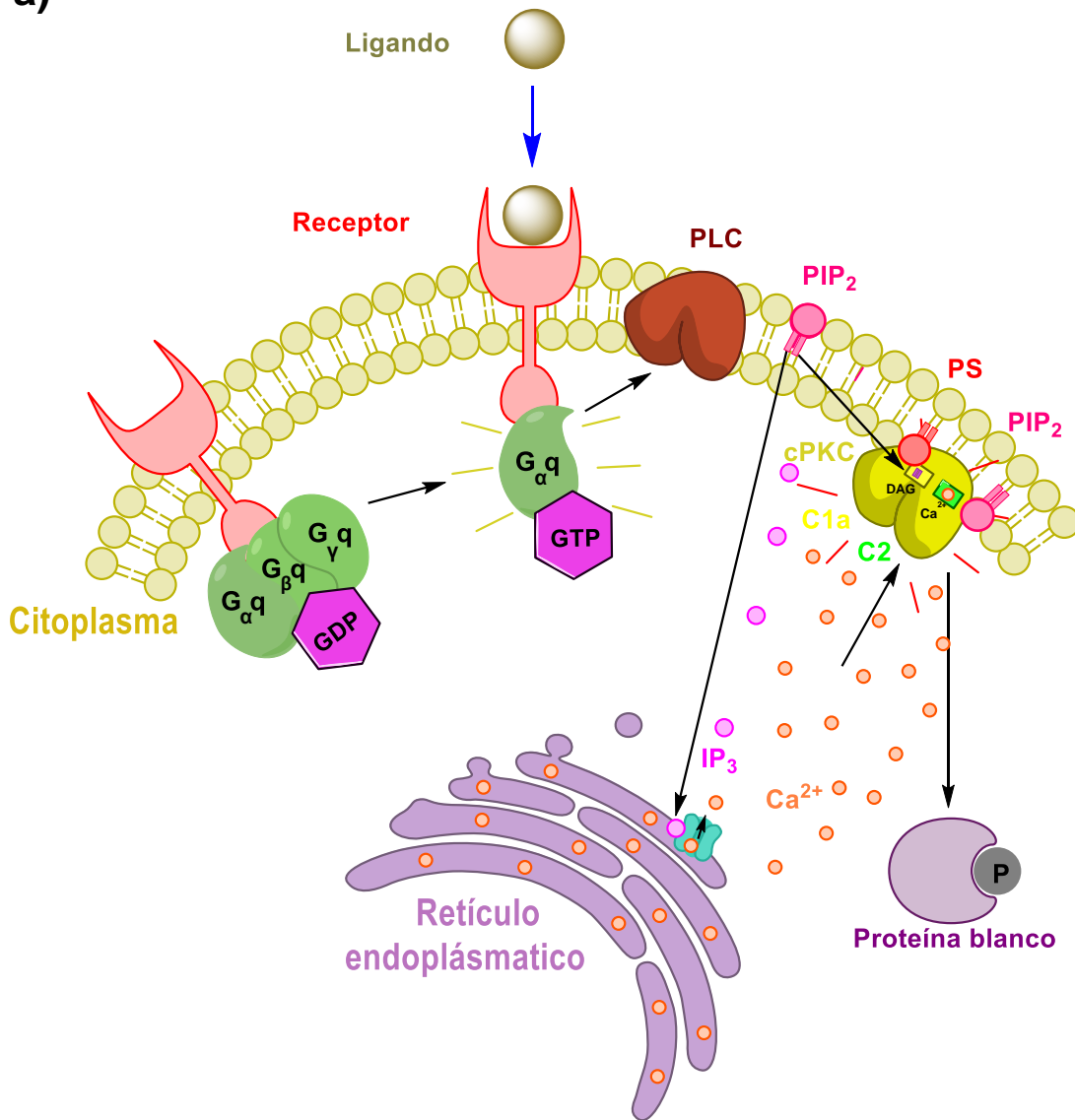


### 4.3.2 Mecanismo de activación de las proteínas cinasas C clásicas (cPKCs)

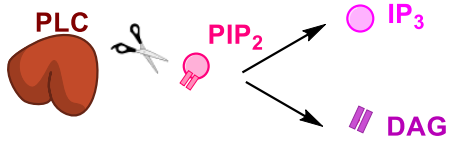
Las PKCs se activan por la unión de un ligando a su receptor de siete dominios transmembranales acoplado con la proteína Gq<sup>92</sup>. Gq activa a la fosfolipasa C (PLC), enzima que hidroliza al fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) para generar DAG, e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>); el IP<sub>3</sub> se une a los canales de calcio que se encuentran en el retículo endoplasmático, permitiendo la salida de Ca<sup>2+</sup> al citoplasma<sup>17,88-90,98</sup>. La interacción del Ca<sup>2+</sup> con el dominio C2 favorece la unión de la cPKC a la membrana, uniéndose a PIP<sub>2</sub><sup>17,89,95,96,98,100,101</sup>. Una vez anclado a la membrana, la cPKC se difunde dentro de la bicapa lipídica e interactúa con el DAG y la PS a través del dominio C1a, este proceso permite la liberación del pseudosustrato del sitio activo, activando a la enzima<sup>17,89,95,96,98,100,101</sup>. Las cPKCs, también pueden activarse farmacológicamente, con ésteres de forbol como TPA<sup>17,88,89,94,100</sup>, a través de la interacción de este con el dominio C1b de las cPKCs<sup>89,91</sup>. Cuando la cPKC esta inactiva se encuentra en el citoplasma; cuando se activa se transloca a la membrana celular, a las regiones perinucleares o al núcleo<sup>16,17,103,104</sup>. Una vez activa, la PKC puede fosforilar a proteínas blanco<sup>17,21,22,103,105</sup> (ver figura 12).



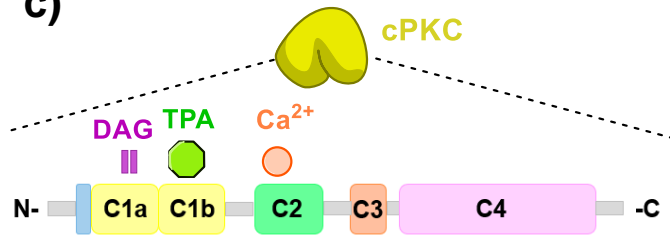
a)



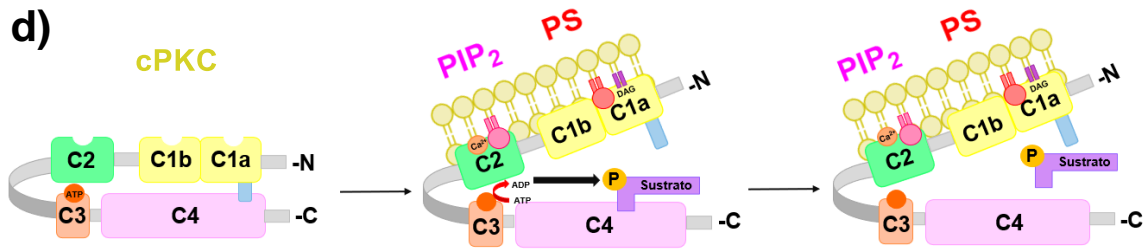
b)



c)







**Figura 12.** a) Mecanismo de activación de las cPKCs<sup>17,88–90,98</sup>. b) La PLC, hidroliza al PIP<sub>2</sub> para generar DAG e IP<sub>3</sub><sup>17,88–90,98</sup>. c) El Ca<sup>2+</sup> interactúa con el dominio C2 de la cPKC y el DAG interactúa con el dominio C1a<sup>89,90,96,100,101</sup>. Las cPKCs pueden activarse farmacológicamente con ésteres de forbol como TPA, a través de la interacción de este con el dominio C1b de las cPKCs<sup>89,91</sup>. d) La cPKC se localiza en el citoplasma en un estado inactivo<sup>16,17,91,103,104</sup> y el pseudosustrato ocupa el sitio de unión del ligando<sup>17,95,100–102</sup>. Cuando la cPKC se activa (en presencia de Ca<sup>2+</sup> y DAG) se ancla a la membrana<sup>17,89,95,98,100,102</sup>, permitiendo que quede expuesto el sitio de unión a ligando, provocando la unión del ligando; posteriormente, el sustrato se fosforila<sup>17,91,102,103,105</sup>. C1a: dominio de unión a DAG y PS; C1b: dominio de unión a ésteres de forbol; C2: dominio de unión a Ca<sup>2+</sup>, C3: dominio de unión a ATP; C4: dominio catalítico, el rectángulo azul claro representa el pseudosustrato. La figura d) fue modificada de Singh R. K., et al., 2017.

### 4.3.3 Las PKCs en glioblastomas

La expresión de las PKCs incrementa en las muestras de GBM en comparación con biopsias de cerebro sano<sup>106,107</sup>. Se ha demostrado que los altos niveles de la PKC correlacionan con un tiempo supervivencia menor en pacientes con GBM<sup>106</sup>. En la *tabla 2* se muestran las funciones de los diferentes isotipos de la PKC en GBMs.



**Tabla 2.** Funciones de los distintos isotipos de la PKC en GBMs.

Isotipo	Funciones de las PKCs en GBMs
<b>PKC<math>\alpha</math></b>	Favorece la proliferación <sup>16,17,20,89,108</sup> , la supervivencia <sup>16,17</sup> y la migración <sup>17,109</sup> celular; y evasión de la apoptosis <sup>20,89,108</sup> .
<b>PKC<math>\beta</math></b>	Induce la angiogénesis <sup>17,89</sup> ; la proliferación <sup>17</sup> y la supervivencia <sup>17</sup> celular; y evasión de la apoptosis <sup>17</sup> .
<b>PKC<math>\delta</math></b>	Involucrado en la invasividad <sup>17</sup> y la evasión de la apoptosis <sup>17,20</sup> . Induce la supervivencia <sup>17</sup> y proliferación <sup>89</sup> celular.
<b>PKC<math>\epsilon</math></b>	Evasión de la apoptosis <sup>17,89,110</sup> . Aumenta la supervivencia <sup>89,110</sup> y la migración <sup>17</sup> celular.
<b>PKC<math>\eta</math></b>	Proliferación celular <sup>17,111</sup> .
<b>PKC<math>\zeta</math></b>	Involucrado en la proliferación <sup>17,89,112</sup> y la migración <sup>17,89</sup> celular; contribuye a la invasión tumoral <sup>17,89</sup> y a la ruptura de la barrera hematoencefálica <sup>17</sup> .
<b>PKC<math>\lambda</math></b>	Promueve la invasividad <sup>17,89,113</sup> , la supervivencia <sup>89</sup> , la migración <sup>17</sup> y la proliferación <sup>17,89</sup> celular.

#### 4.3.4 La PKC $\alpha$ en glioblastomas

La PKC $\alpha$  es una enzima conformada por 672 aminoácidos<sup>102</sup>, se encuentra distribuida de forma ubicua en los tejidos<sup>91,99,102</sup>. Está involucrada en gran variedad de funciones celulares incluyendo la proliferación<sup>91,92,99,102</sup>, la apoptosis<sup>91,92,102</sup>, la diferenciación<sup>91,92,99,102</sup>, la invasividad<sup>91,102</sup>, la adhesión<sup>91,92</sup> y la migración<sup>91,92,102</sup>; así como en la angiogénesis<sup>91,92</sup> y la inflamación<sup>102</sup>. La PKC $\alpha$  juega un papel importante en la resistencia a fármacos anticancerígenos<sup>91,102</sup>, debido a que fosforila a la glicoproteína P<sup>114,115</sup>, una proteína de membrana que expulsa agentes quimioterapéuticos de la célula<sup>116</sup>, en consecuencia, disminuye la acumulación de vincristina en células de glioblastoma U251<sup>115</sup>.



En la literatura se encuentra reportado que la PKC $\alpha$  se expresa en las células gliales en regiones del cerebro como la corteza cerebral y el hipocampo<sup>117</sup>, así como en varias líneas celulares derivadas de GBM<sup>16,118,119</sup>. Existe evidencia que sugiere una estrecha relación entre la expresión de la PKC $\alpha$ , y la proliferación<sup>16,17,20,89,108</sup>, la migración<sup>17,109</sup>, y la supervivencia<sup>16,17</sup> de células de GBM.

Se ha reportado que en la línea celular U87, derivada de GBM, la inhibición de la PKC $\alpha$  con el inhibidor competitivo Gö6976, impide la proliferación de estas células<sup>108</sup>. Asimismo, la disminución de la expresión de la PKC $\alpha$  reduce la cantidad de células en fase de síntesis y sensibiliza a las células a la apoptosis<sup>108</sup>. En los GBMs la PKC $\alpha$  induce la activación de ERK1/2, un potente mitógeno<sup>120</sup>; y de NF $\kappa$ B/p65, el cual es un factor pro-supervivencia y proliferativo<sup>121</sup>; además, regula la escisión de la N-cadherina, involucrada en la migración celular<sup>122</sup>.

Se ha observado que la PKC $\alpha$  está involucrada en el desarrollo tumoral de los GBMs<sup>18-20,107</sup>, debido a que al inocular ratones atímicos desnudos con células U87 transfectadas con un vector antisentido para la PKC $\alpha$ , disminuye el volumen del tumor, en comparación con el grupo control<sup>19</sup>. En 1996, Yazaki T. y colaboradores, reportaron que la administración de oligodeoxinucleótidos antisentido (ODNs) para suprimir la expresión de la PKC $\alpha$ , a ratones desnudos con xenoinjertos subcutáneos o intracraneales de células U87, diariamente durante 21 d, reduce el crecimiento tumoral, incrementa el tiempo de supervivencia de los ratones y disminuye los niveles de la PKC $\alpha$  en los tumores<sup>18</sup>.

En 2001, Mandil y colaboradores, determinaron mediante *western blot* el contenido de los diferentes isotipos de la PKC en tumores derivados de pacientes con GBMs y de astrocitomas de grado II, respectivamente<sup>20</sup>. En los GBMs, la PKC $\alpha$  es el isotipo que se encuentra en mayor cantidad, cabe destacar que el contenido de la PKC $\alpha$  en GBMs es significativamente mayor comparación con los astrocitomas de bajo grado<sup>20</sup>. Recientemente, en nuestro grupo de investigación en muestras de pacientes, se detectó por inmunofluorescencias a la PKC $\alpha$  en núcleo, se reportó



que el porcentaje de células positivas a PKC $\alpha$  nuclear aumenta respecto al grado de malignidad de los astrocitomas; y que en los GBMs este porcentaje es significativamente mayor en comparación con tejido sano<sup>107</sup>.

#### 4.4.0 El receptor a progesterona (PR)

La progesterona (P4) promueve la proliferación<sup>21,123</sup>, la migración<sup>22</sup> y la invasión<sup>22</sup> celular a través de la interacción con sus receptores intracelulares, PR-A y PR-B<sup>124,125</sup>, los cuales son clasificados como factores de transcripción<sup>125-129</sup>, los PRs son miembros del subgrupo de receptores a hormonas esteroides<sup>124,126,128,130</sup>. Estos receptores se localizan en el citoplasma y el núcleo de las células diana<sup>128</sup>; se expresan principalmente en los tejidos reproductivos femeninos<sup>126</sup> (útero<sup>125</sup>, ovario<sup>125</sup> y glándula mamaria<sup>125</sup>) y en el SNC<sup>126,131</sup> (hipocampo<sup>130,132,133</sup>, hipotálamo<sup>130,133</sup>, corteza cerebral<sup>130,132,133</sup> y cerebelo<sup>130,133</sup>). El PR regula la expresión de genes que controlan el desarrollo, la diferenciación y la proliferación de tejidos diana<sup>126</sup>. El PR está involucrado en procesos patológicos como cáncer de útero<sup>134</sup>, ovario<sup>134</sup>, mama<sup>124,125,134</sup>, y astrocitomas<sup>130,132,135-137</sup>.

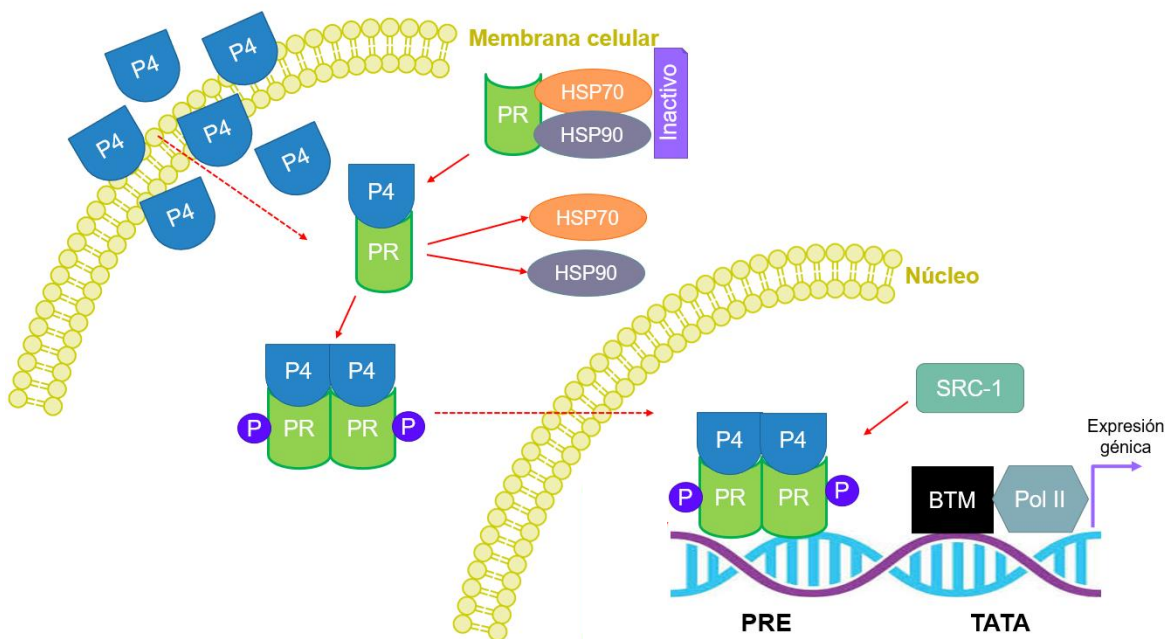
Existen dos isoformas del PR, PR-A y PR-B<sup>125,127,129,130,134</sup>, las cuales son generadas a partir del mismo gen<sup>124,127,129,130</sup>. El PR-A (94 kDa)<sup>130,131,134</sup> posee un dominio amino terminal (NTD) trunco<sup>127,138</sup>, mientras que el PR-B (116 kDa)<sup>130,131,134</sup> tiene una región adicional al NTD, que consta de 164 aminoácidos<sup>125,127</sup>, denominada “BUS” (por sus siglas en inglés B-receptor upstream segment)<sup>128,130,134</sup>.

#### 4.4.1 Mecanismo de acción del PR

La P4 ejerce sus acciones a través de su unión al PR, mediante el mecanismo clásico (ver *figura 13*), el cual se relaciona con efectos a largo plazo<sup>130,132,139</sup> o por el mecanismo no clásico (ver *figura 14*), involucrado con respuestas celulares rápidas<sup>130,132,139,140</sup>.



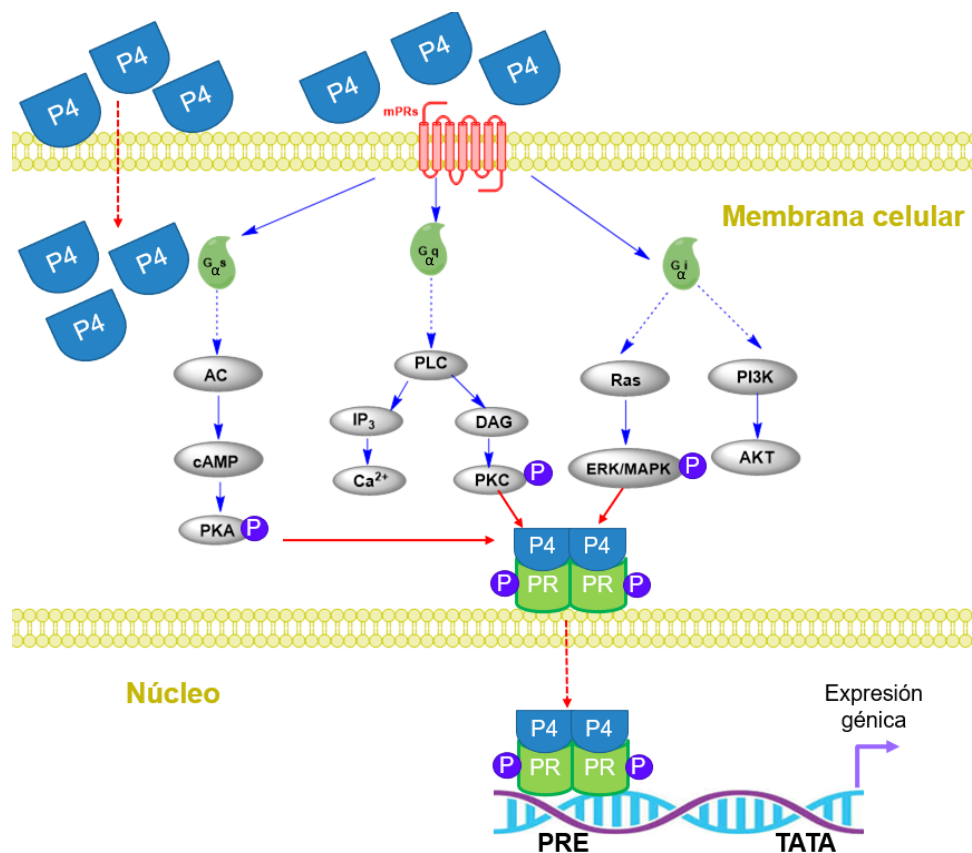
En el mecanismo clásico (ver *figura 13*), la P4 ingresa a la célula por difusión simple<sup>130,132</sup>, cuando el PR se encuentra en forma de monómero está inactivo, debido a su unión con las HSPs, estas proteínas “secuestran” al PR e impiden que se lleve a cabo la actividad transcripcional<sup>125,129,130,139</sup>. Después de la unión de la P4 al PR, el PR se disocia de las HSPs<sup>125,129,130,139</sup> y forma un dímero con otra molécula del PR (PR:PR), en seguida el PR es fosforilado y se transloca al núcleo<sup>125,129,130,132,139</sup>. El PR fosforilado es una estructura de alta afinidad por secuencias del ADN, denominadas elementos de respuesta a progesterona (PRE)<sup>125,129,130,132,139</sup>, las cuales se ubican en la región promotora de los genes diana de la P4<sup>125,130,132,139</sup>; la transcripción inicia cuando se recluta a la maquinaria de transcripción basal (BTM)<sup>130,139</sup>, y a coactivadores<sup>125,129,130,132,139</sup>, como SRC-1 (coactivador de los receptores de las hormonas esteroideas)<sup>125,132</sup>. Después de la separación del PR fosforilado del complejo de transcripción, el receptor se poliubiquitina marcándolo para que sea degradado por el proteosoma 26S<sup>21,130,141,142</sup>.



