



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**INHIBICIÓN DE LA INVASIÓN CON ERITROSA EN
CÉLULAS TRONCALES DE GLIOBLASTOMA
HUMANO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

MONTSERRAT VÁZQUEZ BAUTISTA



**FACULTAD DE
CIENCIAS**

TUTOR:

DR. JUAN CARLOS GALLARDO PÉREZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2022



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.

1. Datos del alumno
Vázquez
Bautista
Montserrat
5532706960
Universidad Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
314056043
2. Datos del Asesor
Dr.
Juan Carlos
Gallardo
Pérez
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Itzel
Escobedo
Ávila
4. Datos del sinodal 2
Dr.
Josué Orlando
Ramírez
Jarquín
5. Datos del sinodal 3
Dr.
Juan Antonio
Matus
Santos
6. Datos del sinodal 4
Dra.
Edén Marcela
Rodríguez
Flores
7. Datos del trabajo escrito
Inhibición de la invasión con eritrosa en células troncales de glioblastoma humano
57 p.
2022

DEDICATORIAS

A Petra Bautista Márquez †

Por siempre estar para mí e interesarte en todas las cosas que te platicaba sobre mi carrera, aunque no entendieras de qué te hablaba. Por ver pacientemente todas las fotos de mis prácticas de campo y por reírte de las tonterías que te quería platicar. Por motivarme a terminar mi licenciatura y a seguir superándome para conseguir todo lo que deseaba y más. Gracias por dejarme cuidar de ti, por confiarme tu vida y por hablar sobre mí orgullosamente.

Anhelaba mucho que estuvieras presente el día de mi examen profesional, sé que era algo que tenías muchas ganas de ver y era algo con lo que yo soñaba...

¡Lo logré! Y aunque ya no estés aquí, sé que seguirás observándome, incluso ahora, desde alguna parte...

Te extraño y te quiero muchísimo.

‘Cuando una persona tiene algo importante que proteger, es cuando puede volverse verdaderamente fuerte’

-Haku

A mis padres

Gracias por trabajar muy duro para que yo haya podido concluir mi licenciatura, los admiro y quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Carmen y Roberto por el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida, por dar todo lo que tenían y más para que yo pudiera llegar hasta aquí el día de hoy. Esto no hubiera sido posible sin su cariño. Por brindarme la oportunidad de estudiar y enseñarme que las cosas que valen la pena nunca van a ser fáciles, y que hay que esforzarse para alcanzar nuestras metas.

A mis hermanas Fabi y Rebe por siempre estar y compartir tantos momentos divertidos, espero ser un buen ejemplo a seguir para ustedes; sé que son capaces de alcanzar todas sus metas y brillar tan bonito como lo hacen desde siempre. ¡No se rindan!

A mi familia por animarme a ser mejor cada día. A mis tíos Paty y Carlos por auxiliarme siempre que lo necesité. A mis tíos Marcela y Marco por brindarme oportunidades y herramientas para poder superarme personal y académicamente. Todos ustedes también son un gran ejemplo a seguir para mí. Gracias.

Al Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez por ser un excelente docente y tutor. Sabe cómo motivar a sus alumnos y transmite su pasión por la ciencia. Le agradezco por considerarme como su estudiante de tesis. Por tenerme mucha paciencia y confianza, por motivarme y brindarme las herramientas necesarias para poder superarme tanto académica como personalmente, y por hacer del final de mi carrera algo sumamente divertido. Infinitas gracias.

A los integrantes del Departamento de Bioquímica por sus comentarios y críticas a mi trabajo, las cuales permitieron mejorar mi capacidad crítica y analítica. Y a mis compañeros del laboratorio de tumores, ya que siempre me dedicaban un par de minutos cuando me surgían dudas; por hacer amena y divertida la estancia.

A Miss Ceci por iniciarme en el camino de la ciencia, por impulsarme y enseñarme a perder el miedo.

A Gaby por ser siempre una amiga incondicional, gracias por estar estos últimos once años, significas mucho para mí.

A mis queridos amigos de la facultad, entre ellos Yessi, Blanquita y Andrea, quienes hemos compartido momentos bonitos a lo largo de toda esta aventura, quienes hemos compartido risas e incluso lágrimas y han estado para mí a pesar de la distancia.

Richi, volver a coincidir contigo ha sido increíble. Aquella amistad y conexión que tuvimos desde cuarto semestre sigue intacta, y debemos mantenerla así. Esa práctica de campo es una de las que recuerdo con más cariño. Gracias por acompañarme de día y de noche, y por motivarme a ser una mejor profesionalista.

A 'Las Comadreas': Fer, Vany, Mon y Manu. Estoy segura de que las cosas pasan por algo y conocernos aquel día en clase fue una bonita casualidad, me dio excelentes amigos a quienes estimo mucho. Aquella práctica de campo fue una de las aventuras más

grandes y sobre todo divertidas de la licenciatura, y sé que nos esperan muchas aventuras más.

A Roger, Sharon, Ale y el Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín por estar en las buenas y en las malas; por brindarme su apoyo y cariño aún en momentos sumamente difíciles. Por dedicarme de su tiempo para escucharme y ayudarme a presentar un mejor proyecto de tesis. Gracias.

‘Tener el don de la perseverancia te hace un genio también; ... todo esfuerzo es inútil si no crees en ti mismo’.

-Gai

A SEP-CONACyT por los recursos asignados al proyecto No. 283144 (Dra. Sara Rodríguez Sánchez) y Ciencia de Frontera-CONACyT No. 6379 (Dr. Rafael Moreno Sánchez).

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN.....	1
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES	4
CÁNCER	4
GLIOBLASTOMA.....	5
INVASIÓN Y METALOPROTEASAS.....	16
ERITROSA Y NEUROLEUCINA (HPI/AMF).....	20
CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS.....	22
CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN	24
CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS.....	25
CAPÍTULO V. OBJETIVOS.....	25
GENERAL.....	25
PARTICULARES.....	25
CAPÍTULO VI. METODOLOGÍA	26
CULTIVO LÍNEA CELULAR (MONOCAPA)	26
PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DE CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS (CSC).....	26
WESTERN BLOT	26
INMUNOPRECIPITACIÓN	27
ENSAYO DE INVASIÓN EN CÁMARAS DE BOYDEN	27
DETERMINACIÓN IC50 DE VIABILIDAD.....	28
DETECCIÓN DE NLK EN EL MEDIO EXTRACELULAR	28
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
CAPÍTULO VII. RESULTADOS	30
MARCADORES DE TRONCALIDAD EN CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA SELECCIONADAS	30
EXPRESIÓN DE NLK (HPI).....	32
ENSAYO DE INVASIÓN	33
IC50 DE VIABILIDAD DE ERITROSA EN U373 CSC.....	34
EVALUACIÓN DE NLK EN EL MEDIO EXTRACELULAR AL AÑADIR IC50 DE ERITROSA.....	36
ENSAYO DE INVASIÓN AL AÑADIR IC50 DE ERITROSA	37
CAPÍTULO VIII. DISCUSIÓN.....	39

CSC EN CÁNCER CEREBRALES.....	40
METALOPROTEASAS Y GLIOBLASTOMA.....	41
EFFECTOS DE LA ERITROSA SOBRE LA INVASIÓN.....	43
EFFECTOS DE LA ERITROSA SOBRE LA NLK.....	44
CAPÍTULO IX. CONCLUSIONES	47
REFERENCIAS	48

ABREVIATURAS

AMF	Factor de motilidad autocrina
AMRF	Receptor del factor de motilidad autocrino
BCSC	Breast Cancer Stem Cells (células troncales de cancer de mama)
BHE	Barrera hematoencefálica
CSC	Cancer Stem Cells (células troncales de cáncer)
EMT	Transición epitelio-mesénquima
ERY	Eritrosa
GBM	Glioblastoma
HPI	Hexosa fosfato isomerasa
LGA	Low grade astrocytomas (astrocitoma de bajo grado)
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteasas de matriz
NLK	Neuroleucina
SNC	Sistema nervioso central
TMZ	Temozolomida
WHO	World Health Organization (Organización Mundial de la Salud).

RESUMEN

Actualmente los tumores cerebrales, son parte de los tumores más letales mundialmente y de menor pronóstico (hasta 5 años) en pacientes adultos, teniendo un mejor pronóstico las mujeres. De estos tumores, el más frecuente es el glioblastoma (GBM), y aunque no se conoce con exactitud las causas del desarrollo de este tumor, se sabe que entre las características más relevantes que presenta, están su alta capacidad invasiva, alta recurrencia y malignidad; además, los gliomas representan un porcentaje de 12.5% de la masa cerebral total. Se sabe que esta alta capacidad invasiva se debe a muchos factores, pero principalmente a la sobreexpresión de algunas proteínas proteolíticas que degradan la matriz extracelular (MEC) y permiten que las células migren de un hemisferio a otro a través del tejido (neurópilo), tales como las metaloproteasas (MMPs). La expresión de estas MMPs es mediada por el factor de transcripción Wnt/ β -catenina, que se induce por la activación de vías de señalización activadas extracelularmente por la hexosa fosfato isomerasa (HPI). En el cerebro, se conoce a este factor como neuroleucina (NLK), y desempeña las mismas funciones.

La sobreexpresión de MMPs se ha observado en la población de células troncales (CSC) de GBM, las cuáles se caracterizan por ser las responsables de la iniciación y progresión del cáncer, por ser resistentes a las terapias, por facilitar la recurrencia, por ser metastásicas e invasivas, etc. Debido a las características que presentan las CSC y a su vez la sobreexpresión de MMPs, se han propuesto como un blanco terapéutico para eliminar los tumores, sin embargo, hoy día las terapias existentes no han sido efectivas.

La eritrosa (ERY) es un compuesto natural proveniente del Ruibarbo, que se ha investigado en los últimos años pues se ha documentado que tiene un efecto anticancerígeno en algunas líneas celulares de cáncer de mama y próstata. Anteriormente Gallardo-Pérez, *et al.*, 2017 demostraron que cuando la HPI/AMF se une extracelularmente a su receptor (AMFR/gp78), se activa una vía de señalización que permite a la población de CSC de mama MCF7 presentar un perfil más agresivo, ya que se observa una elevada expresión de marcadores de troncalidad tales como CD44 y Oct 3/4, así como de proteínas del perfil invasivo (MMPs) y de transición epitelio mesénquima (EMT). Sin embargo, observaron que

al agregar ERY a concentraciones bajas (10-100 nM) la expresión de estas proteínas disminuyó significativamente, así como su capacidad invasiva.

Por consiguiente, en este trabajo se obtuvo, a partir de una línea celular de glioblastoma (U373), una fracción de CSC (80% de células recuperadas) a partir de la modificación de un protocolo de estrés microambiental ya establecido en el grupo de trabajo [Gallardo-Pérez, *et al.*, 2017]. Las poblaciones parental y troncal (CSC) se obtuvieron a partir de un cultivo en monocapa, y se midieron en ambas poblaciones marcadores de troncalidad (CD133, CD44, y Wnt/ β catenina), colonización (NOTCH) pluripotencia (Oct $\frac{3}{4}$) y algunas proteínas del perfil EMT (MMP-1, MMP-9, vimentina).

Se obtuvo que en la población U373 CSC la expresión de CD133 aumentó nueve veces, Oct $\frac{3}{4}$ ocho veces, NOTCH dos veces, Wnt/ β catenina tres veces, MMP-9 seis veces y vimentina tres veces más con respecto a la población parental; mientras que parece no haber diferencia en la expresión de MMP-1. Dichas poblaciones celulares, se sometieron a un ensayo de invasión en cámaras de Boyden observando que ambas presentan una alta capacidad invasiva, siendo hasta tres veces mayor en las células troncales. Así mismo, para dilucidar si la vía HPI-AMF/gp78 está activa en ambas poblaciones, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de HPI/AMF, observando que esta se encuentra muy poco fosforilada en residuos de serina en ambas poblaciones, y está mayormente fosforilada en residuos de treonina, más de siete veces en la población U373 respecto a la parental, lo cual correlacionó con la mayor secreción de HPI/AMF al medio extracelular (14 veces más) en la población CSC U373 de GBM.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la eritrosa en la invasión tumoral se realizaron ensayos con la IC50 de ERY, 350 nM durante 24 hrs en la población de células troncales, y se observó que la expresión de MMP-9 disminuyó un 50%; mientras que la capacidad invasiva también disminuyó cerca del 80%.

Nuestros resultados sugieren que la población CSC en la línea celular U373 es la responsable de impulsar la invasión celular debido a que esta fracción sobreexpresa proteínas importantes en los procesos de EMT tales como MMPs y vimentina. Estos parámetros se ven afectados al añadir ERY 350 nM, lo que sugiere que este compuesto puede ser un anticancerígeno efectivo en GBM, un tumor en donde no hay una terapia competente para este proceso altamente invasivo.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El glioblastoma (GBM) es el tumor primario más común en el sistema nervioso central (SNC) [Dunn *et al.*, 2012], el cual se caracteriza por ser metastásico, altamente invasivo, de rápido crecimiento y con presencia de un fenotipo troncal (células troncales de cáncer, CSC) [Stupp *et al.*, 2005, Hoelzinger *et al.*, 2007].