**Figura 13.** Mecanismo de acción clásico del PR. Modificado de Camacho-Arroyo, I., 2003; y Camacho-Arroyo, I., et al., 2017.



Por otra parte, en la vía no-clásica<sup>130,139,140</sup> (ver *figura 14*), el PR puede activarse por segundos mensajeros<sup>130</sup>; canales de iones, por ejemplo, el de calcio<sup>130,139</sup>; independientemente del ligando mediante modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación<sup>130</sup>; o a través de la activación de los receptores de progesterona de membrana (mPRs)<sup>130,132,140</sup>, estos últimos son receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G<sup>140</sup>; se expresan en gran variedad de tejidos incluidos el útero, el ovario, el riñón, el SNC y el intestino<sup>140</sup>. La P4 activa a los mPRs, para iniciar cascadas de señalización que involucran a PKA, PKC, PI3K/AKT y ERK/MAPK<sup>130,132,140</sup>. PKA, PKC y MAPK 42/44 pueden fosforilar al receptor<sup>130</sup>; el PR fosforilado se transloca al núcleo y se une a los PRE para inducir la expresión génica<sup>129,130,132</sup>.



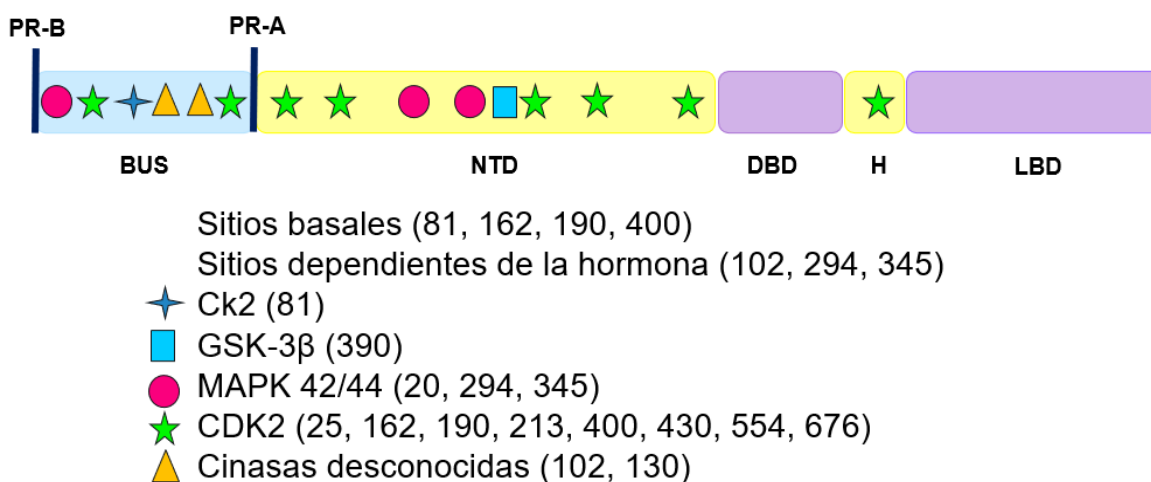
**Figura 14.** Mecanismo de acción no clásico del PR. Modificado de Camacho-Arroyo, I., 2003; Camacho-Arroyo, I., et al., 2017; y González-Orozco J.C. & Camacho-Arroyo, I., 2019.



## 4.4.2 Fosforilación del PR

El PR experimenta diversas modificaciones post-traduccionales que incluyen: la fosforilación, la acetilación, la ubiquitinación, la SUMOilación y la metilación<sup>126,128,130,134</sup>. Hay al menos 13 sitios de fosforilación (Ser/Thr) en el PR, en su mayoría ubicados en el NTD<sup>126,128,130,134</sup>. La fosforilación del PR coopera con el reclutamiento de moléculas coactivadoras<sup>126,128</sup>, potencializando la actividad transcripcional del PR<sup>126,128,130,134</sup>; además, induce la translocación nuclear<sup>126,128,130</sup>, la dimerización<sup>126,128,130</sup>, la unión al ADN<sup>126,128</sup>, así como la progresión del ciclo celular<sup>126</sup> y su degradación<sup>130,142</sup>.

Las cinasas que fosforilan al PR incluyen a: la cinasa dependiente de ciclina 1/2 (CDK1/2)<sup>126,130,134,143</sup>, la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK 42/44)<sup>130,141,142</sup>, la caseína cinasa II (CK2)<sup>126,130,134,144,145</sup> y la cinasa de la glucógeno sintasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )<sup>130,146</sup> (ver *figura 15*). Se ha descrito que la CDK2 puede fosforilar al PR en el residuo de Ser400, esta fosforilación se ha relacionado con la mejora de la actividad transcripcional independiente del ligando<sup>143</sup>.

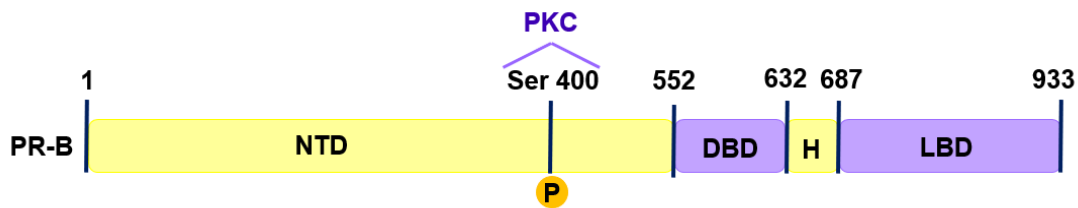


**Figura 15.** Estructura del PR y sitios de fosforilación. Región “BUS”, dominio amino-terminal (NTD), dominio de unión al ADN (DBD), bisagra (H), dominio de unión al ligando (LBD)<sup>126,129,130,134</sup>. Se indican los residuos de serina fosforilados por las diversas cinasas. Las fosforilaciones independientes del ligando (sitios basales),



son los residuos de serina 81, 162, 190 y 400<sup>128,130,147</sup>. Las fosforilaciones en los sitios 102, 294 y 345 son dependientes de progesterona<sup>128,130,147</sup>. Modificado de Hagan C. R., et al., 2012.

En años recientes, González-Arenas y colaboradores informaron que la PKC $\alpha$  puede fosforilar al PR en el residuo Ser400 (ver figura 16), y que esta fosforilación correlaciona con un aumento en la actividad transcripcional del PR, independiente del ligando<sup>21</sup>.



**Figura 16.** Dominios estructurales del PR-B. El residuo Ser400, es fosforilado por la PKC $\alpha$ <sup>21</sup>. Dominio amino-terminal (NTD), dominio de unión al ADN (DBD), bisagra (H), dominio de unión al ligando (LBD)<sup>126,129,130,134</sup>. Modificado de González-Arenas, et al., 2015.

#### 4.4.3 El PR en glioblastomas

El PR está involucrado en la regulación de genes relacionados con la progresión del ciclo celular<sup>138,148,149</sup>, la metástasis<sup>138</sup>, la angiogénesis<sup>138,148</sup>, la invasión<sup>150</sup>, la migración<sup>150</sup>, la diferenciación<sup>148</sup>, la apoptosis<sup>138</sup>, y la proliferación celular<sup>138,148,150</sup>.

Particularmente, en astrocitomas se ha encontrado que el contenido proteico del PR está directamente relacionado con el grado de malignidad del tumor, es decir, que el receptor se encuentra en mayor cantidad en los GBMs en comparación con los astrocitomas de bajo grado<sup>151,152</sup>; además, se ha descrito que el PR-B es la isoforma predominante en los GBMs<sup>131,136</sup>. Recientemente, se detectaron a las células positivas a PR-pSer400, a través de inmunofluoresencias, en muestras de pacientes derivadas de astrocitomas de grado I, II, II, IV, respectivamente. El porcentaje de células positivas a PR-pSer400 aumenta respecto al grado de malignidad de los





astrocitomas. Por lo anterior, se sugiere que los tumores que expresan al PR, presentan un fuerte potencial oncogénico<sup>153</sup>.

Se ha determinado que la administración de la P4 aumenta significativamente la proliferación en las líneas celulares D54, U251 (derivadas de astrocitomas humanos de grados III y IV, respectivamente), mientras que la administración de RU486, antagonista del PR, bloquea los efectos inducidos por la P4<sup>123</sup>.

La activación del PR incrementa la expresión de genes como *ciclina D1*<sup>138,148</sup>, *VEGF*<sup>138,148</sup>, *EGFR*<sup>138,148</sup> y *PIBF* (factor de bloqueo inducido por progesterona)<sup>22,150</sup>; involucrados en el control del ciclo celular<sup>138,148,149</sup>, la proliferación<sup>138,148,150</sup>, la migración<sup>150</sup> e invasividad<sup>150</sup> de las células derivadas de GBM; los efectos de estos genes son bloqueados por RU486<sup>22,148,150</sup>.

En un modelo *in vivo* donde las células U251 fueron implantadas en la corteza cerebral motora de ratas, la administración de P4 incrementa significativamente la infiltración y el área del tumor; estos efectos fueron inhibidos por RU486<sup>154</sup>. Posteriormente, se reportó que la administración de ODNs, para silenciar la expresión del PR, durante 15 d en un xenoinjerto ortotópico de células U87 resulta en la reducción del área del tumor y la infiltración tumoral<sup>155</sup>. Lo anterior, sugiere que el PR juega un papel importante en el crecimiento tumoral del GBM.

#### **4.5.0 El PR y su relación con la PKC $\alpha$ en glioblastomas**

En nuestro laboratorio, se ha identificado que el residuo Ser400 en el PR, puede ser fosforilado por la PKC $\alpha$ <sup>21</sup>, esta cinasa promueve la actividad transcripcional del PR independiente de la P4<sup>21</sup>. Adicionalmente, la fosforilación del PR por la PKC $\alpha$ , incrementa su localización en el núcleo y aumenta su actividad transcripcional<sup>16,21,156</sup>. La activación de la PKCs incrementa la proliferación<sup>21</sup>, la migración<sup>22</sup> y la invasividad<sup>22</sup> de líneas celulares derivadas de GBM; e interesantemente si el PR es bloqueado, aun cuando se activen a las PKCs, estos



procesos no se ven incrementados, lo que sugiere la participación de una vía en común PKC $\alpha$ /PR<sup>21,22</sup>.

#### **4.6.0 El LPA<sub>1</sub> y su relación con la PKC $\alpha$ y el PR en glioblastomas**

Recientemente, en nuestro grupo de investigación, se realizaron ensayos *in vitro* de líneas celulares derivadas de GBM, y se encontró que el LPA a través de LPA<sub>1</sub> induce la translocación de la PKC $\alpha$  al núcleo, lo que indica que induce la activación de esta enzima<sup>16</sup>. Además, se reportó que la activación del LPA<sub>1</sub> induce la fosforilación del PR<sup>16</sup>. En el tiempo donde se detecta mayor fosforilación del PR en la Ser400 en las células U251, correlaciona con el tiempo en el que la PKC $\alpha$  se transloca al núcleo después de la activación de LPA<sub>1</sub><sup>16</sup>. Esto sugiere que el LPA<sub>1</sub> activa a la PKC $\alpha$ , a su vez esta enzima es capaz de fosforilar al PR en la Ser400, en células de GBM<sup>16</sup>. Sin embargo, no se ha estudiado si la activación de esta vía repercute sobre el crecimiento del tumor.



## 5.0 Justificación

Los GBMs son tumores cerebrales caracterizados por su alta malignidad y un tiempo de supervivencia bajo, por lo anterior, el estudio de las vías de señalización implicadas en su progresión resulta relevante. A este respecto el estudio de la inhibición de la actividad del LPA<sub>1</sub>, permitirá establecer un mecanismo a través del cual se pueda disminuir el crecimiento tumoral y detectar posibles marcadores de malignidad.

## 6.0 Objetivos

### 6.1 Objetivo general

Estudiar el efecto de la inhibición del receptor LPA<sub>1</sub> sobre el desarrollo de los tumores originados de un xenoinjerto heterotópico de la línea celular U251, derivada de GBM, así como la localización de la PKC $\alpha$  y la fosforilación del PR en la Ser400.

### 6.2 Objetivos particulares

- 🧠 Realizar un xenoinjerto heterotópico de las células U251 en ratones NSG.
- 🧠 Determinar el efecto del antagonismo del LPA<sub>1</sub> en el volumen tumoral.
- 🧠 Determinar el efecto del antagonismo del LPA<sub>1</sub> en la proliferación celular.
- 🧠 Estudiar el efecto del antagonismo del LPA<sub>1</sub>, sobre la localización de la PKC $\alpha$  y la fosforilación del PR en la Ser400 en las células de GBM.

## 7.0 Hipótesis

El antagonismo del receptor LPA<sub>1</sub> reducirá el tamaño tumoral de los GBMs, lo cual correlacionará con una disminución de la translocación de la PKC $\alpha$  al núcleo y de la fosforilación del PR en la Ser400.



## 8.0 Materiales y Métodos

### 8.1 Cultivo celular

La línea celular derivada de GBM, U251 (American Type Culture Collection), fue cultivada en medio Eagle modificación de Dulbecco (DMEM, *in vitro*), suplementado con suero fetal bovino (FBS, BYPRODUCTOS) al 10%, a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% y 95% de humedad, hasta una confluencia del 80%.

### 8.2 Inoculación de ratones NSG

Este estudio fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL), con el número de protocolo ID181. El manejo, cuidado y procedimientos fueron realizados según lo estipulado en la norma mexicana NOM-062-ZOO1999<sup>157</sup>.

Se obtuvieron 9 ratones NSG macho de 6-8 semanas de edad, de la unidad de modelos biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, nueva sede; donde se mantuvieron hospedados en un ciclo de 12 h de luz, por 12 h de oscuridad, con alimento y agua *ad libitum*.

#### Ratones NSG (NOD Scid Gamma)



**Figura 17.** Ratones NSG, fotografía tomada de [jax.org](http://jax.org).

Son una cepa de origen endogámico<sup>158</sup>, extremadamente inmunodeficientes<sup>158</sup>, fértiles<sup>158</sup>, de tamaño normal<sup>158</sup>, no muestran ninguna anomalía física o de comportamiento<sup>158</sup> (ver *figura 17*). Tienen una vida útil larga, de aproximadamente 89 semanas<sup>159</sup>.

Presentan dos mutaciones, la inmunodeficiencia combinada grave (*scid*) y un alelo completo nulo de la cadena gamma del receptor IL-2 (IL2rg<sup>null</sup>)<sup>158–160</sup>.



El trasfondo genético NOD, es la razón del porque los ratones NSG poseen macrófagos y células dendríticas defectuosas<sup>160,161</sup>. La mutación scid implica la pérdida de la función del gen *Prkdc*, que previene el desarrollo de las células T y B<sup>158,160,162,163</sup>. El *Prkdc* codifica la subunidad catalítica de una proteína cinasa activada por ADN<sup>158,160,162,163</sup>, esta cinasa tiene un papel en la resolución del rompimiento del ADN de doble cadena, en consecuencia, los ratones que portan la mutación *Prkdc*<sup>scid</sup> son sensibles a la radiación<sup>160,163</sup>.

Los ratones NSG presentan mutaciones dirigidas en el locus de la cadena gamma del receptor de la interleucina 2 (IL-2R), la cadena IL-2R es un componente crucial de los receptores para las interleucinas, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21<sup>158,159,162-165</sup>. La mutación IL2rg<sup>null</sup> previene la señalización de citocinas a través de múltiples receptores, lo que lleva a una deficiencia en las células asesina naturales (NK) funcionales<sup>159,160,163,164</sup>.

Las cepa NSG tiene una deficiencia de las funciones de las células NK<sup>159,160,162-164</sup>, las células T y las células B son inmaduras<sup>159,160,162,163</sup>; y los macrófagos y las células dendríticas son defectuosas<sup>159,160,162</sup>. Actualmente, los ratones NSG permiten la investigación del cáncer<sup>162,163,165</sup>, debido a su inmunodeficiencia grave pueden ser inoculados con células troncales, líneas celulares o se pueden realizar xenoinjertos derivados de pacientes (PDX)<sup>158,162</sup>, por lo que, los convierte en un modelo animal valioso para las pruebas de nuevos tratamientos contra el cáncer<sup>163</sup>.

- a) Los ratones NSG se dividieron al azar en tres grupos (control: n=3; vehículo: n=3; Ki16425, n=3).
- b)  $2.5 \times 10^6$  células U251/100  $\mu$ L PBS se inocularon, en el flanco derecho de los ratones NSG. Nota: El número de células fue determinado en experimentos preliminares.
- c) Una revisión rutinaria del crecimiento de los tumores se realizó cada tercer.
- d) El tamaño de los tumores se midió con ayuda de un vernier.



Para determinar el volumen ( $V$ ) del tumor se utilizó la fórmula siguiente<sup>166,167</sup>:

$$V = \left(\frac{4}{3}\right)\pi \times \left(\frac{a}{2}\right) \times \left(\frac{b}{2}\right) \times \left(\frac{c}{2}\right)$$

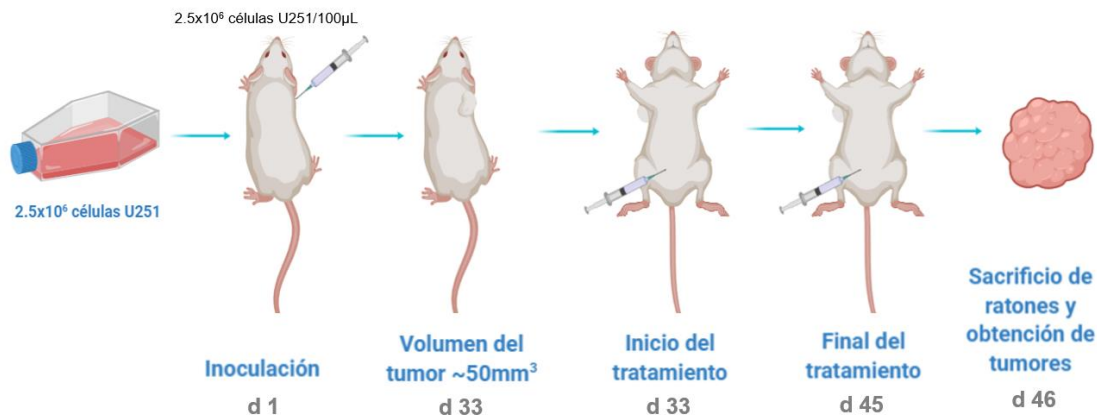
Donde:

$a$  = longitud (mm)

$b$  = altura (mm)

$c$  = ancho (mm)

e) Una vez que los tumores alcanzaron un tamaño de  $50 \text{ mm}^3$ , se comenzó con la administración de los tratamientos (ver figura 18).



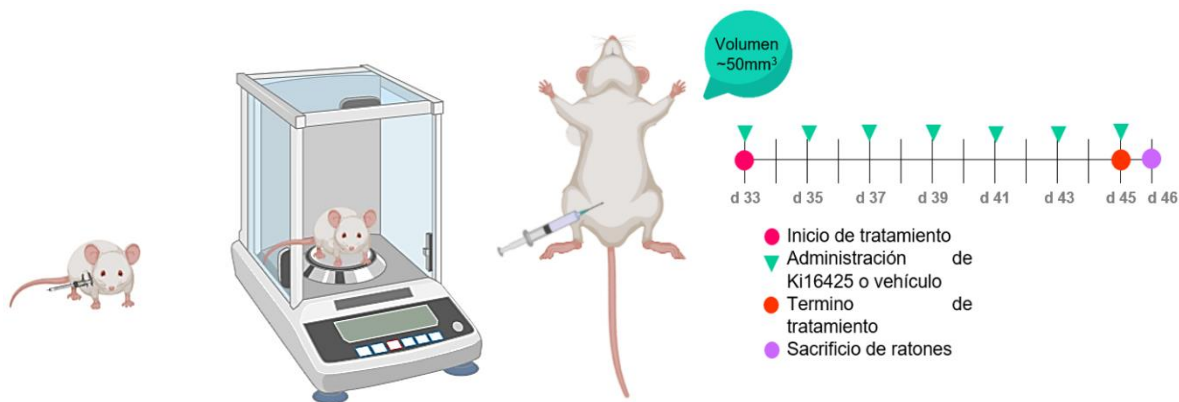
**Figura 18.** Línea de tiempo. Inoculación ratones NSG (d 1). Desde el d de la inoculación hasta el d del sacrificio se midió el tamaño del tumor, usando un vernier. En el d 17 post-inoculación, se comenzó a detectar el tumor. Cuando el tumor alcanzó un tamaño de  $\sim 50 \text{ mm}^3$  (d 33) se comenzó con el tratamiento (ver figura 19; tablas 3), el tratamiento terminó el d 45 y al d 46 se sacrificaron a los ratones.