Las CSC se caracterizan por ser las responsables de la iniciación y progresión del cáncer, por ser resistentes a las terapias, por facilitar la recurrencia, entre otras [Yu *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013]. Debido a las características que presentan se han propuesto como un blanco terapéutico para eliminar los tumores, sin embargo, hoy en día las terapias existentes no han sido efectivas.

Dado que una de las principales características del GBM es su alta capacidad invasiva, ha sido de importancia el estudio de esta como un blanco terapéutico. Para que la invasión ocurra se requiere que previamente que algunas células se separen del tumor original, pierdan su adhesión y adquieran la capacidad de degradar la MEC, así como la activación de mecanismos de motilidad para permitir el paso de las células tumorales hacia el torrente sanguíneo [Viapiano y Lawler, 2009]. Las MMPs son las principales enzimas proteolíticas que degradan el tejido conectivo y los componentes de la membrana basal, además de activar factores de crecimiento, receptores de superficie para moléculas de adhesión y quimiocinas [Van Damme *et al.*, 2004; Coronato *et al.*, 2012]. La interacción entre los componentes de la MEC y las MMPs genera un cambio en el microambiente tumoral, lo que permite que las células del tumor se puedan desprender y por tanto puedan migrar e invadir.

Existen tratamientos para combatir este tumor cerebral, los cuales incluyen cirugías, radioterapias y quimioterapias, sin embargo, el pronóstico de un GBM en adultos sigue siendo pobre pues sólo una tercera parte de los pacientes sobreviven por un año y la tasa de supervivencia a 5 años es solo del 9,8% [Oike

et al., 2013]. Por ende, se requiere de nuevos tratamientos que tengan como objetivo dirigirse a las CSC y la inhibición de la invasión de este tumor.

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

CÁNCER

El cáncer se puede definir según la WHO [2018] como un conjunto de enfermedades que se caracterizan por poseer la capacidad celular de mantener la señalización proliferativa. Esto es posible ya que estas células malignas pueden evadir los supresores del crecimiento, son resistentes a muerte celular, inducen la angiogénesis y entre otros aspectos activan la invasión y metástasis [Hanahan y Weinberg, 2011]. Estas células excedentes en los tejidos, al tener una tasa proliferativa alta forman neoplasias (masas de tejido anormal).

Aunque algunos tumores (tumor; incremento en volumen) pueden no ser cancerosos y considerarse benignos, es decir que se pueden extirpar con cirugía, generalmente no son recurrentes y no se diseminan a otras partes del cuerpo (como los adenomas, fibromas, lipomas, entre otros); también existen los tumores cancerosos o malignos que pueden invadir y destruir el tejido a su alrededor, e incluso pueden llevar a cabo metástasis [Globocan, 2020].

Actualmente el cáncer según la WHO [2018] es la segunda causa de muerte a nivel mundial, y cerca de un tercio de las muertes producidas por cáncer se deben a factores de riesgo conductuales y dietéticos como: un índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol entre otros; mientras que el resto se debe a factores reproductivos y hormonales, así como la exposición a radiación: ionizante, ultravioleta y electromagnética, la contaminación del aire, agua y suelo (principalmente por bisfenol A y pesticidas), así como el uso de algunos fármacos como Sulindac, Oxazepam, Paroxetina, etc. [Friedman *et al.*, 2009; Stewart y Wild, 2014]. En México, el cáncer es la tercera causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes [SMeO, 2016].

GLIOBLASTOMA

Los tumores del sistema nervioso central pueden surgir de varios linajes celulares diferentes que incluyen la glía, como los astrocitos y los oligodendrocitos. Los tumores astrocíticos (astrocitomas o glioblastomas) se dividen en dos categorías distintas en función de cómo interactúan con su microambiente inmediato: astrocitomas difusos y localizados (Fig.1). Los astrocitomas localizados tienen un patrón de crecimiento circunscrito y un potencial invasivo limitado, mientras que los astrocitomas difusos (o glioblastoma multiforme) se caracterizan por su infiltración celular del margen peritumoral y se dispersan a sitios distantes, independientemente del grado del tumor [Hoelzinger *et al.*, 2007].

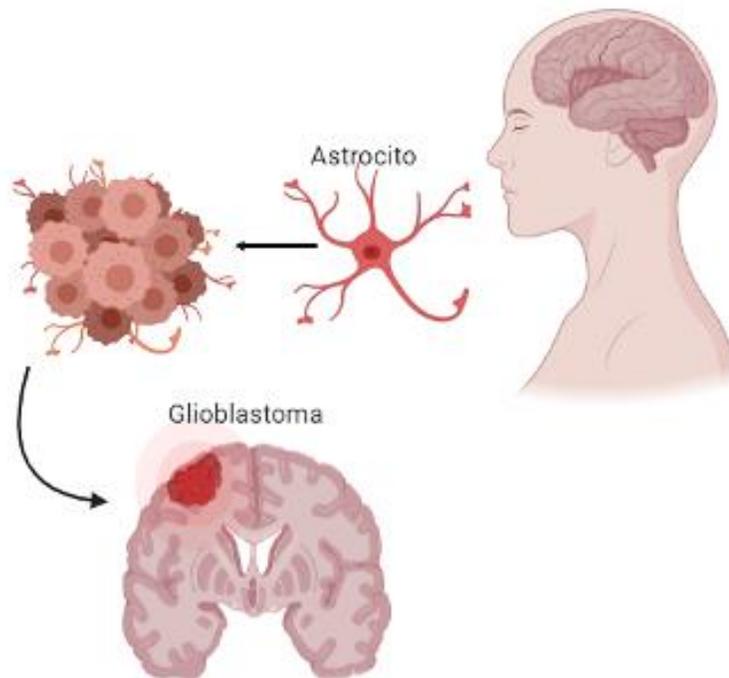


Figura 1. GBM y células de origen (astrocitos) [Creado con Biorender.com].

Características del glioblastoma

El GBM es uno de los tumores malignos primarios más comunes en el SNC, ya que representa aproximadamente 40% de todos los tumores intracraneales [Dunn *et al.*, 2012]. Aunque este es un tumor poco frecuente con una incidencia global de menos de 10 por cada 100,000 personas, su pronóstico es malo, ya que

es altamente letal [Hanif *et al.*, 2017] a comparación de otros tumores como los de cáncer de mama o próstata, como se explica más adelante.

De acuerdo con la WHO, los gliomas se pueden dividir en cuatro grados I, II, III y VI:

- Grado I: Tumores circunscritos, de lento crecimiento y bajo potencial de conversión a un tumor de mayor malignidad.
- Grado II: Tumores de borde difuso, lento crecimiento y, algunos, con tendencia a progresar a tumores de mayor malignidad.
- Grado III: Tumores infiltrantes con células atípicas o anaplásicas y mayor número de mitosis.
- Grado IV: Tumores de rápido crecimiento con alta tasa mitótica, pudiendo presentar vasos de neoformación y áreas de necrosis.

De estos el GBM (grado IV), es la forma más maligna de astrocitoma [Liu *et al.*, 2019] debido a que el tumor presenta necrosis (células muertas) y el aumento de vasos sanguíneos alrededor del tumor, además de que estos tumores de grado IV siempre son tumores de crecimiento rápido y apariencia histológicamente anormal [ABTA, 2018].

Las características clínicas del GBM son su alta capacidad invasiva (difusa), crecimiento rápido y recurrencia inevitable a los tratamientos [Stupp *et al.*, 2005, Hoelzinger *et al.*, 2007], además de que se desarrolla tanto en niños como en adultos.

Síntomas

Dado que el cráneo no se puede expandir en respuesta al crecimiento de un tumor, los primeros síntomas que desarrolla un GBM generalmente se deben a un aumento de la presión en el cerebro [ABTA, 2018].

Es por esto que los dolores de cabeza, náuseas, vómitos, mareos, convulsiones, pérdida de memoria y cambios de comportamiento son los síntomas

más comunes. También son comunes la pérdida de movimiento o sensibilidad en un lado del cuerpo, disfunción en el lenguaje y trastornos cognitivos [ABTA, 2018].

En el caso de los gliomas pediátricos, se ha reportado que los síntomas son similares a los de adultos, aunque las convulsiones son más frecuentes y se presenta una alta incidencia de síntomas de tensión intracraneal elevada, la cual se cree que ocurre ya que a menudo se pasan por alto los síntomas iniciales de deficiencias motoras sutiles o quejas visuales [Das *et al.*, 2012].

Localización del tumor

La localización del GBM varía según la región del cerebro: en el 31% de los casos se encuentra en el lóbulo temporal; en el 24% en el lóbulo parietal; en el 23% en el lóbulo frontal, y en el 16% en el lóbulo occipital. La presencia del GBM en el área fronto-temporal también es frecuente (Fig. 2) [Celis *et al.*, 2015].

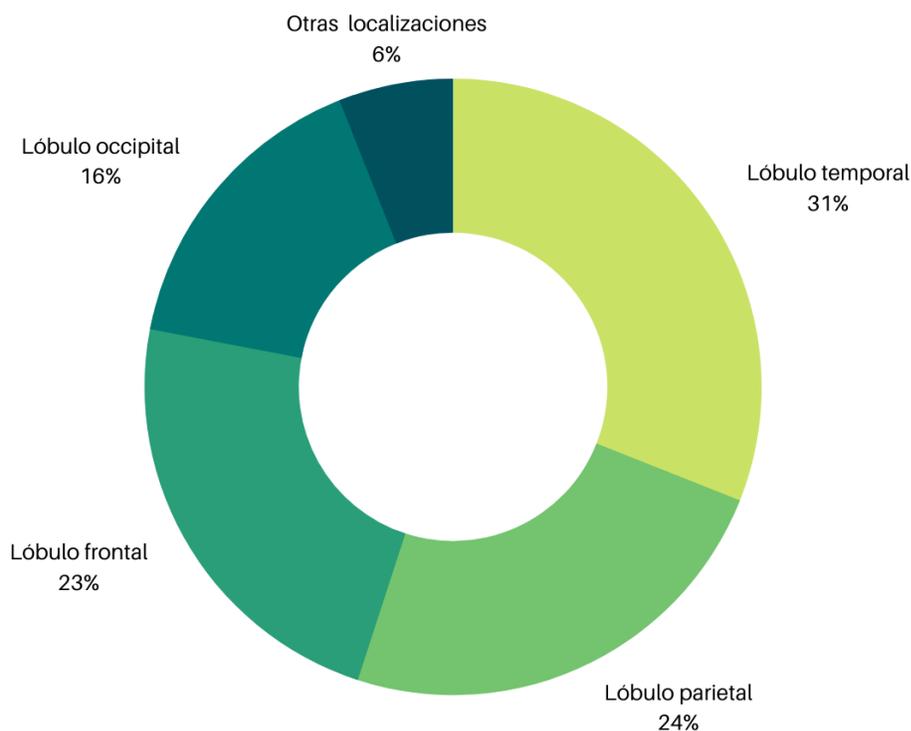


Figura 2. Localización más frecuente del GBM [Celis *et al.*,2015].

Diagnóstico

El pronóstico de un paciente con este tumor generalmente es malo, y puede deberse a diversos factores como un diagnóstico tardío (debido a que la sintomatología que genera este tumor no es clara, e incluso en algunos casos no se presentan síntomas), dificultad para identificar claramente el tumor debido a su heterogeneidad histopatológica, recaída del tumor debido a células troncales cancerosas (CSC), dificultades en la identificación y aislamiento de estas células, y escasez de conocimiento sobre la fisiología de las CSC [Cheray *et al.*, 2017].

Una vez que se sospecha que una persona podría presentar un GBM, este tumor se puede detectar por distintas técnicas, siendo la más empleada las tomografías y las resonancias magnéticas nucleares, ya que éstas permiten identificar el sitio exacto donde se localiza el tumor, así como su tamaño.

Incidencia y mortalidad

El GBM no presenta una incidencia alta a nivel mundial comparado con otros tipos de cánceres como el de mama, pulmón, colorrectal o próstata, ya que representa únicamente el 2% de los casos totales de cáncer; y es más frecuente en hombres (Fig. 3A y B); sin embargo, pese a que la incidencia es baja, la tasa de mortalidad es más alta que el cáncer de mama, próstata o colorrectal (Fig. 4) ya que mueren, aproximadamente, el 82% de los pacientes detectados con esta enfermedad (similar a lo reportado para pulmón) [Globocan, 2020].