### 8.3 Tratamiento

Para observar los efectos generados al bloquear al LPA<sub>1</sub>, en un modelo *in vivo*, se administró Ki16425 (ver figura 19), un antagonista para LPA<sub>1</sub>, que se une en el sitio de unión al ligando<sup>168</sup>. Actualmente, es un fármaco que se encuentra en fase preclínica, indicado para cáncer, artritis reumatoide e hidrocefalia<sup>9</sup>.

Se han descrito a los cambios de la masa corporal de los ratones como un parámetro para observar la toxicidad del tratamiento, la pérdida mayor o igual al 20% de la masa corporal del ratón tratado en comparación con el control es considerado como un efecto adverso del tratamiento<sup>169</sup>. Si por efecto de la administración del vehículo o del Ki16425, la pérdida de la masa corporal de los ratones es  $\geq 20\%$  en comparación con el grupo control, los ratones deben ser sacrificados<sup>170,171</sup>, según lo estipulado en las guías de uso y cuidado de animales de laboratorio<sup>170,171</sup>. Debido a lo anterior, la masa corporal de los ratones fue determinada cada tercer d.



**Figura 19.** Línea de tiempo del tratamiento. Desde la inoculación hasta el sacrificio se midió el tamaño del tumor de los ratones, usando un vernier. Cuando el tumor alcanzó un tamaño de  $\sim 50 \text{ mm}^3$ , se comenzó con el tratamiento (d 33) (ver tabla 3). Se administraron  $200 \mu\text{L}$  de  $30 \text{ mg/Kg}$  de Ki15425 (CAY10012659, Cayman), o el vehículo cada tercer d, durante 13 d (final de tratamiento, d 45). Al d 46, los ratones de todos los grupos (control, vehículo y Ki16425) se sacrificaron. Desde la



*inoculación hasta el d del sacrificio de los ratones, se midió la masa corporal de los ratones y el volumen de los tumores, cada tercer d.*

**Tabla 3.** Condiciones del tratamiento con Ki16425.

<b>Sitio de administración</b>	Intraperitoneal
<b>Dosis</b>	30 mg/Kg Ki16425
<b>Vehículo</b>	DMSO al 25% en PBS
<b>Volumen de administración</b>	200 µL
<b>Duración del tratamiento</b>	Una dosis, cada tercer d, durante 13 d. Un total de 7 dosis fueron administradas.

## 8.4 Obtención del tumor

- a) En el d 46 post-inoculación, se anestesiaron a los ratones NSG con pentobarbital (50 mg/kg).
- b) Posteriormente, se perfundieron a los ratones. Se realizó una incisión en la cavidad peritoneal del ratón a la altura del esternón, se cortó el diafragma y las costillas para dejar al descubierto el corazón. Se introdujo una cánula en el ventrículo izquierdo del corazón, posteriormente, se realizó un corte en la aurícula derecha del ratón. Por la cánula se hicieron pasar 80 mL de PBS, seguido de 80 mL PFA al 4%. Finalmente, se obtuvieron los tumores.
- c) La masa de los tumores se determinó haciendo uso de una balanza analítica.
- d) El volumen de los tumores se determinó por el procedimiento siguiente, inicialmente, en una balanza analítica se colocó un vaso de precipitados de 50 mL, en seguida la balanza se taro; después, 5.0 mL de agua destilada se adicionaron, se apuntó la masa correspondiente; posteriormente, el tumor se colocó en el vaso de precipitados con agua destilada, y se anotó la masa. Se realizó la sustracción de estos valores, la cantidad resultante es la masa del tumor. El procedimiento anteriormente mencionado, se repitió para cada uno de los tumores. Para poder determinar el volumen de los tumores por este método, se utilizó la fórmula siguiente<sup>166</sup>:





$$V = \frac{m}{\rho}$$

Donde:

$m$  = Masa del tumor al d del sacrificio de los ratones (g).

$\rho$  = Densidad del agua destilada (g/cm<sup>3</sup>). Nota: medir la temperatura del agua cuando se realiza el procedimiento anteriormente descrito, para utilizar el valor correspondiente de la densidad del agua a esa temperatura<sup>172</sup>.

e) La densidad ( $\rho$ ) de los tumores se calculó con la fórmula siguiente<sup>166</sup>:

$$\rho = \frac{m}{V}$$

Donde:

$m$  = Masa del tumor al d del sacrificio de los ratones (g).

$V$  = Volumen del tumor al d del sacrificio de los ratones (cm<sup>3</sup>).

## 8.5 Obtención de cortes del tumor en el criostato

a) Una vez obtenidos los tumores, se colocaron en PFA al 4%, durante 48 h.

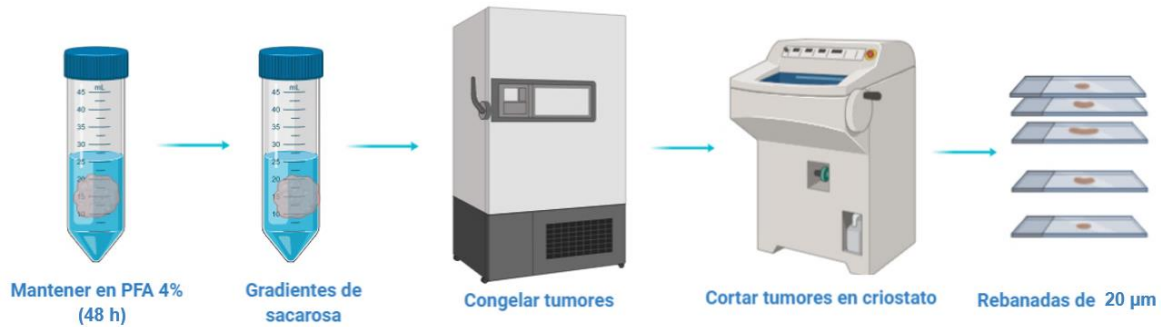
b) Se realizó una crioprotección de los tumores, para lo cual los tumores se colocaron durante 24 h a 4°C, en cada una de las siguientes disoluciones:

- Sacarosa 20%
- Sacarosa 30%
- Sacarosa 40%

c) Los tumores se congelaron los tumores a -80°C.

d) Las rebanadas de tumor de 20  $\mu$ m se realizaron haciendo uso del criostato (ver figura 20).





**Figura 20.** Metodología utilizada para la obtención de rebanadas de tumor de 20 µm usando el criostato.

## 8.6 Tinción de hematoxilina-eosina (H&E)

Con el fin de visualizar la histología de los tumores, se realizó una tinción de H&E. Los núcleos se tiñen de color azul (el núcleo es afín a un colorante básico, hematoxilina), mientras que el citoplasma se tiñe de color rosado (el citoplasma es afín a un colorante ácido, eosina)<sup>173,174</sup>.

- a) Los cortes se hidrataron en agua destilada durante 2 min.
- b) Las rebanadas de los tumores se tiñeron con una solución de hematoxilina de Harris por 4 min.
- c) Se realizaron 3 lavados rápidos con alcohol ácido. Seguidos de 3 lavados rápidos con agua corriente.
- d) Las rebanadas de los tumores se lavaron durante 4 min en agua amoniacal. Después, se lavaron con agua corriente durante 10 min. Posteriormente, los cortes se lavaron por 2 min en etanol al 70°.
- e) Los cortes se colocaron en una solución de Eosina al 0.2% durante 6 min.
- f) Posteriormente, las rebanadas de tumor se lavaron por 2 min en etanol al 80°. Después se lavaron con etanol al 95°, durante 2 min. En seguida, se lavaron en etanol al 100° dos veces, durante 2 min cada lavado. Finalmente, se realizaron dos lavados con xileno, de 2 min cada lavado.



- g) Los cortes fueron fijados con 80  $\mu$ L del medio de montaje Cytoseal 60 (8310-4, Thermo Scientific). Inmediatamente, el cubreobjetos se colocó y se selló con barniz.
- h) Finalmente, las muestras se visualizaron en un microscopio de campo claro (Olympus Bx43).

## 8.7 Determinación de figuras mitóticas

Para poder determinar la proliferación celular, los núcleos de las muestras se tiñeron con Hoechst 33342, para cuantificar el número de células en mitosis. Teniendo como referencia el artículo publicado por Sawant M. S., *et al.*, 2017<sup>175</sup> y el de Jia L., *et al.*, 2020<sup>176</sup>, se detectaron y cuantificaron a las células en mitosis que se encontraban en la profase, la metafase y la anafase.

- a) Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 (H3569, Thermo Scientific) a la concentración de 0.1  $\mu$ g/mL, en TBS-Tween 0.1% y albúmina al 5%, durante 7 min. Posteriormente, la solución de Hoechst 33342 se removió y se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 0.1%, durante 5 min en agitación.
- b) Los cortes en los portaobjetos fueron fijados con 80  $\mu$ L del medio de montaje Antifade Mounting Medium H-100 (ab104135, VECTASHIELD). Inmediatamente, el cubreobjetos se colocó y se selló con barniz.
- c) Finalmente, las muestras se visualizaron en el microscopio de fluorescencia (Olympus Bx43).
- d) El índice mitótico (*IM*) se calculó con la fórmula siguiente<sup>177</sup>:

$$IM = \frac{\text{células en mitosis}}{\text{células totales por campo}} \times 100\%$$

## 8.8 Detección de la PKC $\alpha$ y el PR fosforilado en la Ser400

Con el fin de detectar a PKC $\alpha$  en el núcleo y a PR fosforilado en la Ser400 se realizaron inmunofluorescencias (ver *figura 21*).





**Figura 21.** Metodología utilizada para las inmunofluorescencias, entre cada paso se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 0.1%, cada lavado se realizó durante 5 min en agitación.

- Para identificar a los antígenos correspondientes; se expusieron a los epítopes, hirviendo las rebanadas de tumor en una solución de citrato de sodio (10 mM, pH= 6.0), durante 60 min. Después, se dejaron enfriar a temperatura ambiente las laminillas.
- Las muestras fueron permeabilizadas con metanol al 100% a  $-4^{\circ}\text{C}$ , durante 10 min. En seguida, se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 0.1%.
- Los antígenos inespecíficos se bloquearon con albúmina al 5% en TBS-Tween 0.1%, durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ , en cámara húmeda.
- Los anticuerpos primarios: anti-PKC $\alpha$  de ratón (sc-8393, Santa Cruz Biotechnology) a la concentración de  $2\ \mu\text{g}/\text{mL}$  y anti-phosphoS400PR de conejo (ab60954, abcam) a la concentración de  $1.3\ \mu\text{g}/\text{mL}$ , se añadieron en TBS-Tween 0.1% y albúmina al 5%. Se incubó a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 24 h en cámara húmeda. Posteriormente, los anticuerpos primarios se removieron y se



realizaron 3 lavados con TBS-Tween 0.1%, cada lavado se realizó durante 5 min en agitación.

e) Los anticuerpos secundarios: anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (A11001, Thermo Fisher Scientific) a la concentración de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , y anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 594 (R37117, Thermo Fisher Scientific) a la concentración de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se adicionaron en TBS-Tween 0.1% y albúmina al 5%. Las laminillas se incubaron en la oscuridad durante 60 min, en cámara húmeda a temperatura ambiente. En seguida, los anticuerpos secundarios se removieron y se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 0.1%, cada lavado se realizó durante 5 min en agitación.

f) Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 a la concentración de 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (H3569, Thermo Scientific), en TBS-Tween 0.1% y albúmina al 5%, durante 7 min. Posteriormente, la solución de Hoechst 33342 se removió y se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 0.1%, cada lavado se realizó durante 5 min en agitación.

g) Los cortes en los portaobjetos fueron fijados con 80  $\mu\text{L}$  del medio de montaje Antifade Mounting Medium H-100 (ab104135, VECTASHIELD). Inmediatamente, el cubreobjetos se colocó y se selló con barniz.

h) Para detectar la fluorescencia de los anticuerpos secundarios y Hoechst 33342 (H3569, Thermo Scientific), las muestras se visualizaron en un microscopio de fluorescencia (Olympus Bx43), usando diferentes longitudes de onda para excitar a los fluorocromos.

## 8.9 Análisis de imágenes

Se tomaron campos al azar por cada ratón, en cada pie de figura se indica el número de ratones y el número de campos contabilizados. Se cuantificó en porcentaje de células positivas a PKC $\alpha$  nuclear y a PR-pSer400, así como el índice mitótico usando el programa Image J 1.52a (Instituto Nacional de Salud, USA).

## 8.10 Análisis estadístico

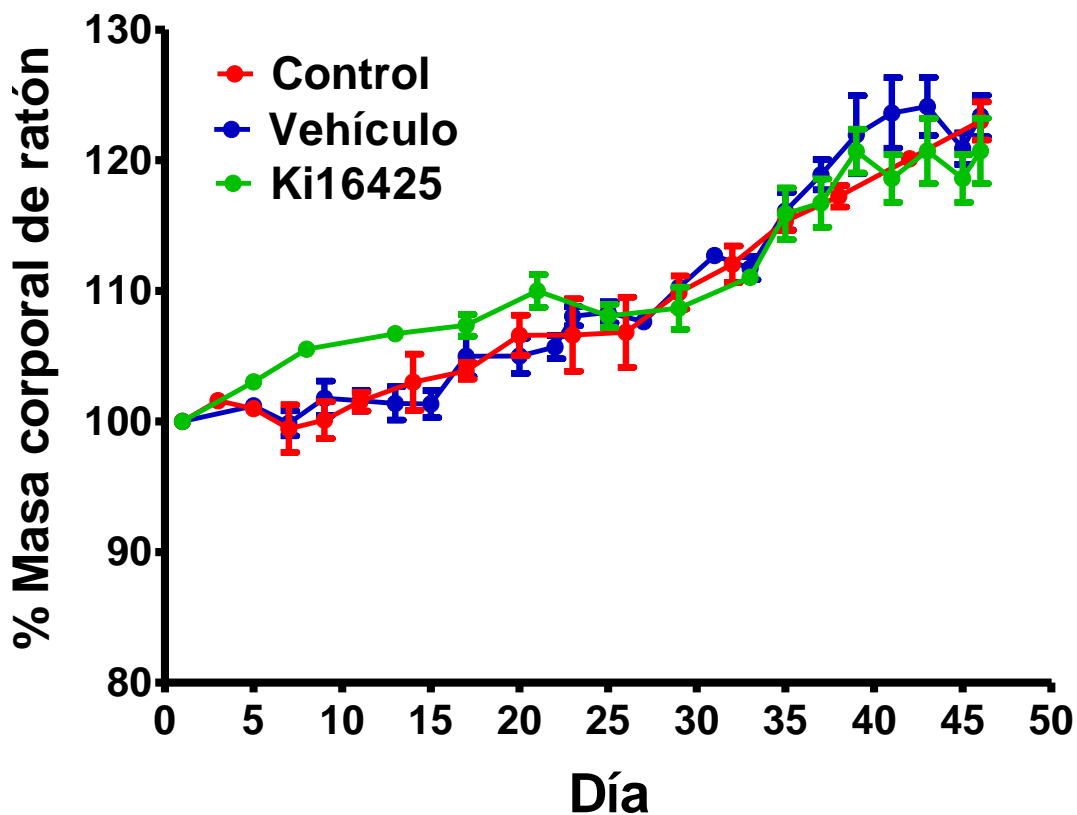
Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  EE del porcentaje de la masa corporal del ratón, el volumen del tumor, la masa del tumor, la densidad del tumor, el índice mitótico, y el porcentaje de células positivas a PKC $\alpha$  nuclear y PR-pSer400, respectivamente. Para determinar si existe una diferencia estadística significativa entre los resultados obtenidos, se empleó el método de ANOVA, seguido de la prueba de Bonferroni. Los datos fueron analizados mediante el software GraphPad Prism 5.0.



## 9.0 Resultados

Se administró Ki16425, un antagonista para LPA<sub>1</sub><sup>168</sup>, para determinar si la inhibición de este receptor impacta en el desarrollo tumoral, en la proliferación celular, y en la localización de la PKC $\alpha$ , así como en la fosforilación de PR en la Ser400.

Los ratones fueron pesados cada tercer d, desde el d de la inoculación hasta el d del sacrificio, se monitoreo la masa corporal de los ratones con el fin supervisar la salud de estos. Como se puede observar en la *figura 22*, la administración del vehículo o de Ki16425, no indujeron la pérdida de la masa corporal de los ratones.

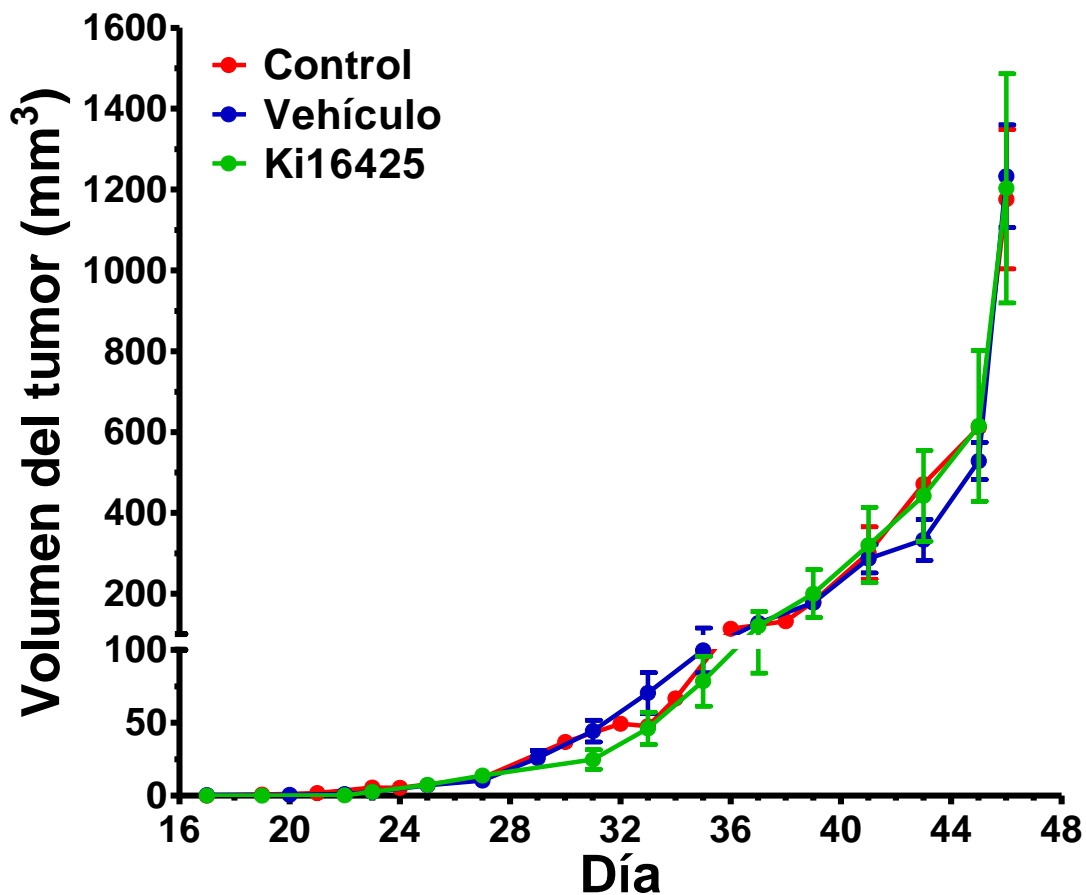


**Figura 22.** El tratamiento con el vehículo o Ki16425, no inducen la pérdida de la masa corporal de los ratones. Monitoreo del porcentaje de la masa corporal (relativo al d 1, d de la inoculación) de los ratones durante 46 d (d del sacrificio), los



tratamientos comenzaron en el d 33. El gráfico representa la media  $\pm$  EE. Grupo control:  $n=3$ ; vehículo:  $n=3$ ; Ki16425:  $n=3$ .

Al d 33 después de la inoculación de las células U251 en los ratones NSG, los tumores alcanzaron un tamaño de  $\sim 50 \text{ mm}^3$ , fue entonces cuando se inició el tratamiento (ver figura 18 y tablas 3). La administración de Ki16425 no modificó el tamaño del tumor de los ratones NSG comparado con los grupos control y vehículo (ver figura 23).