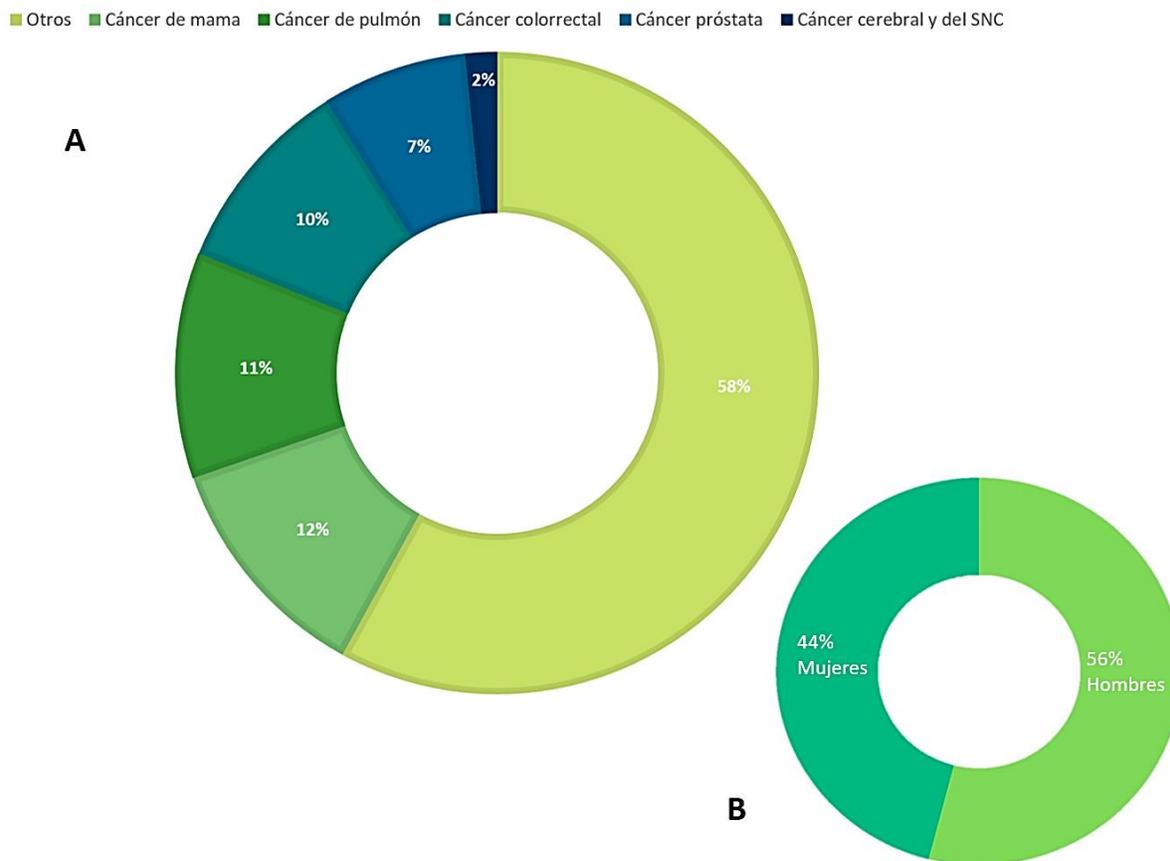


Figura 3. Incidencia de GBM a nivel mundial comparada con los tipos de cáncer más frecuentes. (A) El GBM representa 2% de incidencia a nivel mundial en ambos sexos y a todas las edades. (B) El GBM es más frecuente en hombres que en mujeres [Tomado de Globocan, 2020].

En los diferentes tipos de cáncer cerebral y del SNC a pesar de ser de baja incidencia (2%), la mortalidad es alta (similar a lo reportado para cáncer de pulmón), ya que muere más del 82% de los pacientes diagnosticados, en comparación con otros tipos de cáncer como lo son de mama, próstata o colorrectal dónde la incidencia es mayor, pero la mortalidad va de un 25-50% (Fig. 4).

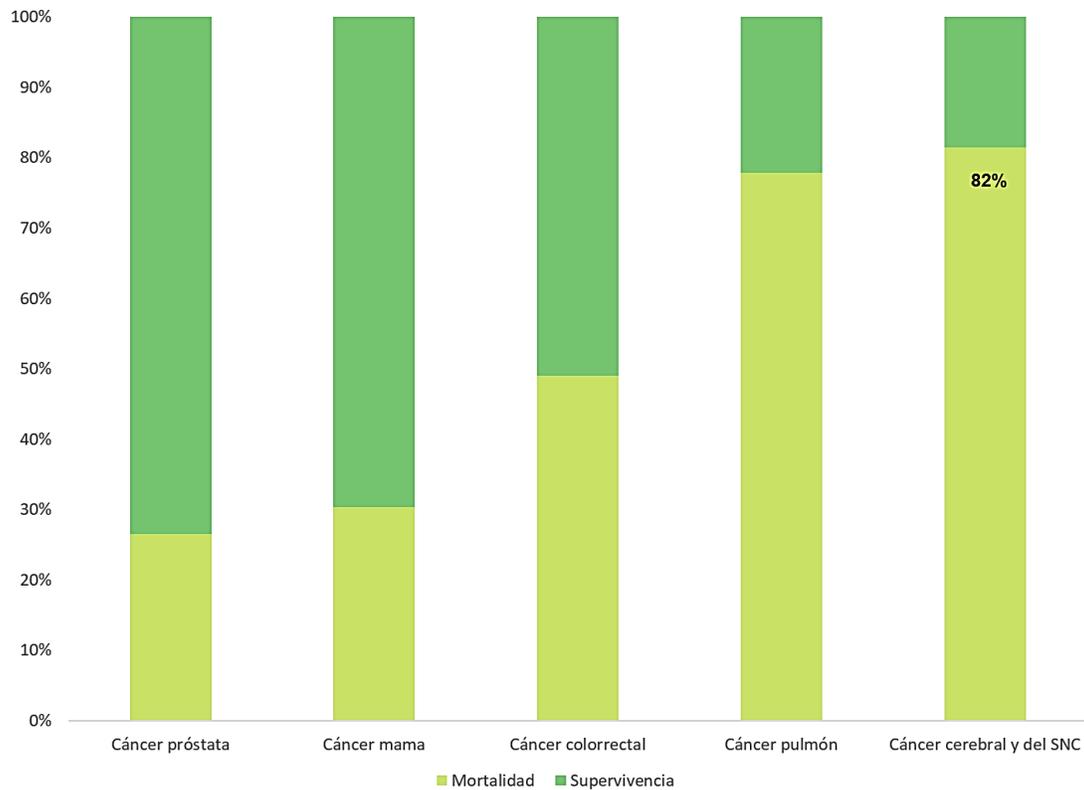


Figura 4. Porcentaje de mortalidad de los tipos de cáncer más frecuentes a nivel mundial, respecto al número total de casos por tipo de cáncer. *La mortalidad de los tipos de cáncer cerebral y del SNC (GBM) es cercana al 82% [Tomado de Globocan, 2020].

En México las estadísticas de incidencia y mortalidad de pacientes con cáncer cerebral y del SNC es similar, pues representa el 2% de incidencia (Fig. 5), es decir es poco frecuente; sin embargo, la mortalidad es cercana a 82% (casi tan alta como el cáncer de pulmón); mientras que la mortalidad de otros tipos de cáncer más incidentes como mama, próstata o colorrectal va del 25-50% (Fig. 6).

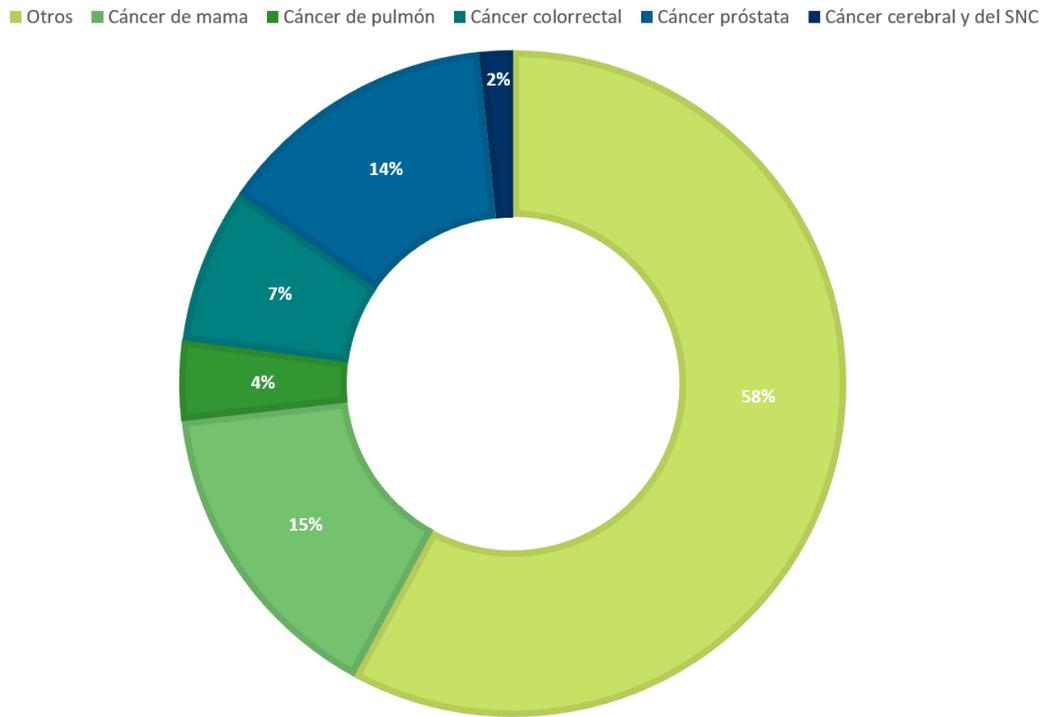


Figura 5. Incidencia de GBM en México comparada con los tipos de cáncer más para ambos sexos y todas las edades [Globocan, 2020].

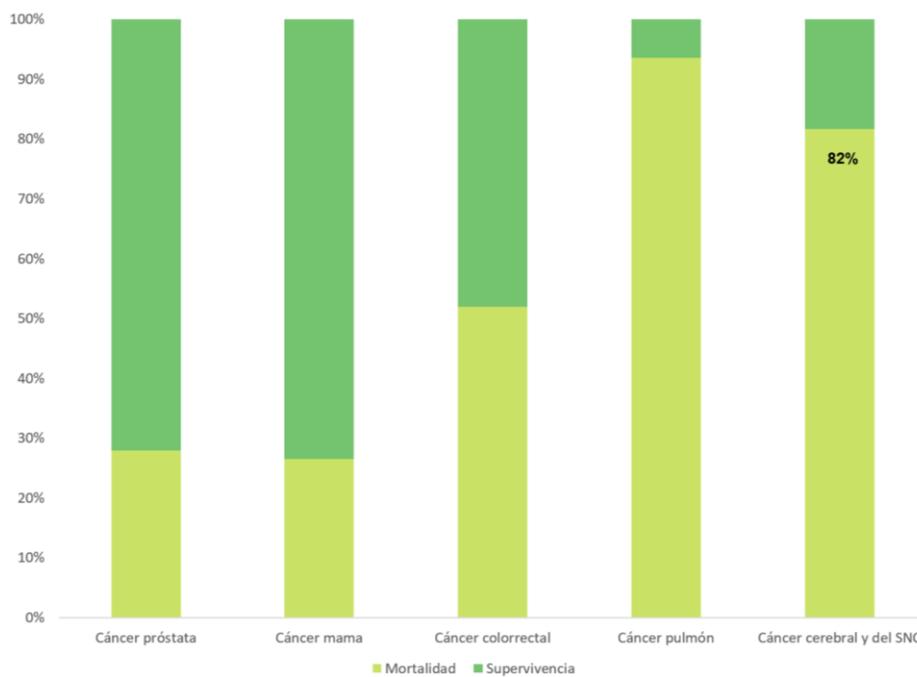


Figura 6. Porcentaje de mortalidad de los tipos de cáncer más frecuentes en México, respecto al número total de casos por tipo de cáncer. *La mortalidad de los tipos de cáncer cerebral y del SNC (GBM) es cercana al 82% [Tomado de Globocan, 2018].

En cuanto al desarrollo de gliomas en niños se sabe que representa no más del 3–15% de los tumores primarios del SNC [Perkins *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2010]. La mediana de supervivencia reportada para este tumor puede variar de 13 a 73 meses con una supervivencia a 5 años menor al 20% y se ha demostrado que al igual que en pacientes adultos, muestra una clara prevalencia masculina [Das *et al.*, 2012]. De igual forma se ha observado que los GBMs secundarios tienden a tener una mayor supervivencia que los primarios [Ohgaki *et al.*, 2004].

Sin embargo, a pesar de que la incidencia del GBM es baja, se necesitan mejores herramientas de diagnóstico para detectar estos tumores tempranamente.

A pesar de que existen tratamientos como cirugías, radioterapias y quimioterapias, el pronóstico de un GBM en adultos sigue siendo pobre pues sólo una tercera parte de los pacientes sobreviven por un año y la tasa de supervivencia a 5 años es solo del 9,8% [Oike *et al.*, 2013], mientras que en el caso de otros tumores como mama la supervivencia a 5 años (en promedio) es mayor ya que es arriba del 80% en la mayoría de los casos [Maffuz *et al.*, 2016].

Incluso se ha reportado que los ensayos de quimioterapia con Temozolomida (TMZ) (la principal estrategia de tratamiento del cual se habla más adelante) en adultos no han podido replicar los mismos resultados en pacientes pediátricos, ya que no se ha mostrado mejoras en la supervivencia [Das *et al.*, 2012].

Factores de riesgo

A pesar de que no se conoce la causa exacta por la cual se desarrolla este tumor, se ha observado que un factor común en pacientes son exposiciones previas a radiación ionizante (principalmente aquellas que fueron administradas para tratar un tumor diferente). También se ha observado que pacientes con algún síndrome genético como lo son la neurofibromatosis, la esclerosis tuberosa y la enfermedad de von Hippel-Lindau; o incluso pacientes hombres y/o aquellos

pacientes mayores a 50 años, son más propensos a desarrollar un GBM [Rimas *et al.*,2019].

En el caso de pacientes pediátricos Das *et al.*, 2012, mencionan que en su estudio se identificó como edad media al momento del diagnóstico 13.3 ± 4.5 años, por tanto, esto podría indicar que los factores ambientales ‘dañinos’ probablemente demoran al menos una década en incurrir en aberraciones genéticas suficientes para provocar el desarrollo de GBM.

Tratamiento

Además de las dificultades asociadas con el tratamiento de tumores heterogéneos (como el GBM), que evolucionan a lo largo de la enfermedad y albergan subpoblaciones de células resistentes al tratamiento, la barrera hematoencefálica (BHE) es otro impedimento para el tratamiento efectivo de estos tumores [Rimas *et al.*,2019].

El medio interno del SNC se encuentra aislado con respecto a la circulación sanguínea por una estructura conocida como BHE, la cual impide el intercambio libre de iones y moléculas orgánicas entre el plasma sanguíneo y el tejido nervioso [Pascual *et al.*, 2004], y a excepción del agua, algunos gases como el oxígeno, el CO₂ y determinadas moléculas liposolubles pequeñas –menores de 400-600 Da de peso molecular–, las moléculas orgánicas no pueden atravesar libremente dicho endotelio, sino que deben hacerlo a través de sistemas de transporte específicos y regulados [Pardridge, 2002].

Actualmente ha habido grandes avances en las opciones de tratamiento, el que incluye la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia adyuvante, siendo uno de los fármacos más exitosos en atravesar la BHE la TMZ [Liu *et al.*, 2019].

- Cirugía: La cirugía se considera un paso importante en el tratamiento ya que además de ofrecer biopsias que sirven para hacer diagnóstico histológico y molecular, alivia el efecto de presión en el cerebro relacionado con el tumor y sus síntomas asociados. Sin embargo, debido a la naturaleza infiltrativa de la enfermedad, incluso la

resección macroscópicamente completa no es curativa [Rimas *et al.*,2019].

- Radiación: Se ha demostrado que la radioterapia mejora la supervivencia en el GBM y desempeña un papel clave en el tratamiento. La radioterapia conformada tridimensional moderna, que utiliza planificación computarizada tridimensional y modulación de haces múltiples, trata focalmente la enfermedad mediante radioterapia de intensidad modulada (IMRT) [Rimas *et al.*,2019]; sin embargo, este tratamiento puede variar en tiempo e intensidad según el paciente.

La radioterapia es un tratamiento local (es decir afecta el área del cuerpo donde está ubicado el tumor), trata muchos tipos de cáncer de forma eficaz, sin embargo, causa efectos secundarios. Estos son diferentes para cada persona. Dependen del tipo de cáncer, de su ubicación, de las dosis de radioterapia y de su estado de salud general.

Los efectos secundarios pueden variar. Se ha reportado que algunos de los efectos provocados por la radioterapia a la cabeza son desde problemas cutáneos (como resequedad o picazón), fatiga, náuseas, caída del cabello, linfedemas, caries etc, incluso en algunos casos el desarrollo de un nuevo cáncer [ASCO, 2018].

- Quimioterapia: El fármaco canónico que se administra actualmente para tratar este tumor es la TMZ, el cual es un agente de quimioterapia alquilante de ADN que está diseñado para atravesar fácilmente la BHE.

La TMZ es una molécula lipofílica pequeña (194 Da), disponible por vía oral de la clase de imidazotetrazina, el cual actúa como un profármaco, estable a valores de pH ácido [Zhang *et al.*, 2012; Wesolowski *et al.*, 2010].

La TMZ una vez administrado vía oral, llega al intestino delgado y posteriormente vía torrente sanguíneo atraviesa la BHE, dónde se descompone para formar monometiltriazeno 5- (3-metiltriazen-1-il) imidazol-4-carboxamida (MTIC), el cual es el principio activo. MTIC además reacciona con agua para liberar 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC) y el catión metildiazonio que es altamente reactivo. El catión metila preferentemente ADN en posiciones ricas en guanina que, si no se reparan, provocan roturas de la cadena de ADN y citotoxicidad (Fig. 7) [Zhang *et al.*, 2012].

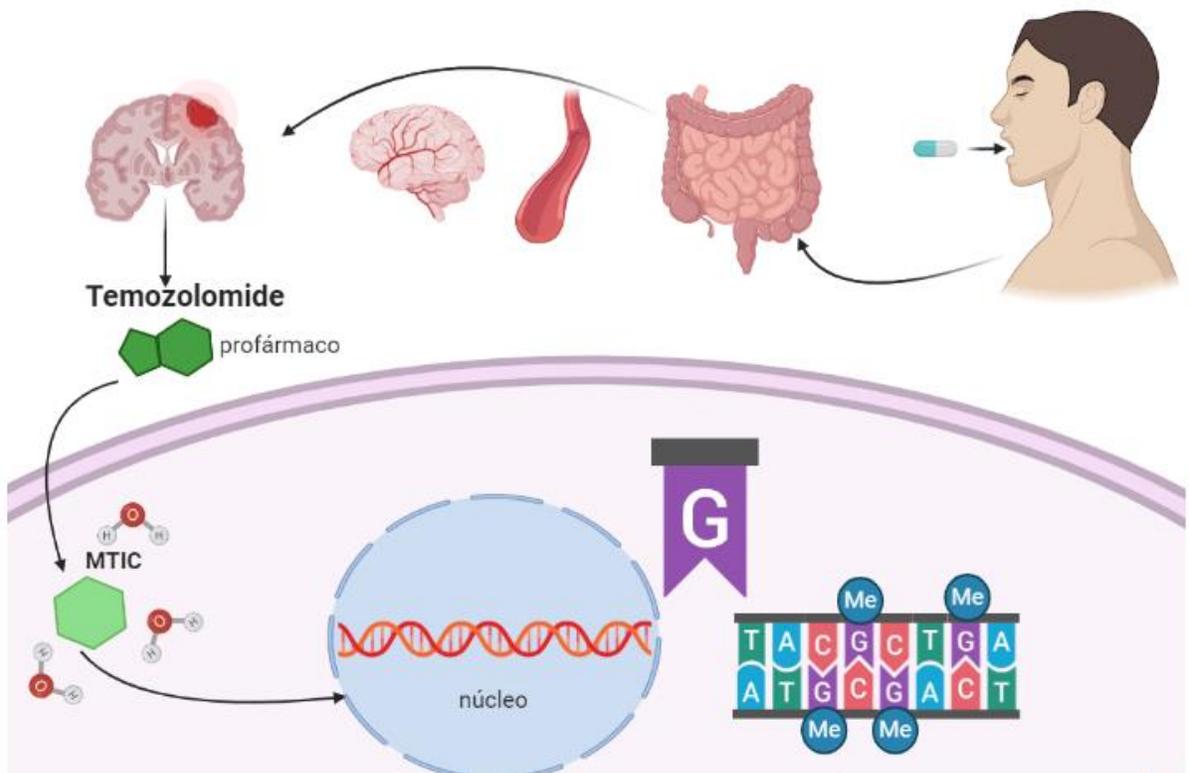


Figura 7. Mecanismo de acción de Temozolomida [Creado con BioRender].

A pesar de que existen algunos estudios que indican que el tratamiento con TMZ puede ser efectivo, también se ha demostrado que la metilación del promotor

del gen MGMT y la mutación IDH1 se correlacionan con una supervivencia más larga [Rulseh *et al.*, 2012]; sin embargo hay otros estudios en dónde se ha observado que la mayoría de los gliomas recurren después de una terapia inicial, y que incluso en la recurrencia, los gliomas de bajo grado que fueron tratados con TMZ pueden sufrir transformaciones en gliomas de alto grado (grado III o grado IV) debido a que este fármaco puede provocar hipermutaciones [Choi *et al.*, 2018].

Por tanto, a pesar de los intentos por generar terapias más efectivas para tratar este tipo tumor, no se ha obtenido avances significativos ya que la prognosis de los pacientes sigue siendo baja, resultado de un patrón de crecimiento local agresivo y el marcado grado de invasividad mostrado por estos tumores [Hagemann *et al.*, 2012].

INVASIÓN Y METALOPROTEASAS

La invasión se entiende como la capacidad de las células tumorales para infiltrarse en el tejido y propagarse más allá del tumor original [Friedl y Wolf, 2003]. Dado que una de las principales características del GBM es su alta capacidad invasiva, ha sido de gran importancia su estudio.

Para que la invasión ocurra se requiere previamente que algunas células se separen del tumor original, pierdan su adhesión y adquieran la capacidad de degradar MEC, así como la activación de mecanismos de motilidad para permitir el paso de las células tumorales hacia el torrente sanguíneo [Viapiano y Lawler, 2009].

Se sabe que la infiltración de estas células tumorales en el neurópilo (red de prolongaciones neuronales y gliales) ocurre con poca distorsión del tejido y no parece provocar respuestas inflamatorias u otras respuestas inmunitarias; por ende, estas células no pueden ser detectadas clínicamente [Claes *et al.*, 2007]. Asimismo, se sabe que las terapias actuales están diseñadas para atacar las células proliferantes que pueden quedar después de una resección quirúrgica o

directamente al tumor a través de citotóxicos y fármacos antiangiogénicos; es decir, no existe una terapia dirigida o específica que pueda atacar a las células que estén en el proceso invasivo o migrando [Viapiano y Lawler, 2009].

Es importante mencionar que entre tumores existen diferencias incluso en los mecanismos de invasión. Un claro ejemplo de esto es que debido a que el tejido del sistema nervioso central es altamente refractario, las células tumorales que hacen metástasis e invasión al SNC casi nunca lo invaden, por lo que crecen empujando el tejido neural [Subramanian *et al.*, 2002], mientras que las células de glioma pueden colonizar perfectamente el cerebro (metástasis intraparenquimatosa) [Viapiano y Lawler, 2009].

Las células de glioma (grado 4) invaden comúnmente a lo largo de los tractos de materia blanca, lo cual conduce a la invasión del hemisferio opuesto dónde se desarrolló el tumor primario. Sin embargo, también pueden invadir a lo largo de las fibras de mielina, en tractos de materia blanca y subpial, perivascular (a lo largo de vasos sanguíneos) y perineuronal (Fig. 8) [Claes *et al.*, 2007].

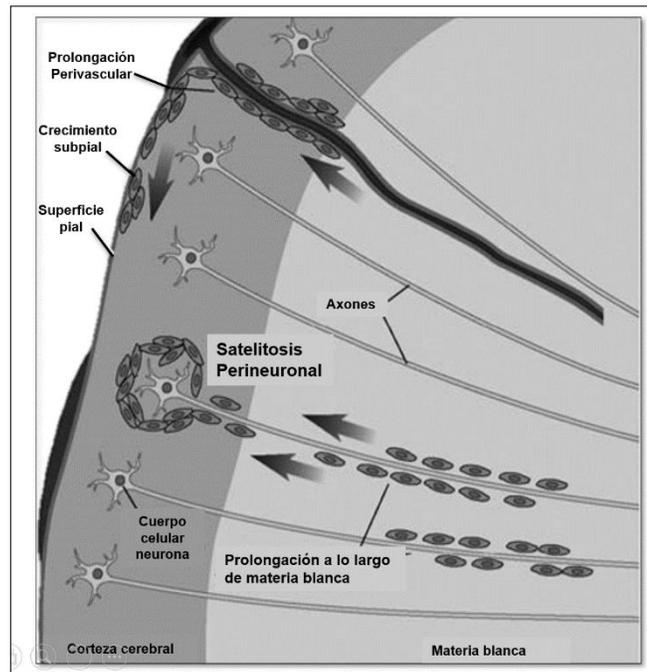


Figura 8. Vías de invasión de glioma. Tomado de Viapiano y Lawler, 2009.

A diferencia de otros tumores, el glioma no hace intravasación, ni hace metástasis fuera del cerebro, lo cual podría indicar un alto grado de especialización de las células de glioma para adaptarse a los componentes y estructura específicos del SNC [Viapiano y Lawler, 2009].

Se ha demostrado que las enzimas proteolíticas juegan un papel importante en la invasión tumoral. Este proceso se inicia con la degradación de la MEC, membrana basal, lámina basal y estroma intersticial, lo cual permite a las células migrar a tejidos adyacentes [Weinmann y Ottow, 2007].