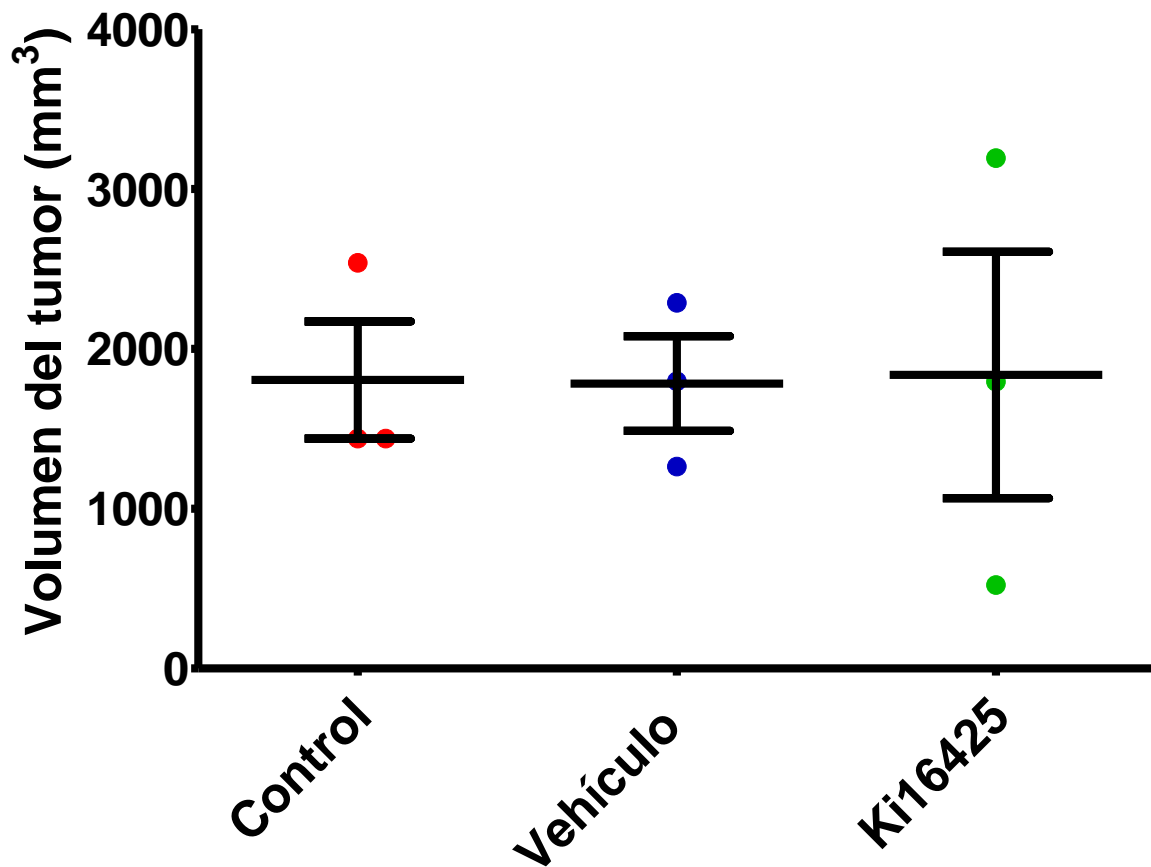
**Figura 23.** La administración de Ki16425 no modifica el tamaño del tumor. Monitoreo del crecimiento del tumor después de la inoculación de  $2.5 \times 10^6$  células U251/100  $\mu\text{L}$  de PBS a los ratones NSG. El tumor se comenzó a detectar al d 17 post-inoculación, el inicio de la administración del vehículo o Ki16425 comenzó cuando el tumor presentó un volumen de  $\sim 50 \text{ mm}^3$  (d 33). Finalmente, los ratones





fueron sacrificados al d 46. El gráfico representa la media  $\pm$  EE. Grupo control:  $n=3$ ; vehículo:  $n=3$ ; Ki16425:  $n=3$ .

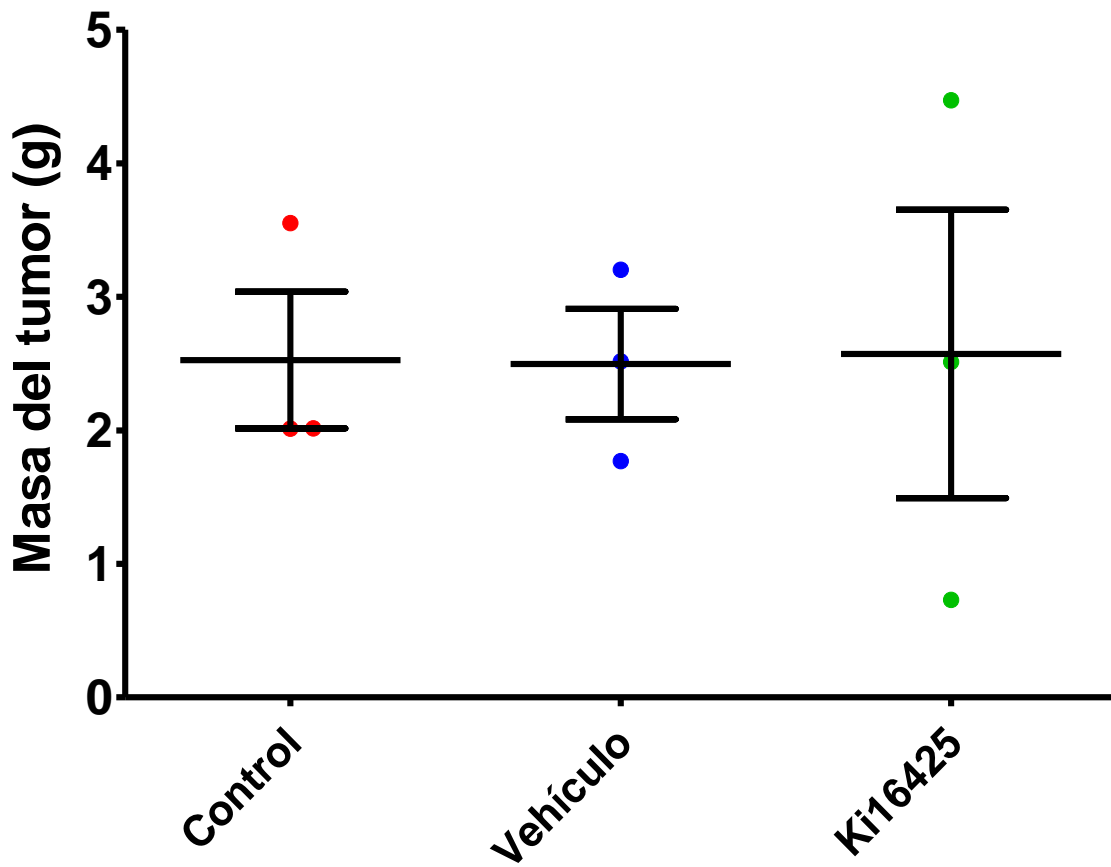
Consistente a lo observado en la *figura 23*, cuando se determina el volumen de los tumores por un método adicional al de la medición del tumor con un vernier, es decir, por el método de desplazamiento de volumen, no se observan cambios en el tamaño del tumor al administrar Ki16425 a los ratones (ver *figura 24*).



**Figura 24.** La administración de Ki16425 no disminuye el volumen del tumor. Volumen de los tumores al d de sacrificio de los ratones (d 46). El gráfico representa la media  $\pm$  EE. Grupo control:  $n=3$ ; vehículo:  $n=3$ ; Ki16425:  $n=3$ .

Adicionalmente, la masa de los tumores de cada ratón se determinó al d del sacrificio (d 46), como se puede observar en la *figura 25*, no existe diferencia significativa en la masa de los tumores del grupo Ki16425, respecto al grupo control y al vehículo.

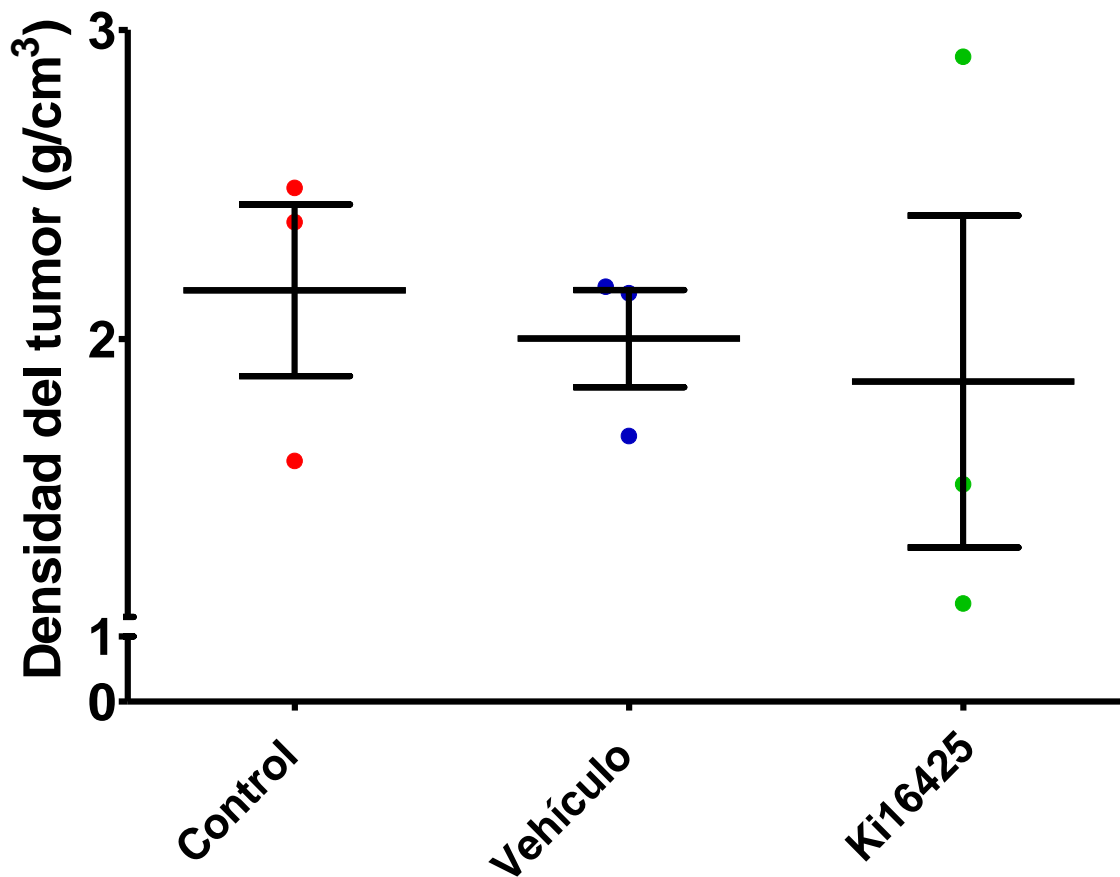




**Figura 25.** La administración de Ki16425 no tiene efecto en la masa del tumor. Masa de los tumores al d de sacrificio de los ratones (d 46). El gráfico representa la media  $\pm$  EE. Grupo control: n=3; vehículo: n=3; Ki16425: n=3.

Después, se calculó la densidad de los tumores de los ratones al d del sacrificio (ver figura 26). Observamos que la administración de Ki16425 no repercutió en la densidad del tumor comparado con el control y vehículo.



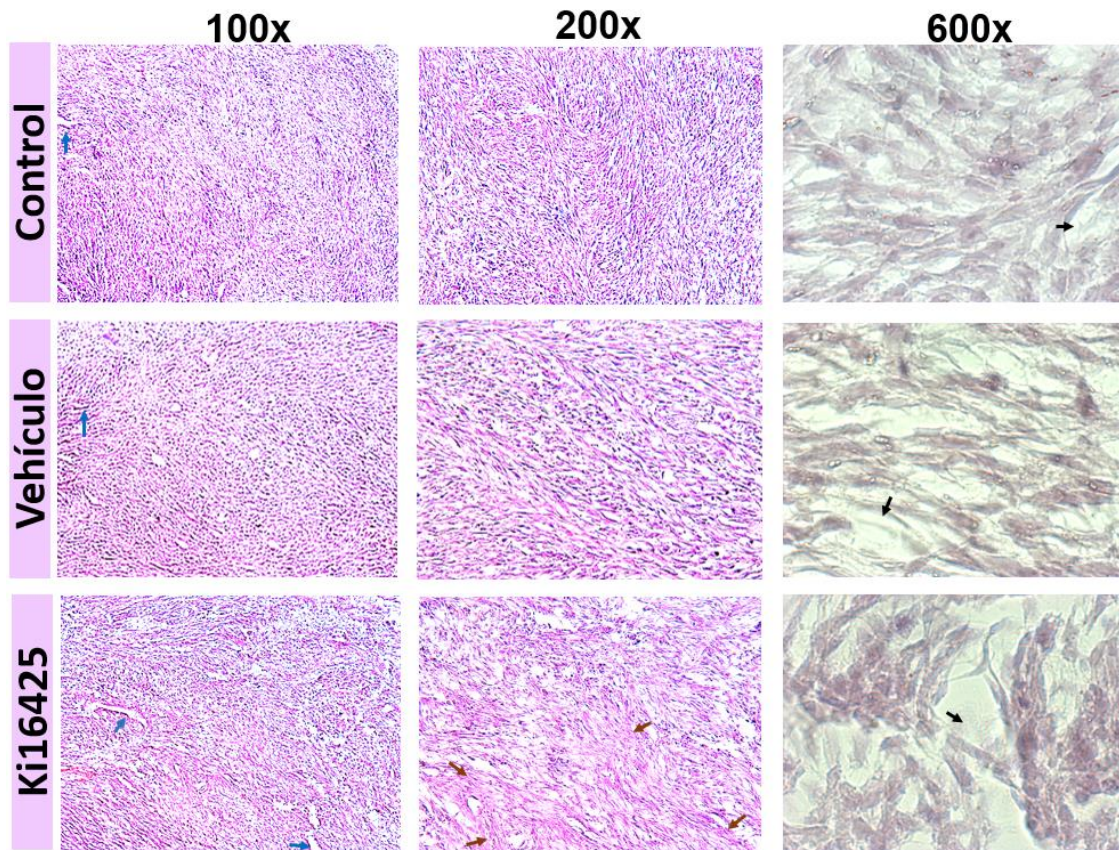


**Figura 26.** La administración de Ki16425 no modifica la densidad de los tumores, en comparación con el control y el vehículo. Densidad de los tumores al d de sacrificio de los ratones (d 46). El gráfico representa la media  $\pm$  EE. Grupo control:  $n=3$ ; vehículo:  $n=3$ ; Ki16425:  $n=3$ .

Posteriormente, se realizaron tinciones de H&E para observar la histología de los tumores derivados de la inoculación de células U251 en los ratones NSG. En la *figura 27*, se observa que los tumores derivados del xenoinjerto de las células U251 a ratones NSG, presentan un alto desorden celular, es decir, las células crecen en todas direcciones. Las zonas pseudoempalizadas, se indican con flechas azules, estas zonas representan una ola de células tumorales que migran activamente alejándose de un área de hipoxia, las células forman una especie de valla que sirve para cercar o no una zona necrótica<sup>51,55</sup>. La tinción de H&E del corte del tumor a un aumento de 200x del ratón que fue tratado con Ki16425, presenta zonas fibróticas



(señaladas con flechas cafés); a un aumento de 600x se observa zonas de espacio intercelular más grandes (flechas negras), en comparación con el control y el vehículo; los espacios intercelulares, son las regiones entre las células, donde no se observan núcleos, zonas ocupadas generalmente por matriz extracelular<sup>173</sup>.

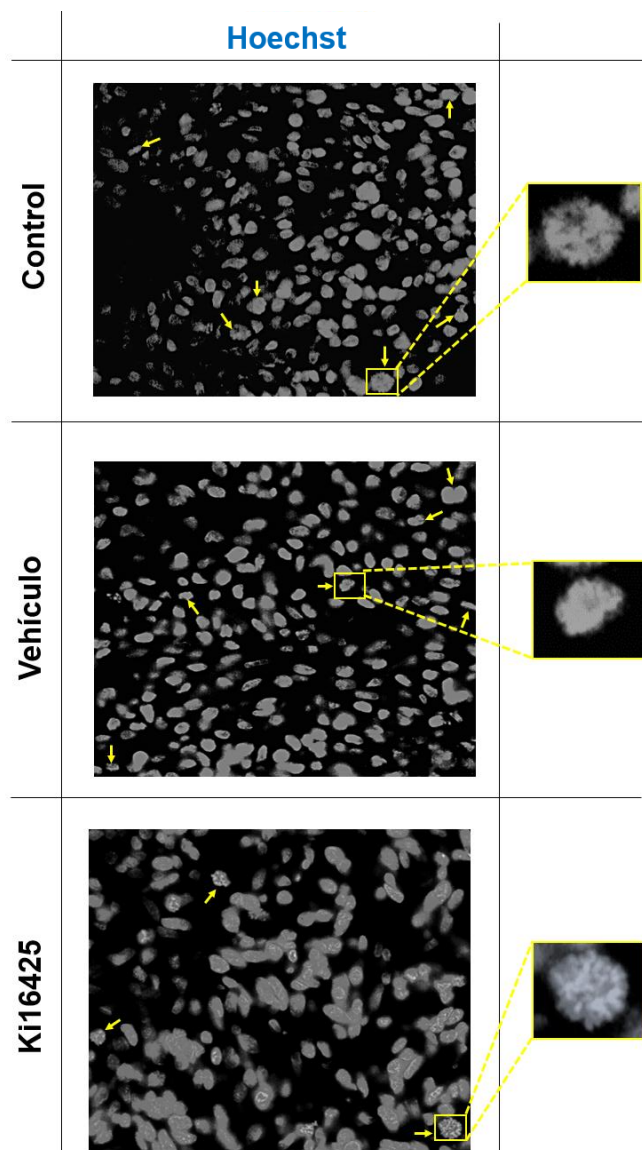


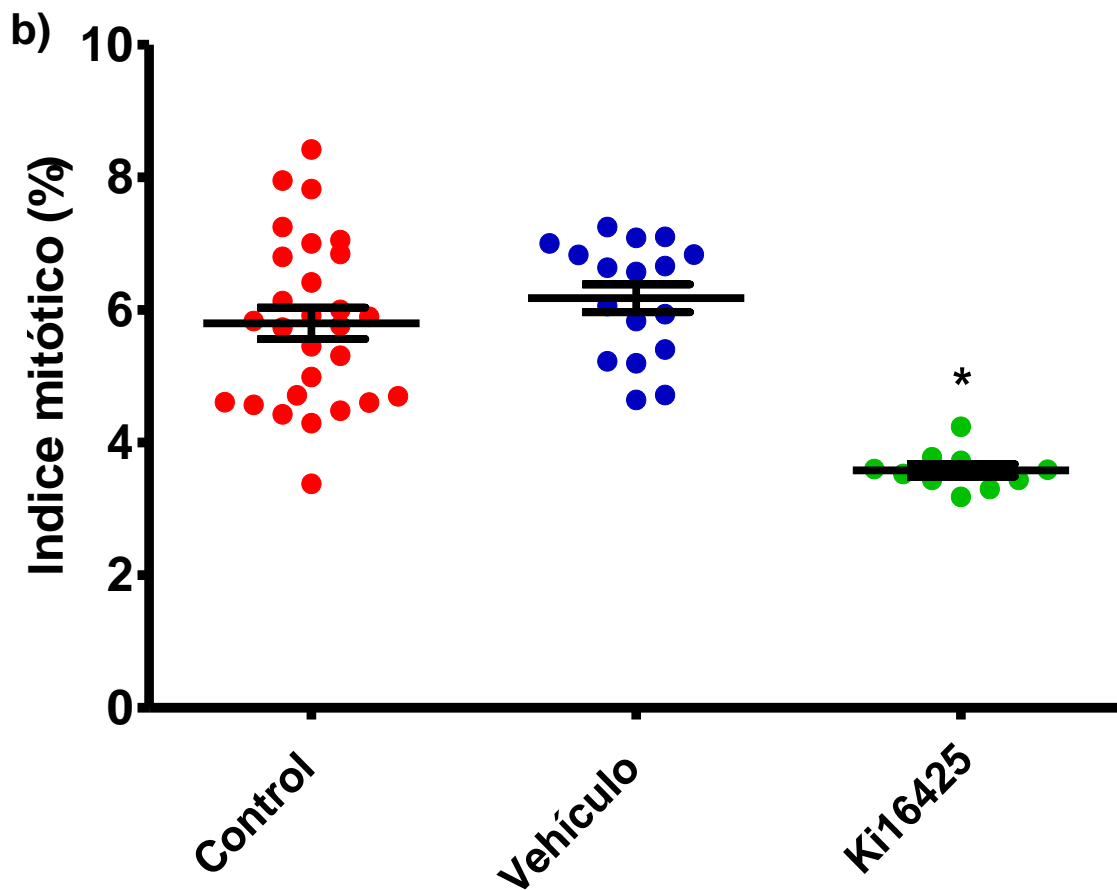
**Figura 27.** Tinción de H&E de los cortes de los tumores derivados del xenoinjerto de las células U251 en los ratones NSG (control, vehículo y Ki16425) de un campo elegido al azar de un ratón por cada grupo. Primera columna: aumento a 100x, segunda columna: aumento a 200x, tercera columna: aumento a 600x. Se observa una densa celularidad y un alto desorden celular en los tumores. Las zonas de fibrosis son señaladas con flechas de color café, y las zonas pseudoempalizadas, con flechas azules. Mientras que los espacios intercelulares están indicados con flechas negras.

En las rebanadas del tumor tratado con Ki16425 se pueden apreciar zonas fibróticas y espacios intercelulares que son más grandes, en comparación con las muestras control y vehículo, respectivamente.

Con el fin de conocer si la inhibición del LPA<sub>1</sub> influye en la proliferación celular de los tumores de nuestro modelo murino, el índice mitótico (IM) se determinó en cada uno de los tumores. Como se puede observar en la *figura 28*, no existe diferencia significativa en los valores del IM (%) entre el grupo control y el grupo vehículo. La administración de Ki16425, disminuyó 40.23% el IM, en comparación con el grupo control y el vehículo.

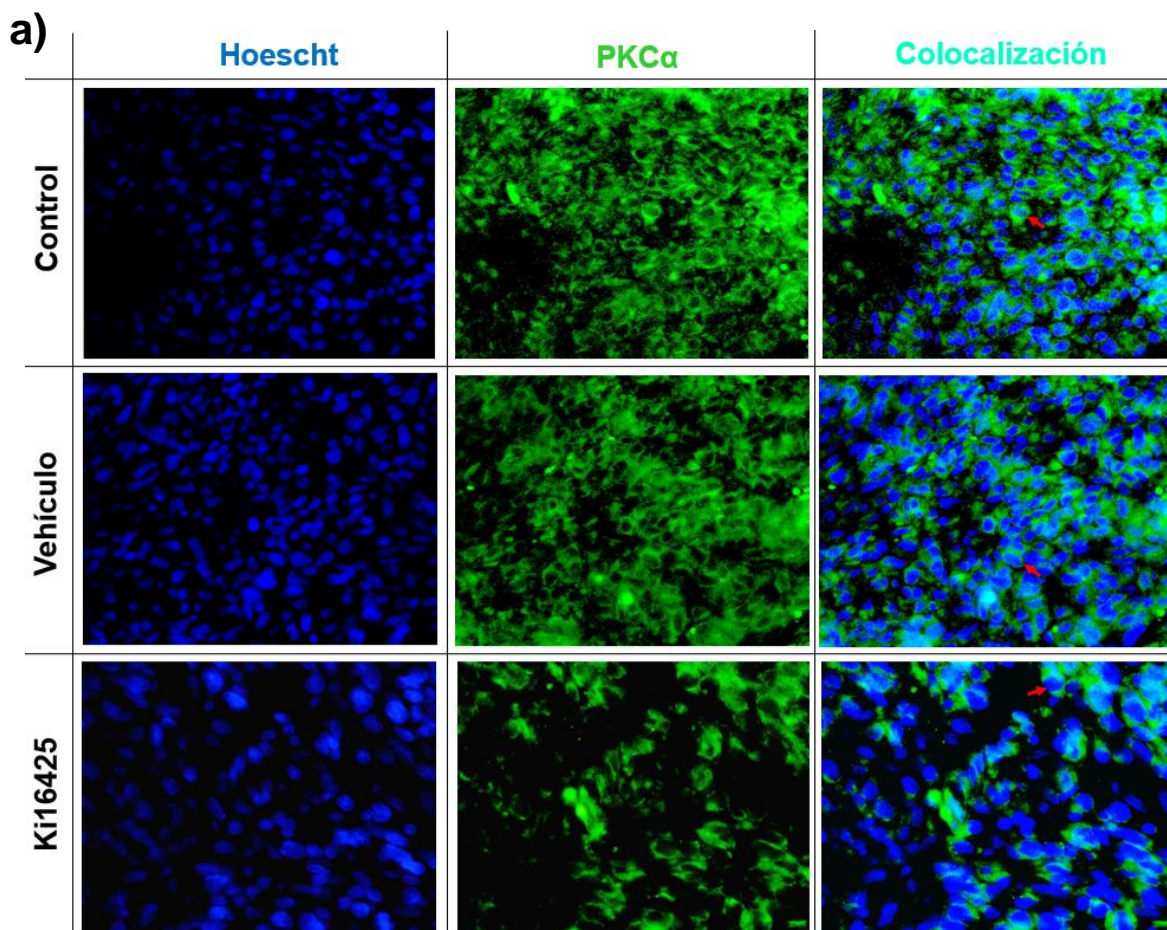
a)

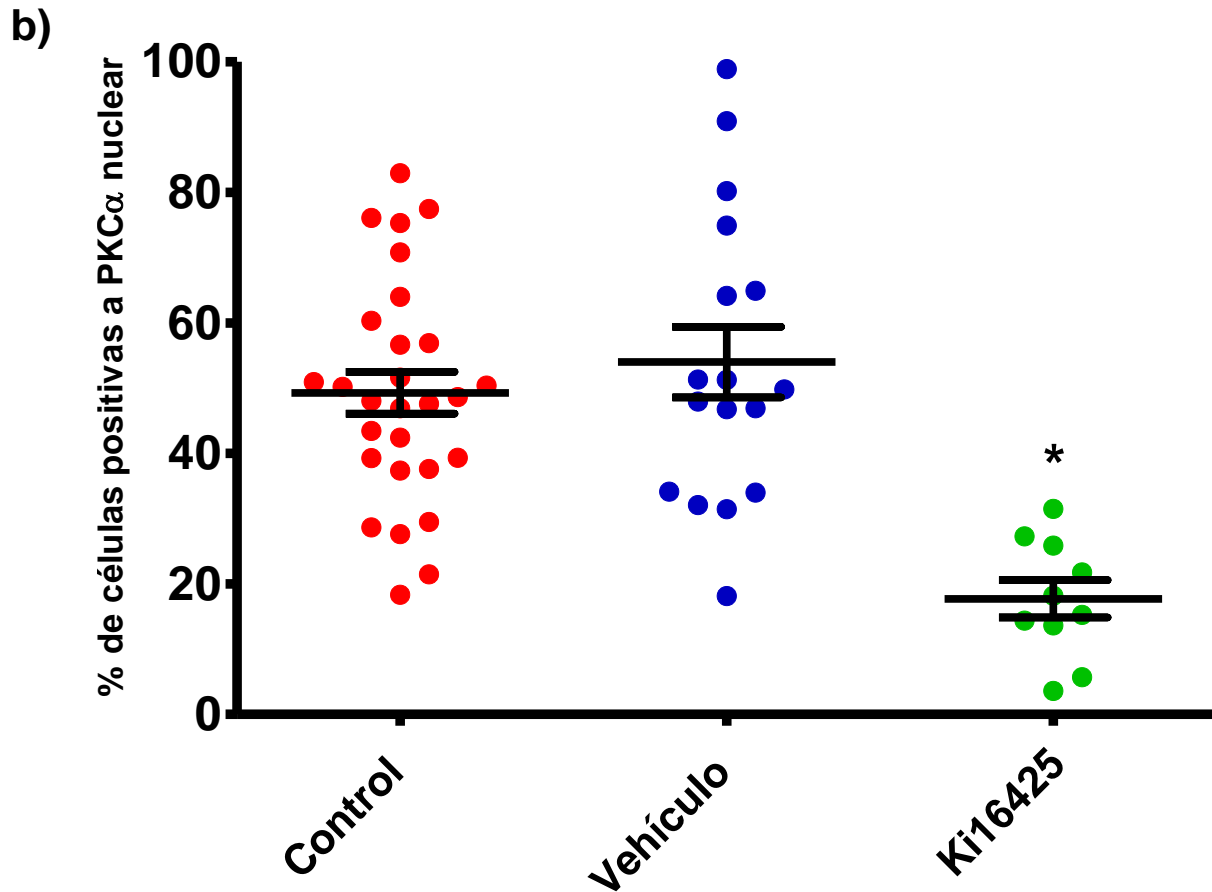




**Figura 28.** La administración de Ki16425, disminuye el índice mitótico (%). a) Fotografías tomadas con un microscopio de fluorescencia de núcleos teñidos con Hoechst, las flechas amarillas indican a las células que están en mitosis en los cortes de los tumores, de los grupos control, vehículo y Ki16425, respectivamente. Para que se puedan apreciar mejor a las células en mitosis, las fotografías se muestran en escala de grises. Las fotografías fueron tomadas a un aumento de 600x. b) Índice mitótico de los grupos control, vehículo y Ki16425. El número de células por campo se cuantificó, posteriormente, las células en mitosis (en las fases: profase, metafase y anafase) se contaron y el índice mitótico se determinó, el cual se reporta en porcentaje. El gráfico representa la media  $\pm$  EE de diferentes campos de los grupos control (ratón 1= 15 campos, ratón 2= 13 campos), vehículo (ratón 1= 10 campos, ratón 2= 7 campos) y Ki16425 (ratón 1= 10 campos). Con la prueba de ANOVA, seguida de la prueba de Bonferroni se determinó la diferencia significativa  $*p < 0.05$  vs control y vehículo.

Haciendo uso de la técnica de inmunofluorescencia, se detectaron a las células positivas a PKC $\alpha$  en el núcleo (ver *figura 29*), las cuales presentan una marca de color cian, debido al empalme entre el núcleo (azul) y la PKC $\alpha$  (verde). La administración de Ki16425 disminuyó 67.41% el porcentaje de células positivas a PKC $\alpha$  nuclear, en comparación con el control y el vehículo. No existe diferencias significativas entre el porcentaje de células positivas a PKC $\alpha$  nuclear entre el grupo control y el vehículo.



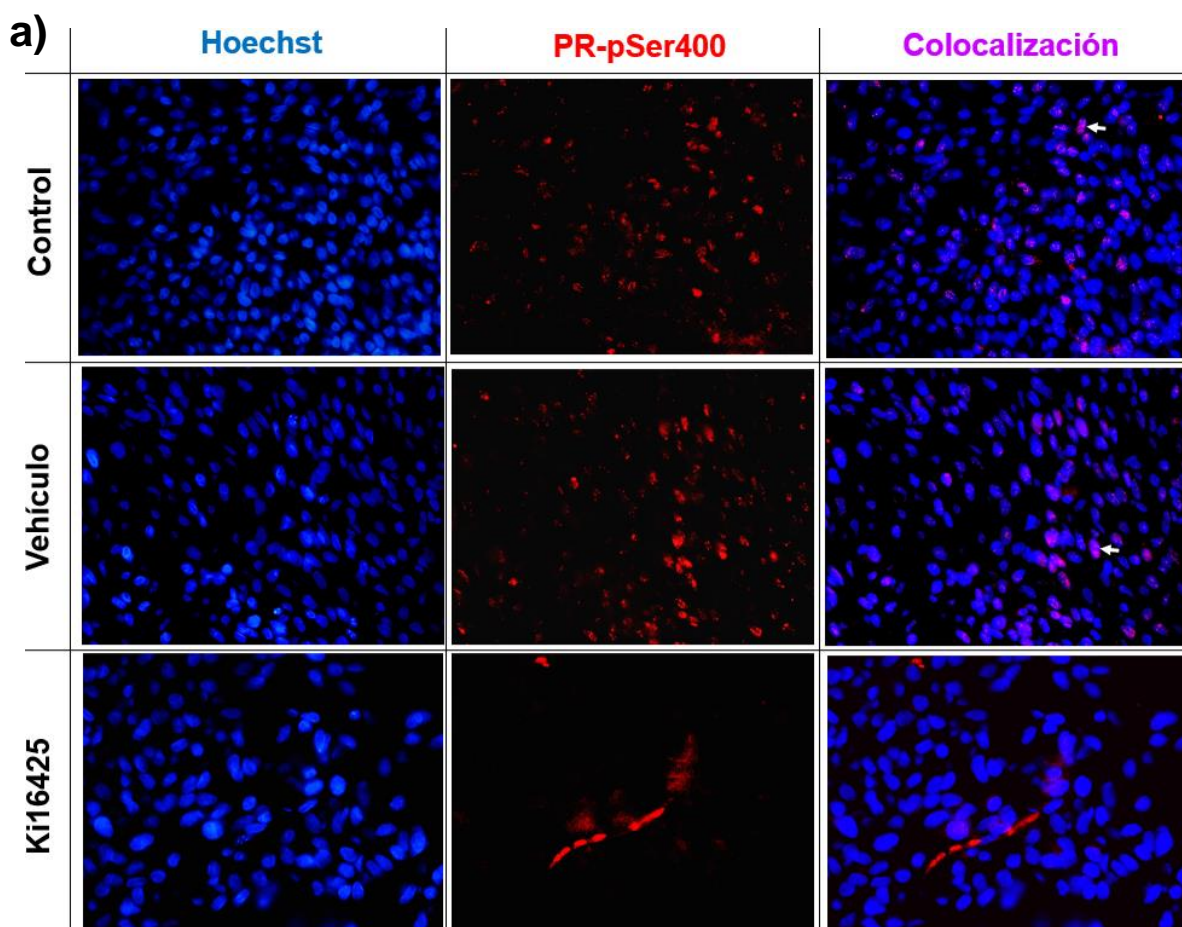


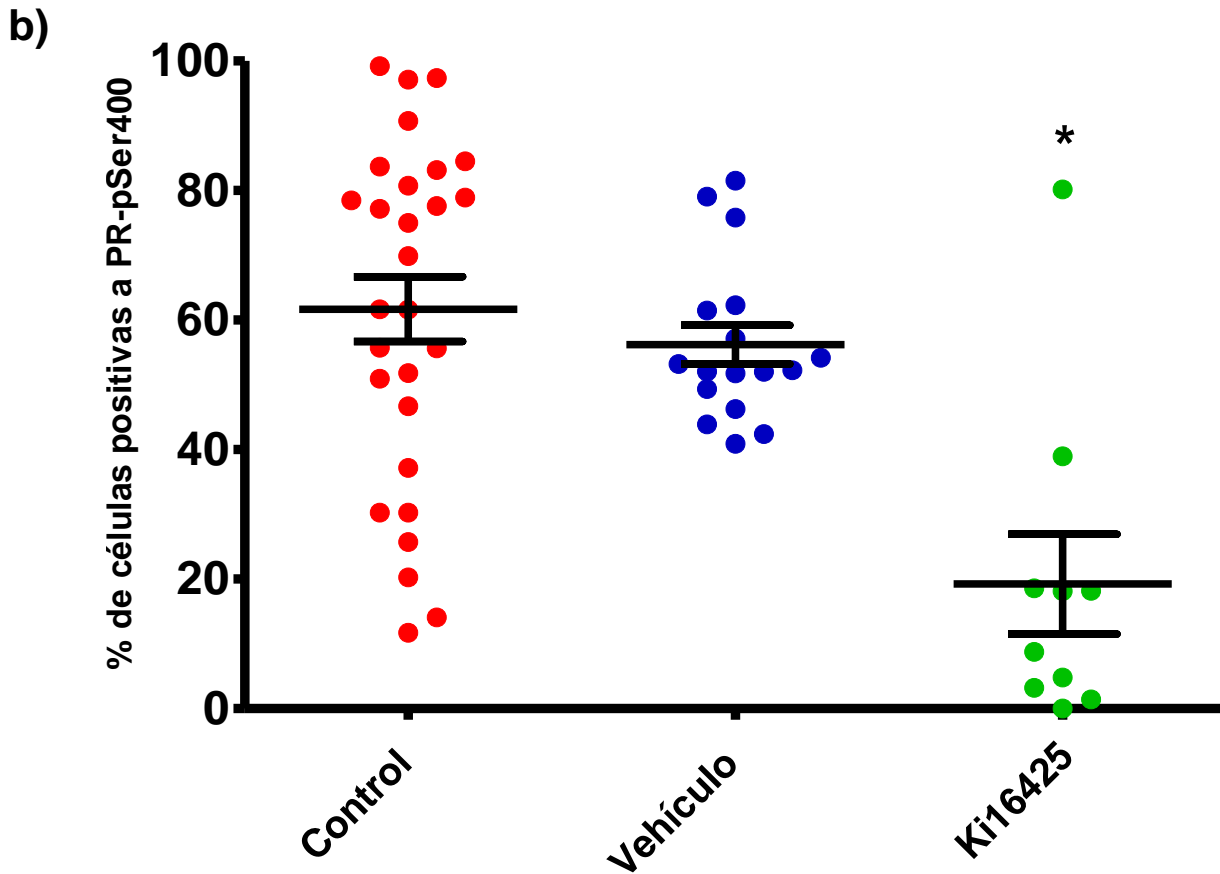
**Figura 29.** La administración de Ki16425 disminuye la localización nuclear de la PKC $\alpha$ . a) Imágenes de los grupos analizados (control, vehículo y Ki16425). En azul se muestran los núcleos teñidos con Hoechst, en verde la marca para la PKC $\alpha$ ; el empalme entre estas dos marcas es de color cian, la marca color cian indica que las células son positivas a PKC $\alpha$  en núcleo (indicadas con flechas color rojo, solo se muestra una sola flecha por imagen para no saturar a esta). Las fotografías fueron tomadas a un aumento de 600x. b) Porcentaje de células positivas a PKC $\alpha$  en núcleo de los grupos control, vehículo y Ki16425. El número de células por campo se cuantificó, posteriormente, las células en las que había marca de PKC $\alpha$  en el núcleo se contaron; finalmente, el porcentaje de células positivas a PKC $\alpha$  en núcleo se determinó. El gráfico representa la media  $\pm$  EE de diferentes campos de los grupos control (ratón 1= 15 campos, ratón 2= 13 campos), vehículo (ratón 1= 10 campos, ratón 2= 7 campos) y Ki16425 (ratón 1= 10 campos). Con la prueba de



ANOVA, seguida de la prueba de Bonferroni se determinó la diferencia significativa  $*p < 0.05$  vs control y vehículo.

Para detectar al PR-pSer400 en los cortes de los tumores se realizaron inmunofluorescencias (ver figura 30), se cuantificó el número de células positivas a PR-pSer400, las cuales presentan una marca de color magenta, debido al empalme entre el núcleo (azul) y el PR-pSer400 (rojo). La administración del vehículo no repercutió en el porcentaje de células positivas a PR-pSer400. El tratamiento con Ki16425 disminuyó 65.70% el porcentaje de células positivas a PR-pSer400, respecto al grupo control y al vehículo.





**Figura 30.** La administración de Ki16425, disminuye la fosforilación del PR en la Ser400. a) Imágenes de los grupos analizados (control, vehículo y Ki16425). En azul se muestran los núcleos teñidos con Hoechst, en rojo la marca para el PR-pSer400; el empalme entre estas dos marcas es de color magenta, la marca color magenta indica que las células son positivas a PR-pSer400 en núcleo (indicadas con flechas color blanco, solo se muestra una sola flecha por imagen para no saturar a esta). Las fotografías fueron tomadas a un aumento de 600x. b) Porcentaje de células positivas a PR-pSer400 de los grupos control, vehículo y Ki16425. El número de células por campo se cuantificó, posteriormente, las células en las que había marca a PR-pSer400 en el núcleo se contaron; finalmente, el porcentaje de células positivas a PR-pSer400 se determinó. El gráfico representa la media  $\pm$  EE de diferentes campos de los grupos control (ratón 1= 15 campos, ratón 2= 13 campos), vehículo (ratón 1= 10 campos, ratón 2= 7 campos) y Ki16425 (ratón 1= 10 campos).

Con la prueba de ANOVA, seguida de la prueba de Bonferroni se determinó la diferencia significativa  $*p < 0.05$  vs control y vehículo.

## 10.0 Discusión de resultados

En el presente trabajo se realizó un xenoinjerto heterotópico, de las células U251, en los ratones inmunodeprimidos NSG. Lo anterior, se realizó con el fin de observar si el antagonismo de LPA<sub>1</sub> disminuye el tamaño del tumor, el IM, y la activación de PKC $\alpha$  y RP, respectivamente.

Aunque no se administró un agonista para activar a LPA<sub>1</sub>; anteriormente, se reportó que las células U251, tienen un alto contenido de ATX, y la secretan al medio de cultivo<sup>16</sup>. La ATX es la enzima que genera al LPA<sup>9,14,15,65</sup>; lo que sugiere una producción aumentada del LPA en este tipo de células, lo cual puede contribuir a la activación del LPA<sub>1</sub> en nuestro modelo.

No encontramos diferencia significativa entre el tamaño, la masa y la densidad, respectivamente; de los tumores de los ratones tratados con Ki16425, en comparación con los grupos control y vehículo. Sin embargo, al realizar las tinciones de H&E, se encontró que los tumores tratados con Ki16425, presentan zonas de fibrosis, las cuales pueden deberse al desarrollo excesivo de componentes de la MEC<sup>173,178,179</sup>, siendo efecto de un proceso de reparación del tejido y restauración de la función de este<sup>178</sup>; en este proceso participan fibroblastos<sup>180-183</sup>, miofibroblastos<sup>180,184,185</sup>, neutrófilos<sup>181,186-188</sup>, monocitos<sup>181,186,189</sup>, y macrófagos<sup>180-183</sup>. La presencia de zonas fibróticas en los tumores de los ratones tratados con Ki16425 podrían aumentar la masa, el volumen y la densidad de los tumores e incluso igualarla a la del grupo control y a la del vehículo, respectivamente.

Creemos que otra razón que puede contribuir a que no se observó una disminución ni en el tamaño, ni en la masa, ni en la densidad de los tumores de los ratones tratados con Ki16425 puede deberse a la infiltración de neutrófilos y monocitos al tumor. Las células inmunes que permanecen en los ratones NSG, son neutrófilos y monocitos<sup>160</sup>; cuando existe un daño en el tejido estas células se infiltran en las



zonas dañadas<sup>181,190-192</sup>, y juegan un papel crucial en la remodelación de tejidos, y en la fibrosis<sup>181,186-189</sup>. Sin embargo, faltarían realizar experimentos para afirmar la presencia de los neutrófilos y los monocitos en los tumores de los ratones administrados con Ki16425.

En 2018, Loskutov Y. V., y colaboradores realizaron ensayos *in vivo* con ratones NSG, inocularon subcutáneamente células derivadas de pacientes con GBM (GBM6 o GBM12) en los flancos de los ratones, administraron Ki16425 (30 mg/kg) vía intraperitoneal, diariamente durante 4 a 5 semanas<sup>6</sup>. Dos semanas después de haber comenzado el tratamiento, observaron que la administración de Ki16425 disminuía el tamaño del tumor, al final del tratamiento el tamaño y la masa del tumor disminuyeron dos veces en comparación con el grupo vehículo, sugiriendo la participación del LPA<sub>1</sub> en el crecimiento tumoral de los GBMs<sup>6</sup>. Aunque Loskutov Y. V. y colaboradores reportaron que el tratamiento con Ki16425 a ratones con xenoinjertos de células derivadas de pacientes con GBM, disminuyó el tamaño y la masa del tumor<sup>6</sup> en el presente trabajo con el esquema de tratamiento utilizado (ver *figura 18* y *tabla 3*), no se observó una disminución ni en el volumen del tumor, ni en la masa del tumor al administrar Ki16425.