La MEC está formada por diversos componentes entre los que se encuentran proteoglicanos, glucosaminoglicanos, proteínas estructurales tales como colágeno y elastina, proteínas de adhesión como fibronectina y laminina [Coronato *et al.*, 2012].

Las MMPs pertenecen a una familia de endopeptidasas zinc-dependientes que intervienen en los procesos fisiológicos de organogénesis, cicatrización, involución uterina y también en diversas condiciones patológicas, como la inflamación, enfermedades autoinmunes y carcinogénesis [Page *et al.*, 2007]. Sin embargo, trabajos más recientes han reportado evidencia del papel de estas enzimas dentro de la célula al atacar sustratos que no son de la matriz, como citocinas unidas a células, enzimas y receptores de superficie celular [Limb *et al.*, 2005]. Actualmente se conocen 28 enzimas MMPs en vertebrados, de las cuales 24 genes se encuentran en humanos [Coronato *et al.*, 2012; Bassiouni *et al.*, 2021].

Estas MMPs son las principales enzimas proteolíticas que regulan las alteraciones en el microambiente tumoral, pues desempeñan un papel fundamental en la degradación del tejido conectivo y los componentes de la membrana basal, además de activar factores de crecimiento, receptores de superficie para moléculas de adhesión y quimiocinas [Van Damme *et al.*, 2004; Coronato *et al.*, 2012]. La interacción entre los componentes de la MEC y las MMPs genera un cambio en el microambiente tumoral, lo que permite que las células del tumor se puedan desprender y por tanto puedan migrar e invadir otros tejidos.

Se ha descrito que las distintas MMPs durante la progresión del tumor desempeñan roles distintos pues en estadios tempranos, por ejemplo, la

proteólisis mediada por MMP-3 y 7 de proteínas específicas que unen factores de crecimiento, contribuye a la proliferación celular; mientras que MMP-2 y 9 cuando se sobreexpresan indican un pronóstico desfavorable ya que degradan el colágeno tipo IV localizado en las membranas basales e inducen la expresión de factores angiogénicos [Coronato *et al.*, 2012].

La sobreexpresión de estas proteinasas, esta mediada por un factor de transcripción que se induce bajo la activación de algunas vías de señalización (tales como la vía Wnt/ β -catenina o NF- κ B) activadas extracelularmente por la NLK (o HPI/AMF) al unirse a su receptor gp78 de la cual se habla más adelante (Fig. 9).

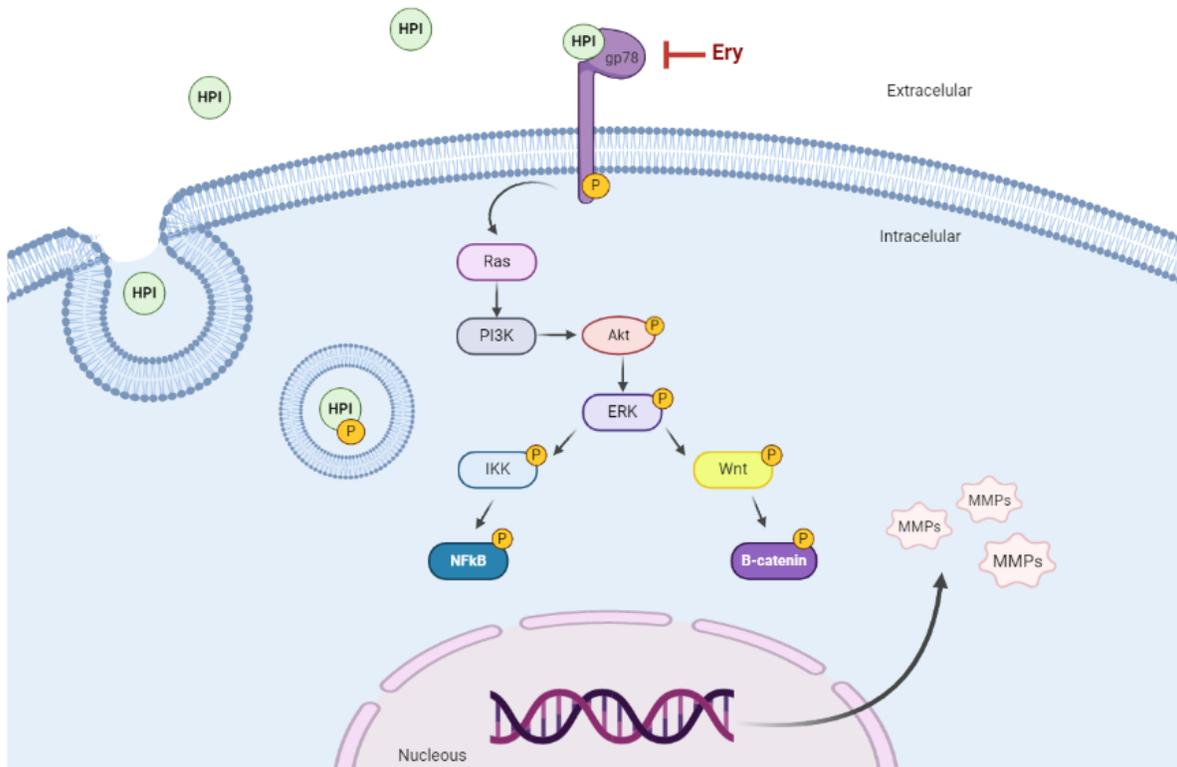


Figura 9. Vía de señalización generada cuando el factor NLK/AMF se une al receptor gp78. Debido a la inducción de la vía Wnt/ β -catenina o NF- κ B se activan vías de EMT y troncalidad, sin embargo, se ha observado que la eritrosa (ERY) inhibe la interacción de la NLK/AMF (HPI) con su receptor [Gallardo-Pérez, et al., 2017] [Creado con Biorender.com].

Debido a esto, se ha propuesto la inhibición de las MMPs como un posible blanco terapéutico para detener o al menos retrasar la invasión tumoral y, en

última instancia, prolongar la supervivencia del paciente [Hagemann *et al.*, 2012], no obstante su inhibición con inhibidores sintéticos (como el Marimastat) y naturales ha tenido, hasta el momento, poco éxito clínico debido al desarrollo de efectos adversos como los efectos secundarios musculoesqueléticos reportados en ratas y rigidez, dolor e inflamación de las articulaciones de las extremidades superiores en humanos (10 mg dos veces al día) [Renkiewicz *et al.*, 2003; French *et al.*, 2005; Weinmann y Ottow, 2007; Coronato *et al.*, 2012].

ERITROSA Y NEUROLEUCINA (HPI/AMF)

Para que una célula pueda activar los mecanismos necesarios para poder desplazarse, se requiere de la expresión de citocinas (como la neuroleucina NLK) que inducen la motilidad celular en procesos como la curación de heridas (factor de dispersión) y la embriogénesis (factor estimulante de la migración), mientras que su activación autocrina constitutiva (como factor de motilidad autocrino NLK o AMF) puede conferir capacidades metastásicas a las células tumorales [Watanabe *et al.*, 1991] al unirse extracelularmente a su receptor gp78 (AMFR) [Watanabe *et al.*, 1991; Niinaka *et al.*, 1998].

El receptor del factor de motilidad autocrino gp78 (AMFR) es una ubiquitina E3 ligasa involucrada en la degradación de proteínas a través del retículo endoplásmico [Fang *et al.*, 2001], y se ha demostrado que la unión de ligando puede inducir cambios que permiten una mayor supervivencia, proliferación y potencial invasivo en las células. Incluso la sobreexpresión de este receptor y su ligando se asocia con un mal pronóstico [Connie *et al.*, 2008].

Aunque se sabe que AMF es secretado por las células tumorales para estimular los mecanismos de metástasis e invasión se ha reportado que en el citosol cumple funciones enzimáticas, pues forma parte de las enzimas glucolíticas convirtiendo la glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato, y se conoce a esta enzima como hexosa fosfato isomerasa (HPI) [Jeffery *et al.*, 2000].

Además, se ha reportado que su secuencia parece ser idéntica a la de la NLK [Niinaka *et al.*, 1998; Jeffery *et al.*, 2000], la cual es una proteína que se encuentra en grandes cantidades en músculo, cerebro, corazón y riñones, y que actúa como factor neurotrófico para las neuronas espinales y sensoriales [Niinaka *et al.*, 1998]. Por lo tanto, al referirse a la HPI, AMF o NLK, se está hablando de la misma proteína que actúa como enzima o como citocina dependiendo del contexto celular.

La eritrosa (ERY) es una tetrosa que existe en el cuerpo humano en forma de D-eritrosa 4-fosfato, este es un intermediario de la vía de las pentosas fosfato [Liu *et al.*, 2015].

Se ha observado que este compuesto está presente en el Ruibarbo (*Rheum rhabarbarum*) una planta perteneciente a la familia *Polygonaceae* que se ha empleado como parte de la medicina tradicional. Entre otros compuestos de interés que se han extraído de esta planta están el crisofanol, aloe-emodina, emodina, etc; atribuyendo a esta planta actividades antiinflamatorias, antiangiogénicas, anticancerígenas entre otras [Gao *et al.*, 2021; Jintao *et al.*, 2018].

La eritrosa se ha empleado como un compuesto anticancerígeno, debido a que a concentraciones bajas de ERY (24 nM) en un modelo de cáncer de mama, procesos como la migración, invasión, la expresión de marcadores tumorales y algunas proteínas de EMT disminuyeron significativamente; y de igual forma este no afectó a las células no tumorales a esas concentraciones [Gallardo-Pérez *et al.*, 2017]. Así mismo, se ha reportado en un modelo de carcinoma al emplear ERY de colon se disminuyó el crecimiento de las células cancerosas y un aumento de la apoptosis sin efectos tóxicos [Liu *et al.*, 2015]. De este modo se propone que la ERY pudiera ser efectiva en el tratamiento del potencial invasivo en GBM.

CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS

Las células troncales cancerosas (CSC) son una pequeña subpoblación de células dentro de los tumores (0.01 a 2.5% del total de la masa tumoral; para pacientes con glioma, la expresión de CD133 (un marcador de troncalidad) puede llegar a presentarse hasta en un 12.5% de la masa tumoral total [Dirkse *et al.*, 2019]) lo cual indica que la proporción de CSC es mayor en GBM. Estas células presentan capacidades de autorrenovación, pluripotencia, diferenciación, resistencia a fármacos y tumorigenicidad; y es a esta subpoblación celular a la que se le atribuye el inicio, desarrollo, metástasis y recurrencia del tumor [Yu *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013]. Por lo que se han propuesto como un blanco importante en el tratamiento contra el cáncer.

Los tumores sólidos, como los GBM, se caracterizan por un alto grado de heterogeneidad, lo que ha sido explicado por dos hipótesis. Según la primera hipótesis, el modelo estocástico (Fig.10A), las células tumorales comparten las mismas mutaciones genéticas (homogéneas) que una célula normal, y la heterogeneidad es el resultado de factores intrínsecos y extrínsecos. Según la segunda hipótesis, el modelo de jerarquía (Fig. 10B), las células son intrínsecamente diferentes en términos de etapa de diferenciación y solo un pequeño subconjunto, las CSC, pueden iniciar el crecimiento y la progresión del tumor [Cheray *et al.*, 2017; Catalano *et al.*, 2011].

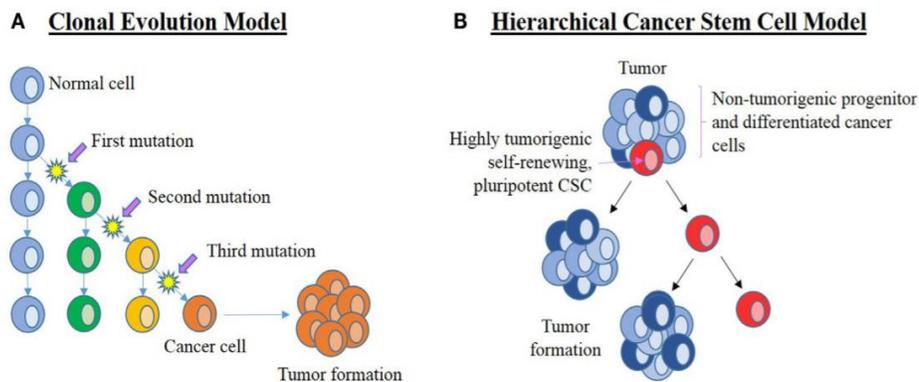


Figura 10. Teorías propuestas de carcinogénesis. (A) El modelo de evolución clonal (estocástico) dónde una célula sana sufre mutaciones que dan lugar a una célula cancerosa a partir de la cual

se forma el tumor. (B) El modelo jerárquico de las CSC, donde se propone que el origen del tumor se da a partir de células con fenotipo CSC por división asimétrica [Tomado de Bradshaw *et al.*, 2016].