La concentración de LPA en suero de pacientes con cáncer de próstata es mayor, en comparación con pacientes sanos<sup>193</sup>; además, se ha reportado que el LPA a través de LPA<sub>1</sub> regula, la migración<sup>194</sup> y la proliferación<sup>195</sup> de células derivadas de cáncer de próstata. Sin embargo, en estudios previos (ver *tabla 4*) se ha reportado que la administración de Ki16425 durante pocos d (5 d) a ratones inoculados con células de cáncer de próstata (PC-3), no disminuye el tamaño del tumor, no obstante, existe una disminución del HB-EGF (factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina)<sup>82</sup>. El HB-EGF participa en la proliferación<sup>196,197</sup>, la migración<sup>196</sup>, la invasividad<sup>196</sup> celular; la metástasis<sup>197</sup> y la angiogénesis<sup>197</sup>, así como en la progresión tumoral<sup>196-198</sup>; se encuentra sobreexpresado en tumores de próstata<sup>197,199</sup>, ovario<sup>196</sup>, etc. Se ha reportado que en los tumores y en el fluido ascítico obtenidos de las pacientes con cáncer de ovario contienen altas concentraciones de la proteína HB-EGF<sup>196</sup>. La expresión del HB-EGF está asociada



con un tiempo de supervivencia corto de las pacientes con cáncer de ovario<sup>196</sup>. Lo anterior, sugiere que el HB-EGF está involucrado en el desarrollo y la progresión de los tumores de próstata y ovario.

En otro estudio, reportan que el tratamiento con Ki16425, cada dos días un total de 5 dosis, en ratones inmunodeficientes inoculados con células PC-3; no se observa una disminución en el tamaño del tumor, pero disminuye la metástasis a nódulos linfáticos y la angiogénesis<sup>81</sup>. La metástasis es el movimiento de células tumorales desde un sitio primario para colonizar órganos distantes<sup>200,201</sup>, a través de la sangre o el sistema linfático<sup>201,202</sup>; este proceso es un contribuyente importante a la muerte de los pacientes con cáncer<sup>200</sup>. La angiogénesis, permite que las células cancerosas escapen del microambiente tumoral y se diseminen a sitios secundarios<sup>203</sup>. Dado que no se observan cambios en el tamaño del tumor bajo el esquema de administración de Ki16425 utilizado por Lin Y.-C. y colaboradores, ellos recomiendan que la duración de la dosificación de Ki16425 se debe indagar más a fondo para lograr disminuir el tamaño del tumor<sup>81</sup>.



**Tabla 4.** Comparación entre las diferentes metodologías y efectos de la administración de Ki16425 en ratones con un xenoinjerto heterotópico.

Cáncer	Línea celular / Número de células inoculadas	Cepa del Ratón	Dosis de Ki16425	Efectos de la administración de Ki16425	Referencia
Próstata	PC-3 / 1x10 <sup>6</sup> células	BALB/C desnudo, machos de 4 semanas de edad	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Inicio tratamiento: 35 d después de la inoculación.</li> <li>•Tratamiento: Ki16425 (25 mg/kg) vía subcutánea, diariamente, durante 5 d.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•No disminuye el tamaño del tumor.</li> <li>•Disminuye 28% los niveles de ARNm de HB-EGF, en comparación con el grupo vehículo.</li> <li>•Disminuye 44% la concentración de HB-EGF en el suero de los animales, en comparación con el grupo vehículo.</li> </ul>	82
	PC-3 / 2x10 <sup>6</sup> células	BALB/C desnudo	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Inicio tratamiento: 7 d después de la inoculación.</li> <li>•Tratamiento: Ki16425 (20 mg/kg), vía intraperitoneal, cada dos d, 5 dosis en total.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•No disminuye el tamaño del tumor, ni la masa del tumor.</li> <li>•No disminuye la densidad de los vasos sanguíneos, en comparación con el grupo vehículo.</li> <li>•Disminuye la metástasis 24.31% a nódulos linfáticos, en comparación con el grupo vehículo.</li> </ul>	81



<b>Carcinoma de células renales</b>	UMRC3 / 5x10 <sup>6</sup> células	BALB/C desnudo, hembras de 6 semanas de edad	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Inicio tratamiento: Cuando el volumen de tumor es ~100-200 mm<sup>3</sup>.</li> <li>•Tratamiento: Ki16425 (20 mg/kg), vía subcutánea, diariamente, durante 48 d.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Disminuye 60% el tamaño del tumor, en comparación con el grupo control.</li> <li>•Disminuye la proliferación celular y la angiogénesis, en comparación con el grupo control.</li> </ul>	83
	768-O / 5x10 <sup>6</sup> células	BALB/C desnudo, hembras de 6 semanas de edad	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Inicio tratamiento: cuando el volumen de tumor es ~100-200 mm<sup>3</sup>.</li> <li>•Tratamiento: Ki16425 (20 mg/kg), vía subcutánea, diariamente, durante 37 d.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Disminuye 67% el tamaño del tumor, en comparación con el grupo control.</li> <li>•Disminuye la proliferación celular y la angiogénesis en comparación con el grupo control.</li> </ul>	83
<b>Glioblastoma</b>	GBM6 (células derivadas de pacientes/ subtipo clásico) /100 µL de tumor disgregado en una mezcla 1:1 con matrigel	NSG, machos	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Inicio tratamiento: cuando el volumen de tumor es ~100 mm<sup>3</sup>.</li> <li>•Tratamiento: Ki16425 (30 mg/kg), vía intraperitoneal, diariamente, durante 5 semanas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Disminuye el tamaño del tumor a partir de la segunda semana de administración de Ki16425. Al final de tratamiento con Ki16425, el volumen del tumor disminuye dos veces, en comparación con el grupo vehículo.</li> <li>•Disminuye la masa del tumor dos veces, en comparación con el grupo vehículo.</li> </ul>	6



				<ul style="list-style-type: none"> <li>•Disminuye el porcentaje de células mitóticas dos veces, en comparación con el grupo vehículo.</li> </ul>	
	<p>GBM12 (células derivadas de pacientes/ subtipo mesenquimal) /100 µL de tumor disgregado en una mezcla 1:1 con matrigel</p>	<p>NSG, machos</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Inicio tratamiento: cuando el volumen de tumor es ~100 mm<sup>3</sup>.</li> <li>•Tratamiento: Ki16425 (30 mg/kg), vía intraperitoneal, diariamente, durante 4 semanas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disminuye el tamaño del tumor a partir de la segunda semana de administración de Ki16425. Al final de tratamiento con Ki16425, el volumen del tumor disminuye dos veces, en comparación con el grupo vehículo.</li> <li>•Disminuye la masa del tumor dos veces, en comparación con el grupo vehículo.</li> <li>•Disminuye el porcentaje de células mitóticas dos veces, en comparación con el grupo vehículo.</li> </ul>	<p>6</p>





Tratamientos durante periodos cortos con Ki16425, no disminuyen el tamaño del tumor, sin embargo, existe una disminución de factores asociados con la progresión del cáncer<sup>81,82</sup>. Su, S.-C., et al.<sup>83</sup>; y, Loskutov, Y. V., et al.<sup>6</sup>; observaron que al administrar Ki16425 diariamente y por periodos largos, disminuye el tamaño del tumor. Particularmente, en el trabajo del Loskutov, Y. V., y colaboradores, se observó que a partir de la segunda semana de tratamiento diario con Ki16425, se comienza a detectar una disminución del tamaño del tumor<sup>6</sup>. Aunado a lo anterior, se ha reportado que el tiempo de vida media del Ki16425 es muy corta ( $60 \pm 11.4$  min)<sup>204</sup>. En razón a lo anteriormente expuesto, se sugiere que, para poder observar una disminución del tamaño del tumor generado por la inoculación de células cancerígenas, la administración del tratamiento debe ser diario durante dos semanas como mínimo.

Los GBMs presentan alta actividad proliferativa<sup>2,205</sup>. Se ha descrito al LPA<sub>1</sub> como un potente mitógeno en células de GBM<sup>5,6,16,84</sup>. De acuerdo con Loskutov, Y. V. y colaboradores, la administración de Ki16425 a ratones con un xenoinjerto heterotópico de células derivadas de pacientes con GBM (GBM6 o GBM12), disminuye el porcentaje de las células mitóticas, aproximadamente 50%, en comparación con el vehículo<sup>6</sup>. En nuestro modelo, se encontró que al administrar Ki16425 el IM disminuye 40.23%, en comparación con el control y el vehículo. Las discrepancias entre los porcentajes de la disminución del IM pueden atribuirse a los distintos esquemas de tratamiento utilizados; o por las diferencias metodológicas entre los dos estudios, como por ejemplo, el grosor de la rebanada del tumor analizado<sup>206-208</sup>, la fijación del tejido<sup>177,206,209-211</sup>, el tipo de las líneas celulares o células derivadas de pacientes utilizadas para la inoculación de los ratones<sup>6,212,213</sup>, el número de campos contados<sup>177</sup>, las variaciones en el área de los HPFs (campos de alta potencia) de un microscopio a otro<sup>206-208,214</sup>, la percepción de los diferentes observadores al realizar el conteo<sup>208</sup> y las fases de la mitosis en las que se encontraban las células cuantificadas<sup>208</sup>.

La deposición de la MEC, así como la infiltración de neutrófilos y monocitos, pueden ser la razón del porque no se observó una disminución en el volumen, la masa y la



densidad, respectivamente, de los tumores tratados con Ki16425, en comparación con el control y el vehículo; aun cuando existe una disminución en la tasa de proliferación.

Al administrar Ki16425 en nuestro modelo *in vivo*, se observa que existe una disminución en el porcentaje de células positivas a PKC $\alpha$  nuclear, lo que indica una menor translocación de la PKC $\alpha$  al núcleo, lo anterior sugiere un menor grado de activación de la enzima, respecto al control y al vehículo. Estos datos son consistentes con lo reportado anteriormente, donde se observó que en las células U251 la translocación nuclear de PKC $\alpha$  es inducida por LPA y que el tratamiento con Ki16425 disminuye la localización de esta enzima en el núcleo<sup>16</sup>. Cabe mencionar, que se ha reportado que el tratamiento de LPA (100nM) + Ki16425 a diferentes concentraciones (2.5 y 5  $\mu$ M), durante 5 min, en células U251, no disminuye el contenido de PKC $\alpha$  en citosol<sup>16</sup>. Lo que podría sugerir que Ki16425 no tiene efectos en el contenido de PKC $\alpha$  en las células U251. Sin embargo, faltaría realizar estos experimentos a tiempos mayores, por ejemplo, a 15, 30, 45 y 60 min. No se recomienda que se realice a tiempos mayores de 1 h debido a que el tiempo de vida media del Ki16425 es de  $60 \pm 11.4$  min<sup>204</sup>.

En 2019, para poder estudiar el efecto de la PKC $\alpha$  en el número de células U251, Valdés-Rives S. A., y colaboradores, silenciaron la expresión de la cinasa con un siARN; el silenciamiento de la PKC $\alpha$  disminuye 30% el número de células, al realizar el tratamiento conjunto de Ki16425 y un siARN para la PKC $\alpha$ , no se observa un efecto aditivo o sinérgico. Lo anterior, sugiere que el LPA<sub>1</sub> puede inducir el aumento de las células U251, preferentemente a través de la activación de la PKC $\alpha$ . En línea con lo anteriormente descrito, en el presente trabajo, se encontró que al antagonizar al LPA<sub>1</sub> con Ki16425, se bloquea parcialmente la activación de la PKC $\alpha$ , lo que correlaciona con una disminución del IM. Sin embargo, se debe considerar que el número de células no necesariamente correlaciona con la proliferación celular, debido a que la proliferación celular implica una división celular, y en el conteo del número de células pueden incluirse algunas células que se encuentran en estado inactivo (quiescente)<sup>215,216</sup>, en este estado las células cumplen todas sus



funciones<sup>217</sup>, pero no tienen la capacidad de dividirse<sup>218,219</sup>; por lo tanto, es sería conveniente determinar en ensayos *in vitro* el IM en las células U251 al ser tratadas con Ki16425.

En ensayos *in vitro*, con la línea celular U251, se demostró que el LPA<sub>1</sub> activa a la PKC $\alpha$ , a su vez esta cinasa es capaz de fosforilar al PR en la Ser400<sup>16</sup>; la inhibición de LPA<sub>1</sub> con Ki16425 disminuye la fosforilación del PR en el residuo de serina 400<sup>16</sup>. Análogamente, en el presente trabajo se encontró que el porcentaje de células positivas a PR-pSer400, disminuye al administrar Ki16425 en comparación con el control y el vehículo, sugiriendo menor grado de activación del receptor.

La activación de la PKC $\alpha$  incrementa la fosforilación del PR en las células U251, induciendo la actividad transcripcional del PR<sup>21</sup>; lo que resulta en el incremento de la expresión del *PIBF*<sup>22,150</sup>, y de la *ciclina D1*<sup>148,149</sup>, genes blanco del PR que están involucrados en la proliferación de células de GBM. En nuestro modelo, se encontró que al administrar Ki16425 disminuye la fosforilación de PR en el residuo de la Ser400, asimismo, se observa la disminución del IM en estos tumores. Con base en lo expuesto anteriormente, se sugiere que al inhibir al LPA<sub>1</sub>, se inhibe la activación de la PKC $\alpha$ , en consecuencia, decrece la fosforilación del PR, por lo tanto, disminuye la transcripción de los genes *PIBF*, y *ciclina D1*; y por consiguiente se reduce la proliferación celular en lo tumores de los ratones tratados con Ki16425.

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha reportado que la PKC $\alpha$  interacciona con el PR<sup>156</sup>, tanto en el citoplasma como en el núcleo en las células U251, lo que podría indicar que la interacción PKC $\alpha$ /PR es la responsable de la translocación de la cinasa al compartimento nuclear<sup>156</sup>.

El tiempo de supervivencia de los pacientes con GBM es baja<sup>7,32,38</sup>. Inhibir al LPA<sub>1</sub> puede beneficiar a la supervivencia del paciente, debido a que este receptor participa en el desarrollo del GBM<sup>5,6</sup>, además se inhibe la activación de otras proteínas tales como la PKC $\alpha$ <sup>18-20,107</sup> y el PR<sup>107,136,154,155</sup>, las cuales están involucradas en el desarrollo y progresión del GBM. Pese a que en nuestro modelo *in vivo* no se logró reducir el tamaño del tumor al tratar a los ratones con Ki16425, se observa una disminución del índice mitótico; así como en la localización de la



PKC $\alpha$  en núcleo y la fosforilación del PR en la Ser400, es decir, se logró inhibir parcialmente la activación de estas proteínas.

Probablemente, al aumentar la frecuencia y la cantidad de dosis de Ki16425, contribuiría a la reducción del volumen tumoral, y posiblemente disminuiría aún más el porcentaje de células positivas a PKC $\alpha$  nuclear y a PR-pSer400, respectivamente, así como el IM. Además, faltaría aumentar el tamaño de la muestra, para obtener resultados significativos. Con base al método de "ecuación de recursos"<sup>220</sup>, donde se determina el valor de "E", el cual es el grado de libertad de ANOVA; cualquier tamaño de muestra que mantenga E entre 10 y 20 se considera como adecuado<sup>220</sup>. "E" se puede calcular empleando la siguiente fórmula:  $E = \text{Número total de animales} - \text{Número total de grupos}$ <sup>220</sup>. Por esta razón, en nuestro estudio lo apropiado sería utilizar 5 ratones por grupo.

Aunque los xenoinjertos con líneas celulares constituyen la mayoría (82%) de los estudios preclínicos de los tumores en ratones<sup>221</sup> y pueden predecir la eficacia de agentes citotóxicos<sup>221</sup>, no pueden pronosticar fielmente la actividad clínica para la mayoría de las terapias<sup>221</sup>, dado que los animales no muestran la misma farmacocinética que los humanos<sup>222</sup>, y no se representan la heterogeneidad de los tumores de los pacientes<sup>222</sup>. Se recomienda que para conocer mejor los efectos de la administración de Ki16425 en el desarrollo del GBM, se utilicen PDX, debido a que mantienen las características moleculares, genéticas e histopatológicas de los tumores de origen<sup>221</sup>.



## 11.0 Conclusiones

- ⊙ La administración de Ki16425 no modifica el tamaño, ni la masa, ni la densidad del tumor en comparación con el grupo control y vehículo, respectivamente.
- ⊙ La administración de Ki16425 disminuye en promedio 40.23% el índice mitótico en los tumores derivados del xenoinjerto, en comparación con el grupo control y vehículo.
- ⊙ La administración de Ki16425 disminuye en promedio 65.70% el porcentaje de células positivas a PKC $\alpha$  nuclear en los tumores derivados del xenoinjerto, en comparación con el grupo control y vehículo.
- ⊙ La administración de Ki16425 disminuye en promedio 67.41% el porcentaje de células positivas a PR-pSer400 en los tumores derivados del xenoinjerto, en comparación con el grupo control y vehículo.



## 12.0 Información suplementaria

### 12.1 Astrocitomas y su clasificación

Los astrocitomas son tumores que surgen de los astrocitos, se ubican en el cerebro o médula espinal<sup>223,224</sup>. Estos tumores se clasifican en una escala de I a IV, dependiendo de su agresividad<sup>1,2,27,225</sup> (ver *tabla suplementaria 1*).

**Tabla suplementaria 1.** Clasificación de los astrocitomas.

Grado	Nombre	Características
I	Astrocitoma pilocítico	<ul style="list-style-type: none"><li>• Lento crecimiento<sup>2,27,226</sup>.</li><li>• No maligno<sup>27,225</sup>.</li><li>• Presenta bordes definidos, no son infiltrantes<sup>2,225,226</sup>.</li><li>• Se presentan en niños y jóvenes adultos<sup>2,225</sup>.</li><li>• El 94.6% de los pacientes sobreviven 5 años después de su diagnóstico<sup>24</sup>.</li></ul>
II	Astrocitoma difuso	<ul style="list-style-type: none"><li>• Lento crecimiento<sup>2,27</sup>.</li><li>• Capacidad de evolucionar a grados III y IV<sup>2,226</sup>.</li><li>• Presenta ocasionalmente atipia celular<sup>27,225</sup>, alto grado de diferenciación<sup>2</sup>, bajo grado de infiltración<sup>2</sup>.</li><li>• Puede ser maligno o no maligno<sup>27</sup>.</li><li>• Se presenta en jóvenes adultos (30-40 años)<sup>2</sup>.</li><li>• Tiempo de supervivencia 10-15 años<sup>226</sup>.</li></ul>
III	Astrocitoma anaplásico	<ul style="list-style-type: none"><li>• Maligno<sup>27,225</sup>.</li><li>• Presenta anaplasia<sup>27</sup>, alta actividad mitótica<sup>27,225</sup>, infiltrante<sup>2</sup>.</li></ul>



		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puede transformarse a grado IV<sup>2,27</sup>.</li> <li>• Se presentan en adultos ~45 años<sup>2</sup>.</li> <li>• Sobrevida ~2 años<sup>2,226</sup>.</li> </ul>
<b>IV</b>	Glioblastoma	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maligno<sup>2,27</sup>.</li> <li>• Presenta anaplasia<sup>27</sup>, alta actividad mitótica<sup>2,27,225</sup>, proliferación microvascular<sup>2</sup>, necrosis<sup>2,27,225</sup>, altamente invasivo<sup>2,225</sup>.</li> <li>• Se presenta en adultos de 45-75 años<sup>2</sup>.</li> <li>• Tiempo de supervivencia corta, 6 meses<sup>35,36</sup>. Con tratamiento, el tiempo de supervivencia es de 12.1-14.6 meses<sup>32</sup>.</li> <li>• Solo el 6.8% sobreviven 5 años después de su diagnóstico<sup>24</sup>.</li> </ul>

## 12.2 Línea celular U251

La línea celular U251 (ver *figura suplementaria 1*) fue derivada de una biopsia de un hombre con GBM de 75 años<sup>227</sup>. Se caracteriza por la pérdida del supresor tumoral p53, la presencia de *PTEN* mutado<sup>227,228</sup> y la activación de la vía NFκB<sup>4</sup>. La vía de PI3K/Akt se encuentra sobrerregulada, esto conlleva al incremento en la angiogénesis, resistencia a la apoptosis; supervivencia, proliferación y migración celular<sup>227,228</sup>. Las células U251 sobreexpresan LPA<sub>1</sub>, ATX y PKCα<sup>16</sup>. LPA<sub>1</sub><sup>16</sup>, PKCα<sup>16</sup> y PR<sup>123</sup> están involucradas en la proliferación celular de U251. Este tipo de células exhiben una alta resistencia a la TMZ<sup>229</sup>.

Debido a que las células U251, presentan *PTEN* mutado<sup>227,228</sup> y la activación de la vía NFκB<sup>4</sup>, y éstas son características del GBM del subtipo mesenquimal<sup>4,23,58</sup>; además, tienen una morfología tipo mesenquimal<sup>230</sup> y presentan marcadores de superficie asociados con células madre mesenquimales, como: CD29 (receptor de integrina β1 / fibronectina), CD90 (antígeno de superficie celular Thy-1) y CD105 (endoglina, receptor de TGF-β)<sup>230</sup>, se les puede clasificar como de subtipo



mesenquimal. El cuál es el subtipo más agresivo y el de menor tiempo de supervivencia<sup>4</sup>.



**Figura suplementaria 1.** Fotografía tomada en campo claro a 600x de las células U251.

Se ha reportado que la línea celular U251 se emplea en xenoinjertos heterotópicos u ortotópicos en ratones<sup>227</sup>. Un tumor intracraneal en un ratón generado a partir de células U251<sup>227</sup>, presenta características histológicas tales como zonas pseudoempalizadas, necrosis, proliferación microvascular, pleomorfismo celular, atipia celular<sup>227</sup>, características propias de muestras de pacientes con GBM<sup>2,51,52,54,55</sup>.





## 13.0 Anexo

### Material y equipo

- ✓ Albúmina de suero bovino (BSA) liofilizado pH ~7 (P6154, Biowest)
- ✓ Anticuerpo primario anti-PKC $\alpha$  de ratón (sc-8393, Santa Cruz Biotechnology)
- ✓ Anticuerpo primario anti-phosphoS400PR de conejo (ab60954, abcam)
- ✓ Anticuerpo secundario: anti-ratón de cabra acoplado a Alexa Fluor488 (A11001, Thermo Fisher Scientific)
- ✓ Anticuerpo secundario: anti-conejo de cabra acoplado a Alexa Flour 594 (R37117, Thermo Fisher Scientific)
- ✓ Balanza analítica (VELAB)
- ✓ Campana de flujo laminar (VECO)
- ✓ Centrifugadora (Centrifuge 5810 R)
- ✓ Criostato (Leica CM1850)
- ✓ Dimetilsulfóxido (DMSO) (472301, Sigma Aldrich)
- ✓ Sacarosa (4072-01, J.T. Baker)
- ✓ Hoechst 33342 (H3569, Thermo Scientific)
- ✓ Incubadora de CO<sub>2</sub> (NUAIRE US AUTOFLOW, CO<sub>2</sub> Water-Jacketed Incubator)
- ✓ Ki16425 (CAY10012659, Cayman)
- ✓ Línea celular U251 (American Type Culture Collection)
- ✓ Medio de cultivo: Medio Eagle modificado de Dulbecco (IX) (DMEM) con 4.5 g/L de glucosa, L- glutamina, piruvato de sodio con bicarbonato de sodio y rojo de fenol (*in vitro*)
- ✓ Medio de montaje Antifade Mounting Medium H-100 (ab104135, VECTASHIELD)
- ✓ Medio de montaje Cytoseal 60 (8310-4, Thermo Scientific).
- ✓ Microscopio (Olympus Bx43)
- ✓ Paraformaldehído (PFA) (158127, Sigma Aldrich)
- ✓ Ratones NSG
- ✓ Suero fetal bovino (FBS) (90020, BYPRODUCTOS)



- ✓ Tween® 20 (P1754, Sigma Aldrich)
- ✓ Vernier analógico (PRETUL)

### Controles negativos inmunofluorescencias

Anti-conejo acoplado a  
Alexa Fluor 594



Anti-ratón acoplado a  
Alexa Fluor 488



## 14.0 Referencias

1. Louis, D. N. *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **114**, 97–109 (2007).
2. Louis, D. N. , Ohgaki, H. , Wiestler, O. D., and Cavenee W. K. Glioblastoma. in *WHO classification of tumours of the central nervous system* (ed. IARC) 33–49 (Lyon, 2007).
3. Wirsching, H.-G., Galanis, E. & Weller, M. Chapter 23 - Glioblastoma. in *Gliomas* (eds. Berger, M. S. & Weller, M. B. T.-H. of C. N.) **134**, 381–397 (Elsevier, 2016).
4. Valdés-Rives, S. A., Casique-Aguirre, D., Germán-Castelán, L., Velasco-Velázquez, M. A. & González-Arenas, A. Apoptotic Signaling Pathways in Glioblastoma and Therapeutic Implications. *Biomed Res. Int.* **2017**, 7403747 (2017).
5. Kishi, Y. *et al.* Autotaxin is overexpressed in glioblastoma multiforme and contributes to cell motility of glioblastoma by converting lysophosphatidylcholine to lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* **281**, 17492–17500 (2006).
6. Loskutov, Y. V *et al.* LPA signaling is regulated through the primary cilium: a novel target in glioblastoma. *Oncogene* **37**, 1457–1471 (2018).
7. Tabuchi, S. The autotaxin-lysophosphatidic acid-lysophosphatidic acid receptor cascade: proposal of a novel potential therapeutic target for treating glioblastoma multiforme. *Lipids Health Dis.* **14**, 56 (2015).
8. Choi, J. W. *et al.* LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **50**, 157–186 (2010).
9. Stoddard, N. C. & Chun, J. Promising pharmacological directions in the world of lysophosphatidic Acid signaling. *Biomol. Ther. (Seoul)*. **23**, 1–11 (2015).



10. Yung, Y. C., Stoddard, N. C. & Chun, J. LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J. Lipid Res.* **55**, 1192–1214 (2014).
11. Valdés-Rives, S. A. & González-Arenas, A. Autotaxin-Lysophosphatidic Acid: From Inflammation to Cancer Development. *Mediators Inflamm.* **2017**, 9173090 (2017).
12. Mills, G. B. & Moolenaar, W. H. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 582–591 (2003).
13. Riaz, A., Huang, Y. & Johansson, S. G-Protein-Coupled Lysophosphatidic Acid Receptors and Their Regulation of AKT Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 215 (2016).
14. Chu, X., Wei, X., Lu, S. & He, P. Autotaxin-LPA receptor axis in the pathogenesis of lung diseases. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 17117–17122 (2015).
15. Sheng, X., Yung, Y. C., Chen, A. & Chun, J. Lysophosphatidic acid signalling in development. *Development* **142**, 1390–1395 (2015).
16. Valdés-Rives, S. A., de la Fuente-Granada, M., Velasco-Velázquez, M. A., González-Flores, O. & González-Arenas, A. LPA1 receptor activation induces PKC $\alpha$  nuclear translocation in Glioblastoma cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **110**, 91–102 (2019).
17. do Carmo, A., Balça-Silva, J., Matias, D. & Lopes, M. C. PKC signaling in glioblastoma. *Cancer Biol. Ther.* **14**, 287–294 (2013).
18. Yazaki, T. *et al.* Treatment of glioblastoma U-87 by systemic administration of an antisense protein kinase C-alpha phosphorothioate oligodeoxynucleotide. *Mol. Pharmacol.* **50**, 236–242 (1996).
19. Ahmad, S., Mineta, T., Martuza, R. L. & Glazer, R. I. Antisense expression of protein kinase C $\alpha$  inhibits the growth and tumorigenicity of human glioblastoma cells. *Neurosurgery* **35**, 904–909 (1994).
20. Mandil, R. *et al.* Protein Kinase C $\alpha$  and Protein Kinase C $\delta$  Play Opposite Roles



in the Proliferation and Apoptosis of Glioma Cells. *Cancer Res.* **61**, 4612 LP – 4619 (2001).

21. González-Arenas, A. *et al.* PKC $\alpha$  and PKC $\delta$  Activation Regulates Transcriptional Activity and Degradation of Progesterone Receptor in Human Astrocytoma Cells. *Endocrinology* **156**, 1010–1022 (2015).
22. Marquina-Sánchez, B. *et al.* The interplay between intracellular progesterone receptor and PKC plays a key role in migration and invasion of human glioblastoma cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **172**, 198–206 (2017).
23. Agnihotri, S. *et al.* Glioblastoma, a Brief Review of History, Molecular Genetics, Animal Models and Novel Therapeutic Strategies. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **61**, 25–41 (2013).
24. Ostrom, Q. T. *et al.* CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2012–2016. *Neuro. Oncol.* **21**, v1–v100 (2019).
25. Chistiakov, D. A. & Chekhonin, V. P. Circulating tumor cells and their advances to promote cancer metastasis and relapse, with focus on glioblastoma multiforme. *Exp. Mol. Pathol.* **105**, 166–174 (2018).
26. Olar, A. & Aldape, K. D. Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. *J. Pathol.* **232**, 165–177 (2014).
27. Gupta, A. & Dwivedi, T. A Simplified Overview of World Health Organization Classification Update of Central Nervous System Tumors 2016. *J. Neurosci. Rural Pract.* **8**, 629–641 (2017).
28. Parsons, D. W. *et al.* An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**, 1807–1812 (2008).
29. Franco-Hernández, C., Martínez-González, V. & Rey, J. A. Biología molecular de los glioblastomas. *Neurocirugía* **18**, 373–382 (2007).
30. Wegman-Ostrosky, T. *et al.* Clinical prognostic factors in adults with



- astrocytoma: Historic cohort. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **146**, 116–122 (2016).
31. López-González, M. A. & Sotelo, J. Brain tumors in Mexico: characteristics and prognosis of glioblastoma. *Surg. Neurol.* **53**, 157–162 (2000).
  32. Stupp, R. *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 987–996 (2005).
  33. Radisky, D. C., Kenny, P. A. & Bissell, M. J. Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT? *J. Cell. Biochem.* **101**, 830–839 (2007).
  34. Laperriere, N. *et al.* Optimal management of elderly patients with glioblastoma. *Cancer Treat. Rev.* **39**, 350–357 (2013).
  35. Harris, G. *et al.* Survival Outcomes of Elderly Patients With Glioblastoma Multiforme in Their 75th Year or Older Treated With Adjuvant Therapy. *Int. J. Radiat. Oncol.* **98**, 802–810 (2017).
  36. Tsang, D. S. *et al.* Survival outcomes in elderly patients with glioblastoma. *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol).* **27**, 176–183 (2015).
  37. Lathia, J. D., Mack, S. C., Mulkearns-Hubert, E. E., Valentim, C. L. L. & Rich, J. N. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev.* **29**, 1203–1217 (2015).
  38. Davis, M. E. Glioblastoma: overview of disease and treatment. *Clin. J. Oncol. Nurs.* **20**, S2, 1–8 (2016).
  39. Ramirez, Y. P., Weatherbee, J. L., Wheelhouse, R. T. & Ross, A. H. Glioblastoma multiforme therapy and mechanisms of resistance. *Pharmaceuticals* **6**, 1475–1506 (2013).
  40. ABTA. Glioblastoma y astrocitoma maligno. in (ed. American Brain Tumor Association) **7**, 15 (2012).
  41. Omuro, A. & DeAngelis, L. M. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas: A Clinical Review. *JAMA* **310**, 1842–1850 (2013).
  42. Hottinger, A. F. & Khakoo, Y. Update on the management of familial central



- nervous system tumor syndromes. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **7**, 200–207 (2007).
43. Melean, G., Sestini, R., Ammannati, F. & Papi, L. Genetic insights into familial tumors of the nervous system. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* **129C**, 74–84 (2004).
  44. Molinaro, A. M., Taylor, J. W., Wiencke, J. K. & Wrensch, M. R. Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. *Nat. Rev. Neurol.* **15**, 405–417 (2019).
  45. Campian, J. & Gutmann, D. H. CNS Tumors in Neurofibromatosis. *J. Clin. Oncol.* **35**, 2378–2385 (2017).
  46. Braganza, M. Z. *et al.* Ionizing radiation and the risk of brain and central nervous system tumors: a systematic review. *Neuro. Oncol.* **14**, 1316–1324 (2012).
  47. Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Stetson, L., Virk, S. & Barnholtz-Sloan, J. S. Epidemiology of Intracranial Gliomas. *Prog. Neurol. Surg.* **30**, 1–11 (2018).
  48. Kaur, H. *et al.* Asthma and risk of glioma: a population-based case–control study. *BMJ Open* **9**, e025746 (2019).
  49. Linos, E., Raine, T., Alonso, A. & Michaud, D. Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* **99**, 1544–1550 (2007).
  50. Brat, D. J. & Van Meir, E. G. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Lab. Investig.* **84**, 397–405 (2004).
  51. Rong, Y., Durden, D. L., Van Meir, E. G. & Brat, D. J. ‘Pseudopalisading’ necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **65**, 529–539 (2006).
  52. Wippold, F. J., Lämmle, M., Anatelli, F., Lennerz, J. & Perry, A.



- Neuropathology for the neuroradiologist: palisades and pseudopalisades. *Am. J. Neuroradiol.* **27**, 2037–2041 (2006).
53. Dimberg, A. The glioblastoma vasculature as a target for cancer therapy. *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 1647–1652 (2014).
  54. Ayuso, J. M. *et al.* Glioblastoma on a microfluidic chip: Generating pseudopalisades and enhancing aggressiveness through blood vessel obstruction events. *Neuro. Oncol.* **19**, 503–513 (2017).
  55. Barker, J., Hoogi, A., Depeursinge, A. & Rubin, D. L. Automated classification of brain tumor type in whole-slide digital pathology images using local representative tiles. *Med. Image Anal.* **30**, 60–71 (2016).
  56. De Vleeschouwer, S. & Bergers, G. Glioblastoma: to target the tumor cell or the microenvironment? *Exon Publ.* 315–340 (2017).
  57. Chesler, D. A., Berger, M. S. & Quinones-Hinojosa, A. The potential origin of glioblastoma initiating cells. *Front. Biosci. (Schol. Ed.)* **4**, 190–205 (2012).
  58. Verhaak, R. G. W. *et al.* Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **17**, 98–110 (2010).
  59. Lane, R. *et al.* Cell-derived extracellular vesicles can be used as a biomarker reservoir for glioblastoma tumor subtyping. *Commun. Biol.* **2**, 315 (2019).
  60. Komori, T. The 2016 WHO classification of tumours of the central nervous system: the major points of rev. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*. **57**, 301–311 (2017).
  61. Louis, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* **131**, 803–820 (2016).
  62. Louis, D. N., Schiff, D., Batchelor, T. & Wen, P. Y. Classification and pathologic diagnosis of gliomas. *UpToDate, Waltham, MA Walters Kluwer Heal.* (2017).





63. Lu, V. M. & McDonald, K. L. Isocitrate dehydrogenase 1 mutation subtypes at site 132 and their translational potential in glioma. *CNS Oncol.* **7**, 41–50 (2018).
64. Noguchi, K., Herr, D., Mutoh, T. & Chun, J. Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**, 15–23 (2009).
65. Yung, Y. C., Stoddard, N. C., Mirendil, H. & Chun, J. Lysophosphatidic Acid signaling in the nervous system. *Neuron* **85**, 669–682 (2015).
66. Fukushima, K. *et al.* Lysophosphatidic acid signaling via LPA1 and LPA3 regulates cellular functions during tumor progression in pancreatic cancer cells. *Exp. Cell Res.* **352**, 139–145 (2017).
67. Lin, D. A. & Boyce, J. A. Lysophospholipids as mediators of immunity. *Adv. Immunol.* **89**, 141–167 (2006).
68. Umezu-Goto, M. *et al.* Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J. Cell Biol.* **158**, 227–233 (2002).
69. Aoki, J. Mechanisms of lysophosphatidic acid production. in *Seminars in cell & developmental biology* **15**, 477–489 (Elsevier, 2004).
70. Albers, H. M. H. G. *et al.* Boronic acid-based inhibitor of autotaxin reveals rapid turnover of LPA in the circulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 7257–7262 (2010).
71. Samadi, N. *et al.* Regulation of lysophosphatidate signaling by autotaxin and lipid phosphate phosphatases with respect to tumor progression, angiogenesis, metastasis and chemo-resistance. *Biochimie* **93**, 61–70 (2011).
72. Kihara, Y., Maceyka, M., Spiegel, S. & Chun, J. Lysophospholipid receptor nomenclature review: IUPHAR Review 8. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 3575–3594 (2014).
73. Chun, J., Hla, T., Lynch, K. R., Spiegel, S. & Moolenaar, W. H. International



union of basic and clinical pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev.* **62**, 579–587 (2010).

74. Duc, N. M., Kim, H. R. & Chung, K. Y. Structural mechanism of G protein activation by G protein-coupled receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **763**, 214–222 (2015).
75. Syrovatkina, V., Alegre, K. O., Dey, R. & Huang, X.-Y. Regulation, signaling, and physiological functions of G-proteins. *J. Mol. Biol.* **428**, 3850–3868 (2016).
76. García-Sáinz, J. A. G protein coupled receptors and their desensitization. *Rev. Odontológica Mex.* **15**, 210–213 (2011).
77. Yanagida, K., Kurikawa, Y., Shimizu, T. & Ishii, S. Current progress in non-Edg family LPA receptor research. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Biol. Lipids* **1831**, 33–41 (2013).
78. Li, G., Mosier, P. D., Fang, X. & Zhang, Y. Toward the three-dimensional structure and lysophosphatidic acid binding characteristics of the LPA4/p2y9/GPR23 receptor: A homology modeling study. *J. Mol. Graph. Model.* **28**, 70–79 (2009).
79. Bandoh, K. *et al.* Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species: Structure–activity relationship of cloned LPA receptors. *FEBS Lett.* **478**, 159–165 (2000).
80. Hecht, J. H., Weiner, J. A., Post, S. R. & Chun, J. Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J. Cell Biol.* **135**, 1071–1083 (1996).
81. Lin, Y.-C. *et al.* LPA1/3 signaling mediates tumor lymphangiogenesis through promoting CRT expression in prostate cancer Molecular and cell biology of lipids. 1305–1315 (2018).
82. David, M. *et al.* Identification of Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor (HB-EGF) as a Biomarker for Lysophosphatidic Acid Receptor Type 1 (LPA 1) Activation in Human Breast and Prostate Cancers. *PLoS One* **9**, e97771



(2014).

83. Su, S.-C. *et al.* Autotaxin–lysophosphatidic acid signaling axis mediates tumorigenesis and development of acquired resistance to sunitinib in renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **19**, 6461–6472 (2013).
84. do Amaral, R. F. *et al.* Microglial lysophosphatidic acid promotes glioblastoma proliferation and migration via LPA1 receptor. *J. Neurochem.* 1-14 (2020).
85. Bhave, S. R. *et al.* Autotaxin inhibition with PF-8380 enhances the radiosensitivity of human and murine glioblastoma cell lines. *Front. Oncol.* **3**, 236 (2013).
86. Hoelzinger, D. B. *et al.* The role of Autotaxin in glioblastoma multiforme invasion. *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* **65** (2005).
87. Hoelzinger, D. B. *et al.* Autotaxin: a secreted autocrine/paracrine factor that promotes glioma invasion. *J. Neurooncol.* **86**, 297–309 (2008).
88. Steinberg, S. F. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol. Rev.* **88**, 1341–1378 (2008).
89. Isakov, N. Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. *Semin. Cancer Biol.* **48**, 36–52 (2018).
90. Newton, A. C. Protein kinase C: perfectly balanced. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **53**, 208–230 (2018).
91. Singh, R. K. *et al.* Protein kinase C- $\alpha$  and the regulation of diverse cell responses. *Biomol. Concepts* **8**, 143–153 (2017).
92. Konopatskaya, O. & Poole, A. W. Protein kinase Calpha: disease regulator and therapeutic target. *Trends Pharmacol. Sci.* **31**, 8–14 (2010).
93. Stabel, S. & Parker, P. J. Protein kinase C. *Pharmacol. Ther.* **51**, 71–95 (1991).
94. Nishizuka, Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* **308**, 693 (1984).



95. Newton, A. C. Protein kinase C: poised to signal. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **298**, E395–E402 (2010).
96. Newton, A. C. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* **270**, 28495–28498 (1995).
97. Martiny-Baron, G. & Fabbro, D. Classical PKC isoforms in cancer. *Pharmacol. Res.* **55**, 477–486 (2007).
98. Igumenova, T. I. Dynamics and Membrane Interactions of Protein Kinase C. *Biochemistry* **54**, 4953–4968 (2015).
99. Black, A. R. & Black, J. D. The complexities of PKC $\alpha$  signaling in cancer. *Adv. Biol. Regul.* 100769 (2020).
100. Newton, A. C. Protein Kinase C: Structural and Spatial Regulation by Phosphorylation, Cofactors, and Macromolecular Interactions. *Chem. Rev.* **101**, 2353–2364 (2001).
101. Newton, A. C. Regulation of protein kinase C. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 161–167 (1997).
102. Nakashima, S. Protein kinase C $\alpha$  (PKC $\alpha$ ): regulation and biological function. *J. Biochem.* **132**, 669–675 (2002).
103. Martelli, A. M., Evangelisti, C., Nyakern, M. & Manzoli, F. A. Nuclear protein kinase C. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Biol. Lipids* **1761**, 542–551 (2006).
104. Martelli, A. M., Sang, N., Borgatti, P., Capitani, S. & Neri, L. M. Multiple biological responses activated by nuclear protein kinase C. *J. Cell. Biochem.* **74**, 499–521 (1999).
105. Martelli, A. M. *et al.* Nuclear protein kinase C isoforms: key players in multiple cell functions? *Histol. Histopathol.* **18**, 1301–1312 (2003).
106. Atypical PKC Functions in Parallel Oncogenic Pathways in Glioblastoma. *Cancer Discov.* **4**, 1116 LP – 1116 (2014).



107. Arcos-Montoya, D. I. Estudio de la relación entre la detección del receptor a progesterona y de la proteína cinasa c alfa con el grado de malignidad de astrocitomas humanos, 29, 30, 37, 38, 42-45 (UNAM, 2019).
108. Cameron, A. J., Procyk, K. J., Leitges, M. & Parker, P. J. PKC alpha protein but not kinase activity is critical for glioma cell proliferation and survival. *Int. J. cancer* **123**, 769–779 (2008).
109. Chandrika, G., Natesh, K., Ranade, D., Chugh, A. & Shastry, P. Suppression of the invasive potential of Glioblastoma cells by mTOR inhibitors involves modulation of NFκB and PKC-α signaling. *Sci. Rep.* **6**, 22455 (2016).
110. Okhrimenko, H. *et al.* Protein kinase C-epsilon regulates the apoptosis and survival of glioma cells. *Cancer Res.* **65**, 7301–7309 (2005).
111. Aeder, S. E., Martin, P. M., Soh, J.-W. & Hussaini, I. M. PKC-η mediates glioblastoma cell proliferation through the Akt and mTOR signaling pathways. *Oncogene* **23**, 9062 (2004).
112. Donson, A. M., Banerjee, A., Gamboni-Robertson, F., Fleitz, J. M. & Foreman, N. K. Protein kinase C ζ isoform is critical for proliferation in human glioblastoma cell lines. *J. Neurooncol.* **47**, 109–115 (2000).
113. Baldwin, R. M., Parolin, D. A. E. & Lorimer, I. A. J. Regulation of glioblastoma cell invasion by PKCι and RhoB. *Oncogene* **27**, 3587–3595 (2008).
114. Germann, U. A., Chambers, T. C., Ambudkar, S. V, Pastan, I. & Gottesman, M. M. Effects of phosphorylation of P-glycoprotein on multidrug resistance. *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**, 53–61 (1995).
115. Matsumoto, T., Tani, E., Yamaura, I., Miyaji, K. & Kaba, K. Effects of protein kinase C modulators on multidrug resistance in human glioma cells. *Neurosurgery* **36**, 565–572 (1995).
116. Mollazadeh, S., Sahebkar, A., Hadizadeh, F., Behravan, J. & Arabzadeh, S. Structural and functional aspects of P-glycoprotein and its inhibitors. *Life Sci.* **214**, 118–123 (2018).