Se cree que las CSC en glioma se originan a partir de células troncales neuronales o se diferencian de las células cerebrales normales, como los astrocitos y los oligodendrocitos [Schneider *et al.*, 2016; Bradshaw *et al.*, 2016].

Existen diversos marcadores moleculares que permiten la identificación de esta subpoblación tumoral. Estos marcadores pueden variar dependiendo del tipo de cáncer del que se trate. Se ha identificado que los marcadores que comparten todas las células troncales de glioma son CD133, CD15, A2B5 y CD44 [Stieber *et al.*, 2014; Bradshaw *et al.*, 2016], aunque también se han identificado otros como nestin, NANOG, SALL4, STAT3, SOX2, c-Myc, Olig2, Bmi1, L1CAM y KLF4 [Bradshaw *et al.*, 2016]. Aunque, debido al alto grado de heterogeneidad de este tipo de tumor se necesitan marcadores adicionales para identificar esta subpoblación tumoral.

Finalmente, los procesos invasivos son una característica propia de las CSC, por lo que es necesario estudiar el efecto de la ERY en estas células.

CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN

Debido a las características del glioblastoma, principalmente la capacidad invasiva, se requiere encontrar compuestos que bloqueen este proceso sin afectar a las células no tumorales y, a su vez, se puedan combinar con las terapias actuales para generar un mejor pronóstico a estos pacientes.

La eritrosa, al ser un compuesto natural proveniente del Ruibarbo presenta una menor toxicidad que los fármacos actuales, y debido a su peso molecular 120.04 g/mol que es menor al de la TMZ (194.15 g/mol) se cree que puede atravesar la BHE la cual permite el paso de moléculas menores a 400-600 Da de peso molecular. Además, se ha reportado que la eritrosa presenta propiedades anticancerígenas a bajas concentraciones (nM); y que entre las propiedades anticancerígenas se encuentra la disminución de algunas proteínas involucradas en los procesos de invasión y de EMT.

Por tanto, se espera que la eritrosa inhiba la capacidad invasiva de este tumor, así como la viabilidad y troncalidad del GBM sin dañar a las células sanas.

CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS

La inhibición de la NLK (HPI/AMF) por la eritrosa disminuirá la invasión de CSC de glioblastoma.

CAPÍTULO V. OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el efecto de la eritrosa sobre la invasión de células troncales de glioblastoma U373.

PARTICULARES

1. Enriquecer la fracción de células troncales de glioblastoma mediante estrés microambiental.
2. Determinar la IC50 de eritrosa en células troncales de glioblastoma.
3. Evaluar el perfil de troncalidad y transición epitelio/mesénquima de las células troncales de glioblastoma con y sin eritrosa.
4. Evaluar la capacidad de invasión en células troncales con y sin eritrosa.

CAPÍTULO VI. METODOLOGÍA

CULTIVO LÍNEA CELULAR (MONOCAPA)

Se cultivaron células de GBM humano U373 estadio IV, en medio DMEM (Dulbecco-MEM), adicionado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO; Rockville, USA), 10 000 unidades de penicilina/estreptomicina y 25 mM de glucosa. Se mantuvieron en incubadora a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de aire (normoxia), de 3-4 días hasta alcanzar una confluencia cercana a 80-90%.

PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DE CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS (CSC)

Una vez que el cultivo celular U373 alcanzó una confluencia $\geq 80\%$ se cambió el medio por DMEM 2.5 mM de glucosa más Temozolomida 500nM a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de aire (normoxia), durante 12 hrs. Posteriormente se cambió el medio por DMEM 25 mM más Etopósido 500nM en hipoxia (0.1% de oxígeno), durante 12 hrs. Para mantener el fenotipo troncal, se cambió el medio por DMEM sin suero 25mM de glucosa a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de aire (normoxia), durante 24 h adicionales [modificado de Gallardo-Pérez *et al.*, 2017]. Las células resultantes fueron denominadas U373 CSC (población troncal).

WESTERN BLOT

Se realizó el extracto de proteínas totales de células U373 parentales y troncales en RIPA, PMSF y 1 tableta de cóctel completo de inhibidores de proteasas, después se disgregaron mecánicamente con una jeringa de insulina y se centrifugaron a 10 000 rpm, a 4°C durante 30 min. El sobrenadante (proteína) se cuantificó por el método de Biuret.

Se añadieron 40 µg de la proteína con buffer de carga en geles SDS-PAGE, poliacrilamida al 12%. Después se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF a 300mA, 15 volts, durante 15 min. La membrana se bloqueó con 5% de leche libre de grasa y disuelta en TBS Tween 1X durante 1 hora. Posteriormente se incubaron las membranas toda la noche a 4°C con anticuerpos monoclonales CD133, CD44, Oct 3/4, E-cadherina, vimentina, NOTCH, Wnt/β-catenina, MMP-1, MMP-9, HPI (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA), dilución 1:1000. Al día siguiente se hicieron 4 lavados con TBS Tween 1X cada 15 min, y posteriormente se incubaron los respectivos anticuerpos secundarios, dilución 1:2000, durante una hora a temperatura ambiente en agitación suave.

Para detectar las bandas se reveló con quimioluminiscencia empleando el sistema de detección ECL-Plus (AmershamBioscience; Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Las bandas obtenidas se analizaron por densitometría y fueron comparadas con el control de carga (α-tubulina) [Gallardo-Pérez *et al.*, 2017].

INMUNOPRECIPITACIÓN

Para evaluar si la NLK (HPI/AMF) está fosforilada se realizó un ensayo de Inmunoprecipitación. Se evaluó la interacción HPI/P-ser y HPI/P-thr inmunoprecipitando ambas proteínas con anti P-ser y P-thr [Moreno-Sánchez *et al.*, 2020].

ENSAYO DE INVASIÓN EN CÁMARAS DE BOYDEN

El ensayo de invasión se llevó a cabo en cámaras de Boyden de 96 pozos (QCMTM Cell Invasion Assay); hidratando la membrana de la cámara de 1-2 hrs con medio DMEM sin suero y con 25 mM de glucosa. Posteriormente se agregó medio sin suero en la placa inferior, y en la placa superior se añadieron 50 000

células U373 por pozo (tanto de la línea parental como las células troncales) con medio DMEM sin suero 25 mM de glucosa durante 24 hrs a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de aire. Pasadas las 24 hrs se lavó la membrana de la cámara con PBS y en la placa inferior se añadió 'solución de desprendimiento celular' (Tispisna), incubando por 30 min a 37°C las células que migraron a la parte inferior de la membrana. Después se añadió 'buffer de lisis' a las células durante 15 min a 37°C. Para finalizar se leyó la fluorescencia a 480/520 nm.

DETERMINACIÓN IC₅₀ DE VIABILIDAD

Se cultivaron células U373 control y U373 CSC (2×10^4) en placas de 96 pozos a 37°C en condiciones de normoxia. Después de 24 hrs se añadió eritrosa a distintas concentraciones (0.1, 0.5, 1, 10 and 100 μ M, 1 and 10 mM) durante 24 hrs. El efecto de la eritrosa sobre la viabilidad de las células se determinó mediante el ensayo MTT (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) Plumb [2004]. La eritrosa se disolvió en agua.

DETECCIÓN DE NLK EN EL MEDIO EXTRACELULAR

La detección de la hexosa fosfato isomerasa se realizó en medio DMEM sin células (sobrenadante), tomado a las 24 hrs de cultivos celulares U373. El medio libre de células se incubó con ácido tricloroacético (TCA) al 10% a 4°C durante la noche [Gallardo-Pérez et al., 2017]. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 10 000 rpm durante 30 min. El pellet se resuspendió en buffer de carga y se cargó en geles SDS-PAGE al 12.5%. Una vez obtenido el gel se transfirió mediante electroforesis a una membrana de PVDF (BioRad; Hercules, CA, EE. UU.). Posteriormente se incubó la membrana toda la noche a 4°C con el anticuerpo HPI/AMF dilución 1:500 (Santa Cruz, CA EE. UU.). Las bandas de hibridación se revelaron con el anticuerpo secundario de ratón conjugado con peroxidasa de

rábano (Santa Cruz Biotechnology). La señal se detectó mediante quimioluminiscencia como se describió anteriormente y se utilizó albúmina como control de carga.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos se realizaron con al menos 3 preparaciones de células independientes (n). La detección de diferencias entre los diferentes grupos experimentales se realizó utilizando los métodos estadísticos de ANOVA/post hoc Scheffle con un grado de significancia de $P < 0.05$.

CAPÍTULO VII. RESULTADOS

MARCADORES DE TRONCALIDAD EN CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA SELECCIONADAS

Al exponer a las células U373 a condiciones de estrés microambiental (baja concentración de glucosa, hipoxia y exposición a fármacos) se obtuvo una población de enriquecida en marcadores de troncalidad. Por esta razón se decidieron nombrar U373 CSC.

Después de obtener las células U373 CSC, se observó que no hubo un cambio morfológico aparente comparado con el control (Fig. 11), y el porcentaje de recuperación de estas células sometidas al protocolo fue alto (<80%). Una vez obtenida esta población se midió mediante Western Blot marcadores de troncalidad, dichos marcadores han sido reportados para CSC de GBM (CD133 y CD44) así como algunas proteínas involucradas en mecanismos de metástasis e invasión como son MMP-1, MMP-9 y vimentina.

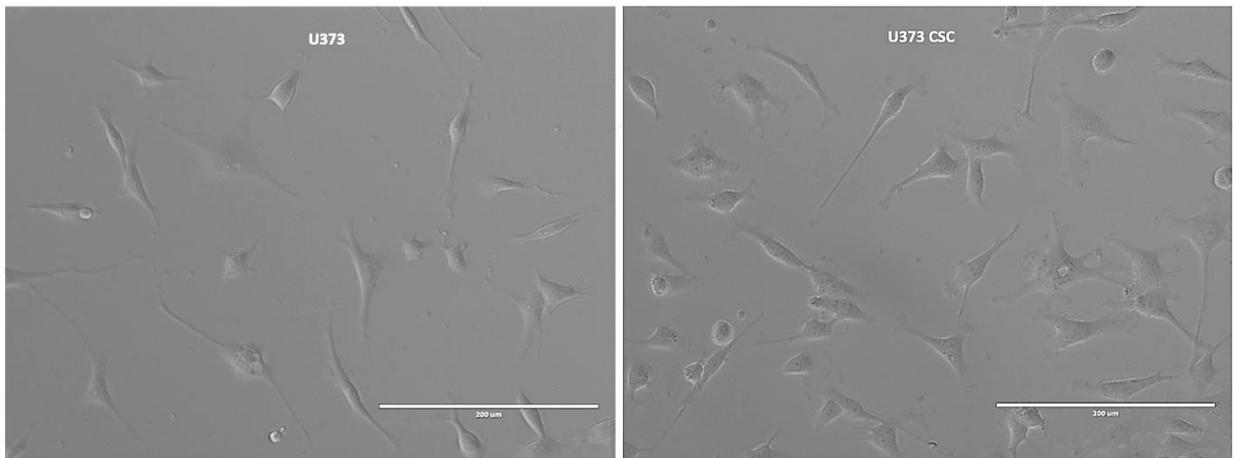


Figura 11. Morfología de la línea celular U373 control y U373 CSC después del protocolo de selección. No se observa ningún cambio aparente en la morfología entre ambas poblaciones celulares. Escala 200 μm .

Se determinó que CD133 se incrementó más de nueve veces en las CSC; mientras que CD44 no se expresó en ninguna de las dos poblaciones, esto debido a que el anticuerpo que se empleó reconoce CD44 en líneas celulares de cáncer

de mama. En cuanto a Oct3/4 incrementó ocho veces más y NOTCH tres veces más en la población U373 CSC. El factor transcripcional de MMPs, Wnt/ β -catenina se incrementó cuatro veces. La expresión de MMP-1 fue elevada en ambas poblaciones sin embargo no hay una diferencia significativa entre ellas; MMP-9 se incrementó más de diez veces en las U373 CSC en comparación con las células U373 control y vimentina se incrementó tres veces en las células U373 CSC en comparación con las U373 control (Fig. 12). Estos resultados indican que la población U373 CSC presenta un fenotipo maligno mayor a comparación con la población control.

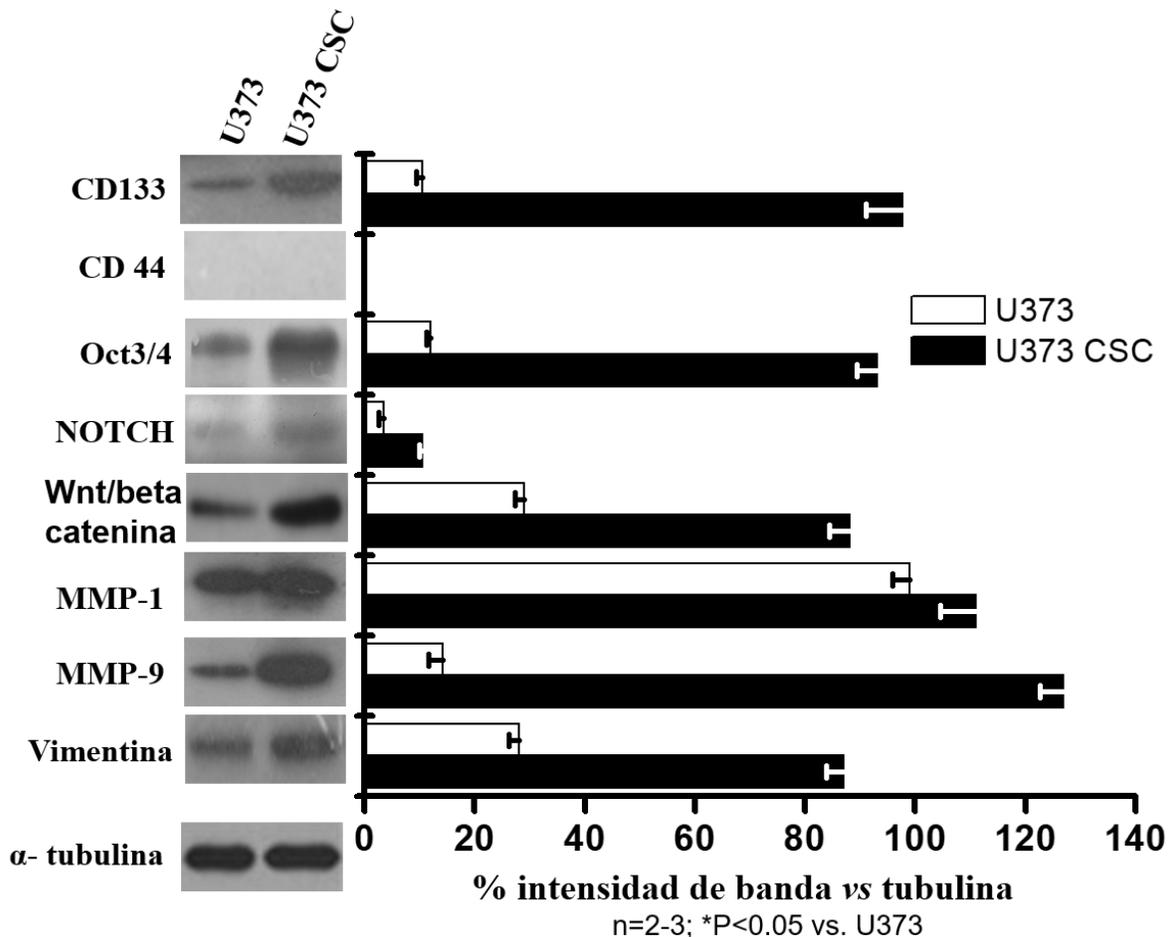


Figura 12. Marcadores de CSC e invasión en células de selección y U373. n=3; *P<0.05 vs. U373.

EXPRESIÓN DE NLK (HPI)

Con la intención de saber si la NLK (HPI/AMF) está activa, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de proteína total (Fig. 13) por el cual se observa que la NLK (HPI) está altamente expresada en ambas poblaciones celulares; y que ésta se encuentra fosforilada en residuos de treonina. Esta fosforilación está incrementada 7 veces en la población U373 CSC en comparación con la parental. En cuanto a fosforilación en residuos de serina no se observa una expresión clara ni diferencias significativas.

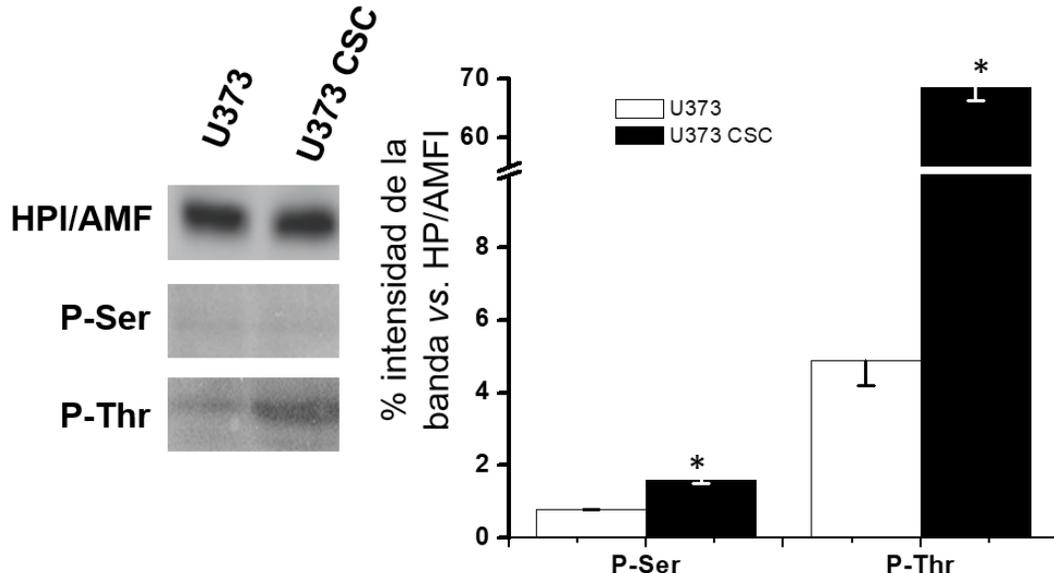


Figura 13. Fosforilación de NLK (HPI/AMF) observada en la fracción total. Se observa que hay una mayor fosforilación en residuos de treonina en la población CSC. n=3; *P<0.05.

Además, para conocer si la NLK (HPI/AMF) se está expulsando al medio extracelular se evaluó la presencia de la NLK en el sobrenadante (espacio extracelular) de las células control U373 y U373 CSC, obteniendo que la NLK se secreta al medio extracelular 14 veces más en la línea CSC. Así mismo se observa que el patrón de fosforilación difiere a la NLK intracelular, ya que se fosforila en residuos tanto de serina como de treonina, con una tendencia a fosforilarse más en residuos de treonina (Fig. 14).

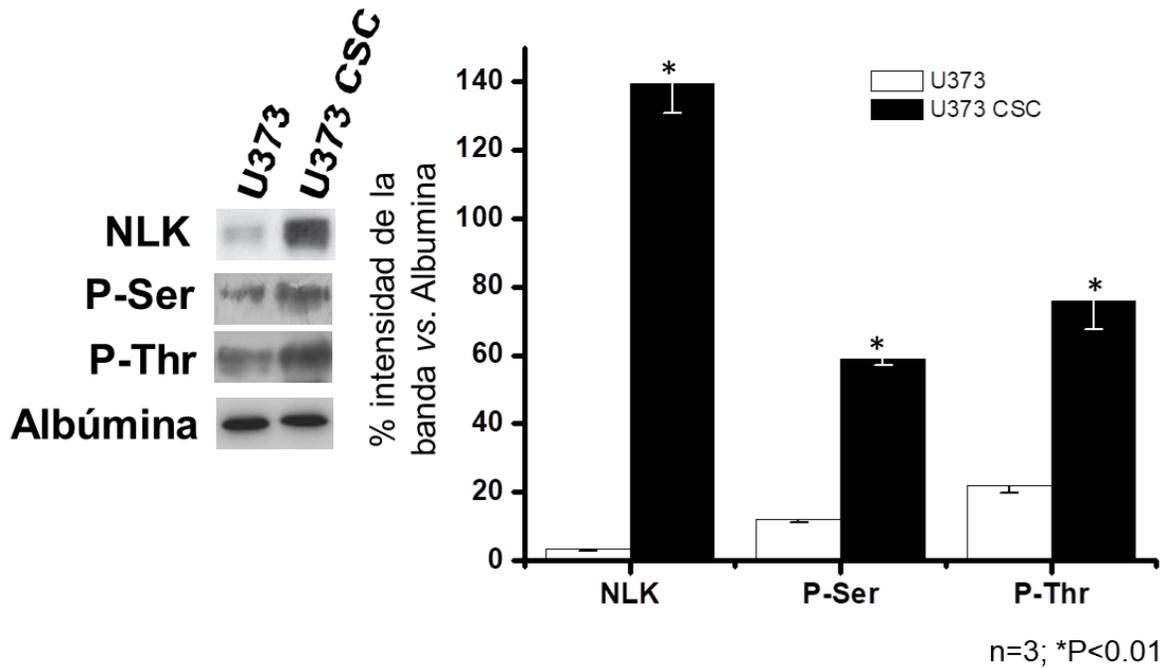


Figura 14. Expulsión de NLK al medio extracelular y patrón de fosforilación. n=3; *P<0.01.

Estos resultados indican que la elevada fosforilación de la NLK (mayormente en residuos de treonina) está relacionado a su vez con la alta expulsión de ésta al medio extracelular en la población CSC, lo que podría indicar que ésta población es más invasiva que la parental.

ENSAYO DE INVASIÓN

Se evaluó la capacidad invasiva de la línea celular U373 en cámaras de Boyden y se observó que tanto las células controles como las CSC tienen una alta capacidad invasiva (de 2 a 4 veces mayor que la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231)*, siendo hasta 4 veces mayor en las CSC (Fig. 15).

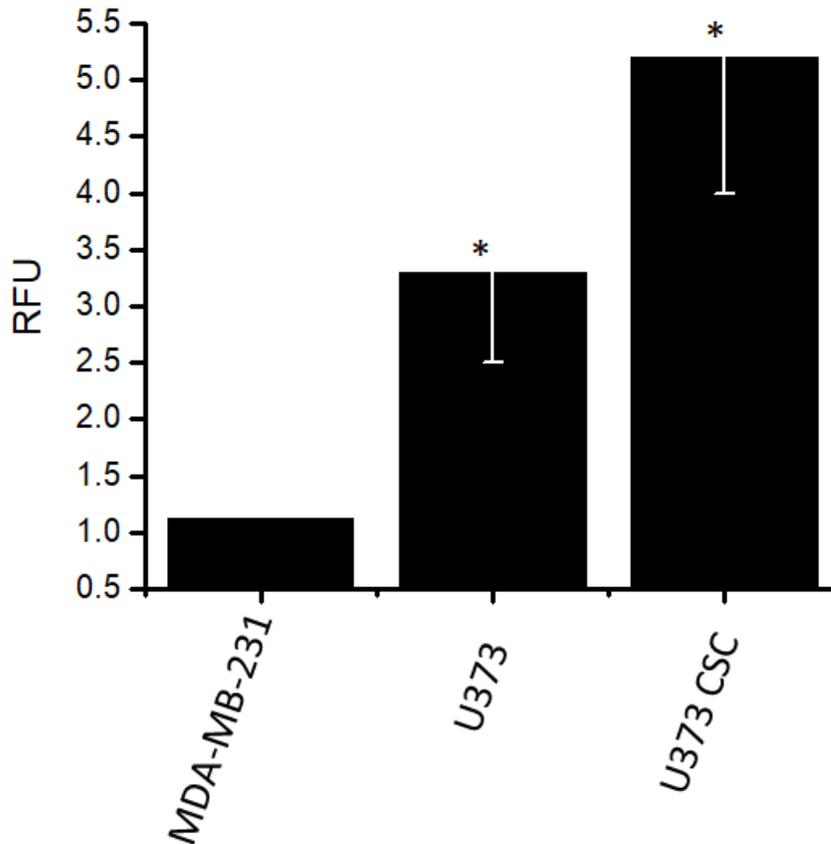


Figura 15. Capacidad invasiva adquirida de las CSC después del protocolo de selección. Se observa que tanto la población control, así como las CSC presentan un fenotipo altamente invasivo. n=3; *P<0.05 vs. MDA-MB-231. RFU= unidad de fluorescencia relativa. * Se comparó con la línea celular MDA-MD-231 pues esta era la línea celular más invasiva con la que se contaba en el laboratorio anteriormente.

IC50 DE VIABILIDAD DE ERITROSA EN U373 CSC

En el presente estudio se evaluó el efecto de la ERY (inhibidor de HPI/AMF), la cual es un compuesto derivado del Ruibarbo y es más permeable que la eritrosa-4-fosfato. La IC50 de la ERY sobre la viabilidad celular, se obtuvo en el rango de 350 nM para la población U373 CSC (Fig. 16), mientras que para la población control se obtuvo una IC50 del rango de 8 μ M (Fig. 16).