117. Callender, J. A. & Newton, A. C. Conventional protein kinase C in the brain: 40 years later. *Neuronal Signal*. **1**, (2017).
118. Tomiyama, T., Kang, J., Toita, R., Niidome, T. & Katayama, Y. Protein kinase C $\alpha$ -responsive polymeric carrier: its application for gene delivery into human cancers. *Cancer Sci*. **100**, 1532–1536 (2009).
119. Misra-Press, A., Fields, A. P., Samols, D. & Goldthwait, D. A. Protein kinase C isoforms in human glioblastoma cells. *Glia* **6**, 188–197 (1992).
120. Leirdal, M. & Sioud, M. Protein kinase C $\alpha$  isoform regulates the activation of the MAP kinase ERK1/2 in human glioma cells: involvement in cell survival and gene expression. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* **4**, 106–110 (2000).
121. Mut, M., Amos, S. & Hussaini, I. M. PKC alpha phosphorylates cytosolic NF-kappaB/p65 and PKC delta delays nuclear translocation of NF-kappaB/p65 in U1242 glioblastoma cells. *Turk. Neurosurg.* **20**, 277 (2010).
122. Kohutek, Z. A., Redpath, G. T. & Hussaini, I. M. ADAM-10-mediated N-cadherin cleavage is protein kinase C- $\alpha$  dependent and promotes glioblastoma cell migration. *J. Neurosci.* **29**, 4605–4615 (2009).
123. González-Agüero, G. *et al.* Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine* **32**, 129–135 (2007).
124. Hagan, C. R. & Lange, C. A. Molecular determinants of context-dependent progesterone receptor action in breast cancer. *BMC Med.* **12**, 32 (2014).
125. Scarpin, K. M., Graham, J. D., Mote, P. A. & Clarke, C. L. Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. *Nucl. Recept. Signal.* **7**, e009–e009 (2009).
126. Grimm, S. L., Hartig, S. M. & Edwards, D. P. Progesterone receptor signaling mechanisms. *J. Mol. Biol.* **428**, 3831–3849 (2016).
127. Boonyaratankornkit, V., Bi, Y., Rudd, M. & Edwards, D. P. The role and



- mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids* **73**, 922–928 (2008).
128. Abdel-Hafiz, H. A. & Horwitz, K. B. Post-translational modifications of the progesterone receptors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **140**, 80–89 (2014).
  129. Bottino, M. C. & Lanari, C. Localización extra nuclear de receptores esteroides y activación de mecanismos no genómicos. *Med. (Buenos Aires)* **70**, 173–184 (2010).
  130. Camacho-Arroyo, I., Hansberg-Pastor, V., Vázquez-Martínez, E. & Cerbón, M. Mechanism of Progesterone Action in the Brain. in *Hormones, Brain & Behavior* (ed. Elsevier) 181–214 (2017).
  131. Inoue, T. *et al.* Progesterone Production and Actions in the Human Central Nervous System and Neurogenic Tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 5325–5331 (2002).
  132. González-Orozco, J. C. & Camacho-Arroyo, I. Progesterone Actions During Central Nervous System Development. *Front. Neurosci.* **13**, 503 (2019).
  133. Rossetti, M. F., Cambiasso, M. J., Holschbach, M. A. & Cabrera, R. Oestrogens and progestagens: synthesis and action in the brain. *J. Neuroendocrinol.* **28**, 1–11 (2016).
  134. Hagan, C. R., Daniel, A. R., Dressing, G. E. & Lange, C. A. Role of phosphorylation in progesterone receptor signaling and specificity. *Mol. Cell. Endocrinol.* **357**, 43–49 (2012).
  135. Tavares, C. B. *et al.* Expression of estrogen and progesterone receptors in astrocytomas: a literature review. *Clinics (Sao Paulo)*. **71**, 481–486 (2016).
  136. González-Agüero, G., Ondarza, R., Gamboa-Domínguez, A., Cerbón, M. A. & Camacho-Arroyo, I. Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Res. Bull.* **56**, 43–48 (2001).



137. Hansberg-Pastor, V., González-Arenas, A. & Camacho-Arroyo, I. Papel de las hormonas sexuales en el crecimiento de tumores cerebrales humanos. *Mensaje bioquímico* **41**, 127–144 (2014).
138. Hernandez-Hernandez, O. T. & Camacho-Arroyo, I. Regulation of gene expression by progesterone in cancer cells: effects on cyclin D1, EGFR and VEGF. *Mini Rev. Med. Chem.* **13**, 635–642 (2013).
139. Camacho-Arroyo, I. Progesterone receptor isoforms expression and progesterone actions in brain. *Recent Res. Devel. Life Sci.* 221–242 (2003).
140. Garg, D., Ng, S. S. M., Baig, K. M., Driggers, P. & Segars, J. Progesterone-mediated non-classical signaling. *Trends Endocrinol. Metab.* **28**, 656–668 (2017).
141. Shen, T., Horwitz, K. B. & Lange, C. A. Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 6122–6131 (2001).
142. Lange, C. A., Shen, T. & Horwitz, K. B. Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 1032–1037 (2000).
143. Pierson-Mullany, L. K. & Lange, C. A. Phosphorylation of progesterone receptor serine 400 mediates ligand-independent transcriptional activity in response to activation of cyclin-dependent protein kinase 2. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 10542–10557 (2004).
144. Hagan, C. R., Regan, T. M., Dressing, G. E. & Lange, C. A. ck2-dependent phosphorylation of progesterone receptors (PR) on Ser81 regulates PR-B isoform-specific target gene expression in breast cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 2439–2452 (2011).
145. Hagan, C. R., Knutson, T. P. & Lange, C. A. A common docking domain in





- progesterone receptor-B links DUSP6 and CK2 signaling to proliferative transcriptional programs in breast cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **41**, 8926–8942 (2013).
146. Wang, S. *et al.* Progesterone receptor A stability is mediated by glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in the Brca1-deficient mammary gland. *J. Biol. Chem.* **288**, 26265–26274 (2013).
  147. Clemm, D. L. *et al.* Differential hormone-dependent phosphorylation of progesterone receptor A and B forms revealed by a phosphoserine site-specific monoclonal antibody. *Mol. Endocrinol.* **14**, 52–65 (2000).
  148. Hernández-Hernández, O. T., González-García, T. K. & Camacho-Arroyo, I. Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF, EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **132**, 127–134 (2012).
  149. Sallinen, S. *et al.* Cyclin D1 expression in astrocytomas is associated with cell proliferation activity and patient prognosis. *J. Pathol.* **188**, 289–293 (1999).
  150. Gutiérrez-Rodríguez, A., Hansberg-Pastor, V. & Camacho-Arroyo, I. Proliferative and invasive effects of progesterone-induced blocking factor in human glioblastoma cells. *Biomed Res. Int.* **2017**, (2017).
  151. Khalid, H. *et al.* Immunohistochemical analysis of progesterone receptor and ki-67 labeling index in astrocytic tumors. *Cancer Interdiscip. Int. J. Am. Cancer Soc.* **80**, 2133–2140 (1997).
  152. Assimakopoulou, M., Sotiropoulou-Bonikou, G., Maraziotis, T. & Varakis, J. Does sex steroid receptor status have any prognostic or predictive significance in brain astrocytic tumors? *Clin. Neuropathol.* **17**, 27–34 (1998).
  153. Germán-Castelán, L. & Camacho-Arroyo, I. Effects of progesterone on human astrocytoma progression. *Rev Mex Endocrinol Metab Nutr* **2**, 104–108 (2015).
  154. Germán-Castelán, L., Manjarrez-Marmolejo, J., González-Arenas, A., González-Morán, M. G. & Camacho-Arroyo, I. Progesterone induces the



growth and infiltration of human astrocytoma cells implanted in the cerebral cortex of the rat. *Biomed Res. Int.* **2014**, 393174 (2014).

155. Germán-Castelán, L., Manjarrez-Marmolejo, J., González-Arenas, A. & Camacho-Arroyo, I. Intracellular Progesterone Receptor Mediates the Increase in Glioblastoma Growth Induced by Progesterone in the Rat Brain. *Arch. Med. Res.* **47**, 419–426 (2016).
156. Váldez-Rives S. A. La activación de la proteína cinasa C alfa por ácido lisofosfatídico regula la activación del receptor a progesterona en células de glioblastoma humano, 60-62 (UNAM, 2020).
157. *NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.* (1999).
158. Shultz, L. D. NOD-Scid gamma mice. *The Jackson Laboratory* (2020). Available at: <https://www.jax.org/strain/005557>. (Accessed: 26th June 2020)
159. Shultz, L. *et al.* Human Lymphoid and Myeloid Cell Development in NOD/LtSz-scid IL2r  $\gamma$ null Mice Engrafted with Mobilized Human Hematopoietic Stem Cells. *J. Immunol* **174**, 6477–6489 (2005).
160. The Jackson Laboratory. Frequently Asked NSG Questions. (2020). Available at: <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/find-and-order-jax-mice/nsg-portfolio/frequently-asked-nsg-questions>. (Accessed: 18th August 2020)
161. Shultz, L. D. *et al.* Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J. Immunol.* **154**, 180–191 (1995).
162. Shultz, L. D. *et al.* Human cancer growth and therapy in NOD/SCID/IL2R $\gamma$ null (NSG) mice. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2014**, 694–708 (2014).
163. Shultz, L. D., Ishikawa, F. & Greiner, D. L. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 118–130 (2007).
164. Simpson-Abelson, M. R. *et al.* Long-term engraftment and expansion of tumor-derived memory T cells following the implantation of non-disrupted pieces of



- human lung tumor into NOD-scid IL2R $\gamma$ null mice. *J. Immunol.* **180**, 7009–7018 (2008).
165. Pearson, T., Greiner, D. L. & Shultz, L. D. Humanized SCID mouse models for biomedical research. in *Humanized mice* 25–51 (Springer, 2008).
166. Pshak, T. J., Cho, D. S., Hayes, K. L. & Vemulakonda, V. M. Correlation between CT-estimated tumor volume, pathologic tumor volume, and final pathologic specimen weight in children with Wilms' tumor. *J. Pediatr. Urol.* **10**, 148–154 (2014).
167. Sápi, J. *et al.* Tumor volume estimation and quasi-continuous administration for most effective bevacizumab therapy. *PLoS One* **10**, e0142190 (2015).
168. Ohta, H. *et al.* Ki16425, a subtype-selective antagonist for EDG-family lysophosphatidic acid receptors. *Mol. Pharmacol.* **64**, 994–1005 (2003).
169. Jung, J. Human tumor xenograft models for preclinical assessment of anticancer drug development. *Toxicol. Res.* **30**, 1–5 (2014).
170. Foltz, C. J. & Ullman-Cullere, M. Guidelines for assessing the health and condition of mice. *Lab Anim. (NY)*. **28**, 28–32 (1999).
171. Workman, P. *et al.* UKCCCR guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia. *Br. J. Cancer* **77**, 1–10 (1998).
172. Vaxosoftware. Densidad del agua líquida entre 0 °C y 100 °C. Available at: [http://www.vaxosoftware.com/doc\\_edu/qui/denh2o.pdf](http://www.vaxosoftware.com/doc_edu/qui/denh2o.pdf). (Accessed: 22nd April 2020)
173. Ross M. H., P. W. Histoquímica y citoquímica. in *Histología: texto y atlas. Correlación con biología molecular y celular* (ed. Wolters, K.) 5, 6, 108, 175, 179, 181, 187–189, 193 (2016).
174. Sorenson & R. L., B. T. C. Hematoxylin and eosin. in *Atlas of Human Histology. A guide to microscopic structure of cells, tissues and organs* 1–7 (2008).
175. Sawant, M. S. & Leube, R. E. Chapter Five - Consequences of Keratin



- Phosphorylation for Cytoskeletal Organization and Epithelial Functions. in (ed. Galluzzi, L. B. T.-I. R. of C. and M. B.) **330**, 171–225 (Academic Press, 2017).
176. Jia, L. *et al.* The association between high mobility group box 1 chromatin protein and mitotic chromosomes in glioma cells. *Oncol. Lett.* **19**, 745–752 (2020).
  177. Coons, S. W. Proliferation markers in the evaluation of gliomas. *Youmans Neurol. surgery. 5th edn. Saunders, Philadelphia* 689–707 (2004).
  178. Schaefer, L. Decoding fibrosis: Mechanisms and translational aspects. *Matrix Biol.* **68**, 1–7 (2018).
  179. Walraven, M. & Hinz, B. Therapeutic approaches to control tissue repair and fibrosis: Extracellular matrix as a game changer. *Matrix Biol.* **71**, 205–224 (2018).
  180. Darby, I. A. & Hewitson, T. D. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int. Rev. Cytol.* **257**, 143–179 (2007).
  181. Mack, M. Inflammation and fibrosis. *Matrix Biol.* **68**, 106–121 (2018).
  182. Smigiel, K. S. & Parks, W. C. Macrophages, wound healing, and fibrosis: recent insights. *Curr. Rheumatol. Rep.* **20**, 17 (2018).
  183. Wynn, T. A. & Vannella, K. M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity* **44**, 450–462 (2016).
  184. Rybinski, B., Franco-Barraza, J. & Cukierman, E. The wound healing, chronic fibrosis, and cancer progression triad. *Physiol. Genomics* **46**, 223–244 (2014).
  185. Horowitz, J. C. & Thannickal, V. J. Mechanisms for the resolution of organ fibrosis. *Physiology* **34**, 43–55 (2019).
  186. Scott, M. K. D. *et al.* Increased monocyte count as a cellular biomarker for poor outcomes in fibrotic diseases: a retrospective, multicentre cohort study. *Lancet Respir. Med.* **7**, 497–508 (2019).
  187. Curaj, A. *et al.* Neutrophils Modulate Fibroblast Function and Promote Healing



- and Scar Formation after Murine Myocardial Infarction. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 3685 (2020).
188. Gregory, A. D. *et al.* Neutrophil elastase promotes myofibroblast differentiation in lung fibrosis. *J. Leukoc. Biol.* **98**, 143–152 (2015).
189. Moore, B. B. *et al.* Inflammatory leukocyte phenotypes correlate with disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Front. Med.* **1**, 56 (2014).
190. Wu, L., Saxena, S., Awaji, M. & Singh, R. K. Tumor-associated neutrophils in cancer: going pro. *Cancers (Basel)*. **11**, 564 (2019).
191. Khan, S. *et al.* Role of Neutrophils and Myeloid-Derived Suppressor Cells in Glioma Progression and Treatment Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1954 (2020).
192. Ogle, M. E., Segar, C. E., Sridhar, S. & Botchwey, E. A. Monocytes and macrophages in tissue repair: Implications for immunoregenerative biomaterial design. *Exp. Biol. Med.* **241**, 1084–1097 (2016).
193. Amiri, S. *et al.* Serum Lysophosphatidic Acid as a Potential Biomarker of Prostate Cancer. *Ann. Mil. Heal. Sci. Res.* **17**, (2019).
194. Hao, F. *et al.* Lysophosphatidic acid induces prostate cancer PC3 cell migration via activation of LPA(1), p42 and p38alpha. *Biochim. Biophys. Acta* **1771**, 883–892 (2007).
195. Guo, R. *et al.* Expression and function of lysophosphatidic acid LPA1 receptor in prostate cancer cells. *Endocrinology* **147**, 4883–4892 (2006).
196. Miyamoto, S., Yagi, H., Yotsumoto, F., Kawarabayashi, T. & Mekada, E. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a novel targeting molecule for cancer therapy. *Cancer Sci.* **97**, 341–347 (2006).
197. Ongusaha, P. P. *et al.* HB-EGF is a potent inducer of tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res.* **64**, 5283–5290 (2004).
198. Miyazono, K. Ectodomain shedding of HB-EGF: A potential target for cancer



- therapy. *J. Biochem.* **151**, 1–3 (2012).
199. Freeman, M. R. *et al.* Heparin-binding EGF-like growth factor in the human prostate: Synthesis predominantly by interstitial and vascular smooth muscle cells and action as a carcinoma cell mitogen. *J. Cell. Biochem.* **68**, 328–338 (1998).
200. Steeg, P. S. Targeting metastasis. *Nat. Rev. cancer* **16**, 201–218 (2016).
201. Metástasis. *Instituto Nacional del Cáncer (NIH)* (2020). Available at: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/metastasis>. (Accessed: 21st October 2020)
202. Robert, J. Biologie de la métastase. *Bull. Cancer* **100**, 333–342 (2013).
203. Schito, L. Hypoxia-dependent angiogenesis and lymphangiogenesis in cancer. in *Hypoxia and Cancer Metastasis* 71–85 (Springer, 2019).
204. Sánchez-Marín, L. *et al.* Systemic blockade of LPA1/3 lysophosphatidic acid receptors by ki16425 modulates the effects of ethanol on the brain and behavior. *Neuropharmacology* **133**, 189–201 (2018).
205. Schröder, R., Bien, K., Kott, R., Meyers, I. & Vössing, R. The relationship between Ki-67 labeling and mitotic index in gliomas and meningiomas: demonstration of the variability of the intermitotic cycle time. *Acta Neuropathol.* **82**, 389–394 (1991).
206. Prayson, R. A. Cell proliferation and tumors of the central nervous system part 1: Evaluation of mitotic activity. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **61**, 501–509 (2002).
207. Simpson, J. F., Dutt, P. L. & Page, D. L. Expression of mitoses per thousand cells and cell density in breast carcinomas: a proposal. *Hum. Pathol.* **23**, 608–611 (1992).
208. Donhuijsen, K. Mitosis counts: Reproducibility and significance in grading of malignancy. *Hum. Pathol.* **17**, 1122–1125 (1986).



209. Torp, S. H. & Granli, U. S. Proliferative activity in human glioblastomas assessed by various techniques. *Apmis* **109**, 865–869 (2001).
210. Baak, J. P. A. Mitosis counting in tumors. *Hum. Pathol.* **21**, 683–685 (1990).
211. Donhuijsen, K., Schmidt, U., Hirche, H., Van Beuningen, D. & Budach, V. Changes in mitotic rate and cell cycle fractions caused by delayed fixation. *Hum. Pathol.* **21**, 709–714 (1990).
212. Sala, L. *et al.* Specific expression of a new Bruton tyrosine kinase isoform (p65BTK) in the glioblastoma gemistocytic histotype. *Front. Mol. Neurosci.* **12**, 2 (2019).
213. Cilibrasi, C. *et al.* Resveratrol impairs glioma stem cells proliferation and motility by modulating the wnt signaling pathway. *PLoS One* **12**, e0169854 (2017).
214. Beresford, M. J., Wilson, G. D. & Makris, A. Measuring proliferation in breast cancer: practicalities and applications. *Breast Cancer Res.* **8**, 1–11 (2006).
215. Sueda, R. & Kageyama, R. Regulation of active and quiescent somatic stem cells by Notch signaling. *Dev. Growth Differ.* **62**, 59–66 (2020).
216. Urbán, N., Blomfield, I. M. & Guillemot, F. Quiescence of adult mammalian neural stem cells: a highly regulated rest. *Neuron* **104**, 834–848 (2019).
217. Cánepa, E. T. Proliferación o quiescencia: una difícil decisión celular. *Química Viva* **6**, 17–27 (2007).
218. Yao, G. Modelling mammalian cellular quiescence. *Interface Focus* **4**, 20130074 (2014).
219. Coller, H. A., Sang, L. & Roberts, J. M. A new description of cellular quiescence. *PLoS Biol* **4**, e83 (2006).
220. Charan, J. & Kantharia, N. D. How to calculate sample size in animal studies? *J. Pharmacol. Pharmacother.* **4**, 303 (2013).
221. Gengenbacher, N., Singhal, M. & Augustin, H. G. Preclinical mouse solid



- tumour models: status quo, challenges and perspectives. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 751 (2017).
222. Huszthy, P. C. *et al.* In vivo models of primary brain tumors: pitfalls and perspectives. *Neuro. Oncol.* **14**, 979–993 (2012).
223. Astrocytomas. *American Brain Tumor Association* (2020). Available at: [abta.org/tumor\\_types/astrocytoma/](http://abta.org/tumor_types/astrocytoma/). (Accessed: 18th August 2020)
224. Astrocytoma. *Instituto Nacional del Cáncer (NIH)* (2020). Available at: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/astrocytoma>. (Accessed: 16th August 2020)
225. Idoate, M. A. & Echeveste, J. I. Actualización sobre la biología molecular de los gliomas: hacia una clasificación patomolecular de los gliomas. *REV NEUROL* **4**, 217–224 (2007).
226. Hulleman, E. & Helin, K. Molecular mechanisms in gliomagenesis. *Adv. Cancer Res.* **94**, 1–27 (2005).
227. Jacobs, V. L., Valdes, P. A., Hickey, W. F. & De Leo, J. A. Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. *ASN Neuro* **3**, e00063–e00063 (2011).
228. Ren, Y. *et al.* MicroRNA-21 inhibitor sensitizes human glioblastoma cells U251 (PTEN-mutant) and LN229 (PTEN-wild type) to taxol. *BMC Cancer* **10**, 27 (2010).
229. Hong, X., Chedid, K. & Kalkanis, S. N. Glioblastoma cell line-derived spheres in serum-containing medium versus serum-free medium: A comparison of cancer stem cell properties. *Int. J. Oncol.* **41**, 1693–1700 (2012).
230. Motaln, H. *et al.* Heterogeneous glioblastoma cell cross-talk promotes phenotype alterations and enhanced drug resistance. *Oncotarget* **6**, 40998 (2015).





Nota: las figuras fueron realizadas con el software ChemDraw 15.0 professional y con la aplicación web, BioRender (<https://app.biorender.com/>).