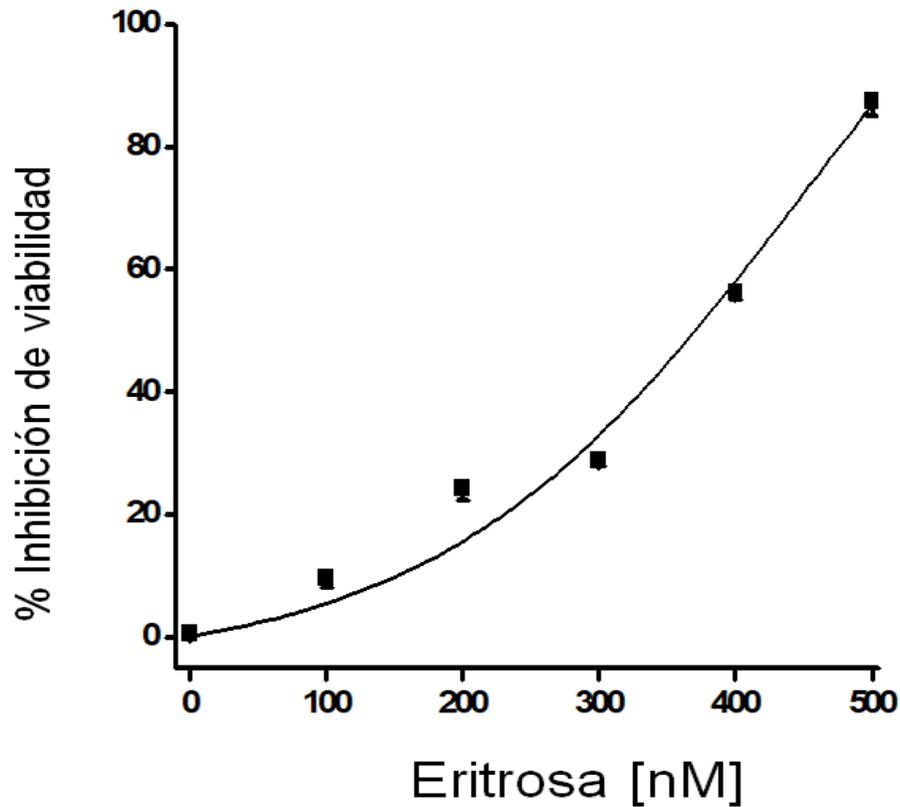


Figura 16. IC50 de viabilidad de eritrosa (ERY) en población U373 CSC. Se evaluaron diferentes dosis de ERY sobre la viabilidad de las células U373, obteniendo que la IC50 para las CSC es de 350 nM a las 24 h. n=3; IC50= 345±7.

Debido a los resultados anteriores, se empleó la ERY a una concentración de 350 nM para evaluar su efecto sobre la expresión de los marcadores antes mencionados. En estos ensayos se observó que la adición de ERY 350 nM al medio de cultivo en la población U373 CSC (durante 24 hrs) indujo una disminución significativa en los niveles de las proteínas evaluadas. Se observa una disminución del 90% para CD133, de 5% para Oct 3/4 y del 50% para NOTCH. Mientras que para los marcadores de EMT se observó una disminución del 97% para Wnt-β-catenina y vimentina, y una disminución del 55% para la MMP-1 y MMP-9 (Fig. 17). Estos resultados sugieren que la eritrosa es capaz de disminuir la expresión de proteínas y marcadores tumorales importantes para la invasión celular.

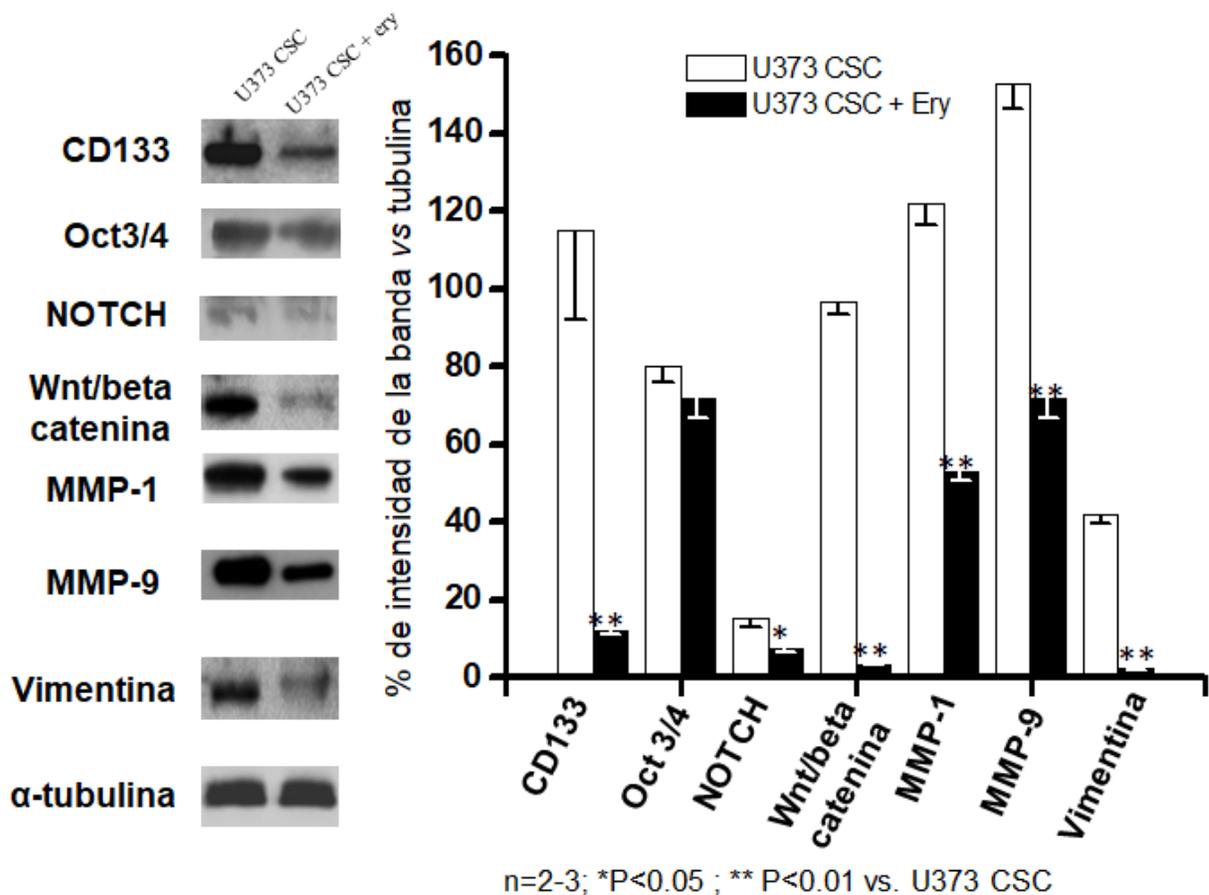


Figura 17. Marcadores de CSC e invasión en U373 CSC al ser expuestas durante 24 hrs a la IC50 de eritrosa (ERY) 350 nM. n=2-3; *P<0.05; **P<0.01 vs. U373 CSC.

EVALUACIÓN DE NLK EN EL MEDIO EXTRACELULAR AL AÑADIR IC50 DE ERITROSA

La ERY no sólo redujo la expresión de las proteínas evaluadas, sino que también disminuyó la secreción de la NLK al espacio extracelular de las CSC. Al añadir la IC50 de ERY 350 nM durante 24 hrs a la población CSC, se observó que hubo una disminución del 80-90% en la expulsión de la NLK, así como una disminución del 90% en la fosforilación de la NLK en residuos de treonina y del 70% en residuos de serina (Fig. 18).

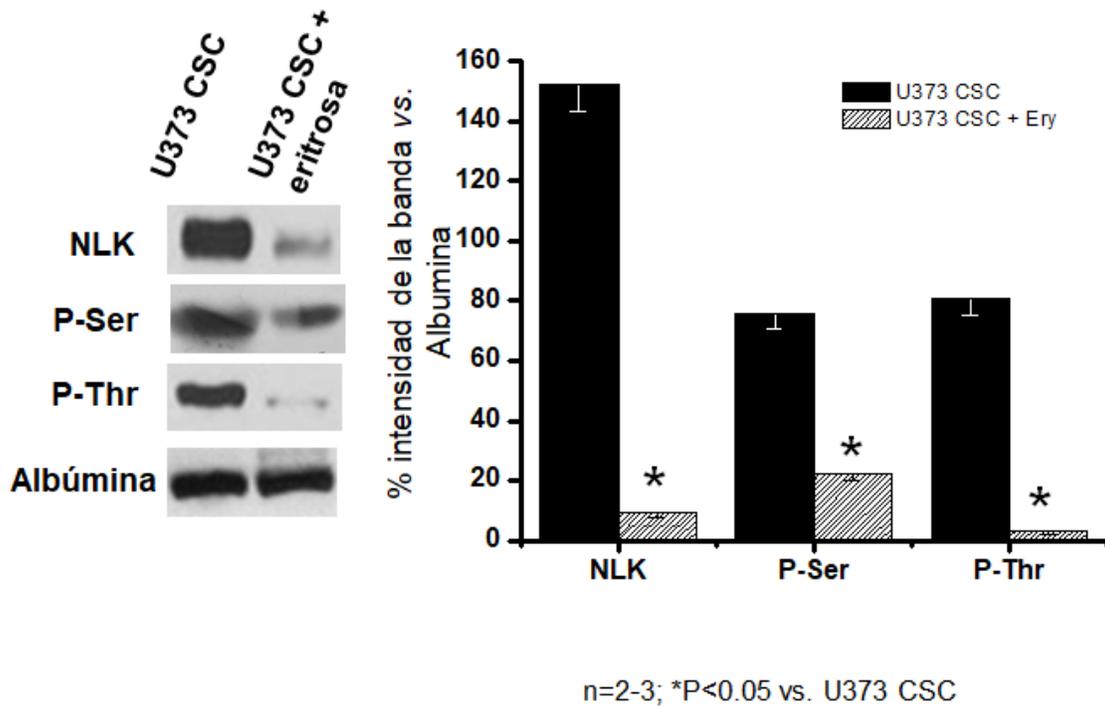


Figura 18. Secreción de NLK al medio extracelular al añadir la IC50 de eritrosa (ERY) 350 nM. n=2-3; *P<0.05.

ENSAYO DE INVASIÓN AL AÑADIR IC50 DE ERITROSA

Una vez evaluado el efecto de la IC50 de ERY sobre la expresión de proteínas y la expulsión de la NLK al espacio extracelular, se evaluó también el efecto de la ERY sobre invasión de las U373 CSC. De estos experimentos se observó que la ERY (350 nM, durante 24 horas) reduce la invasión en un 80% (Fig. 19).

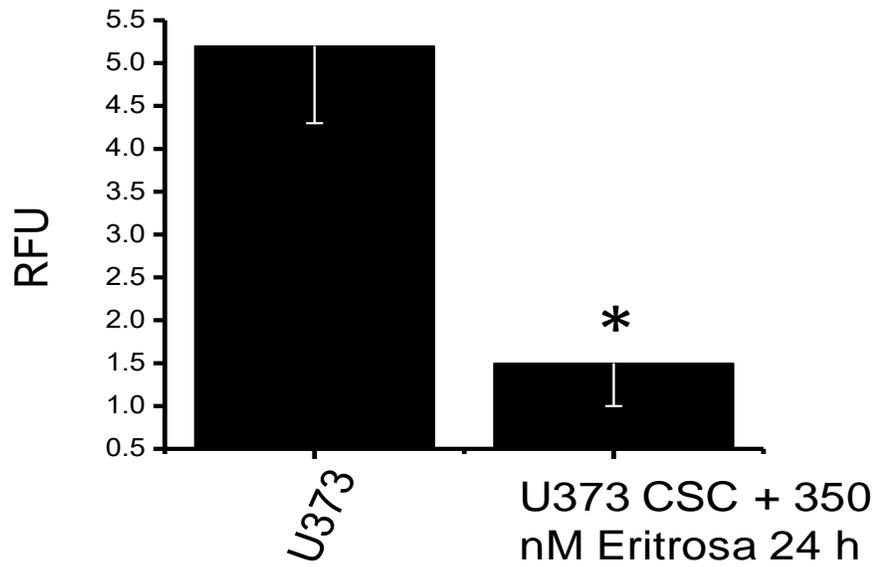


Figura 19. Capacidad invasiva de las CSC después del protocolo de selección, añadiendo la IC50 de eritrosa (ERY) 350 nM durante 24 hrs. Se observa que la ERY provoca una disminución de la invasión del 80%. n=3; *P<0.05 vs. MDA-MB-231. RFU= unidad de fluorescencia relativa.

CAPÍTULO VIII. DISCUSIÓN

A pesar de que el GBM es un cáncer de baja incidencia, es un tumor maligno altamente letal en la población, y aunque existen tratamientos en la clínica para combatir este tumor, la prognosis se mantiene baja ya que sólo cerca del 10% de los pacientes adultos alcanzan una supervivencia de 5 años [Oike *et al.*, 2013], mientras que en niños sólo se alcanza en menos del 20% de los casos [Das *et al.*, 2012]. Esto se debe entre otros factores a que este es un tumor altamente invasivo, a que presenta una alta proporción de CSC y a que los tratamientos actuales no están dirigidos contra estas características.

El principal fármaco con el que se trata este tumor es la TMZ, el cual metila el DNA, lo que provoca la muerte de las células por apoptosis [Zhang *et al.*, 2012]. Sin embargo, como se mencionó anteriormente no se ha mejorado la prognosis de los pacientes y además de los efectos graves de este fármaco, como las hipermutaciones [Choi *et al.*, 2018], no está dirigido específicamente contra las células tumorales, por lo que también daña a las células sanas.

Debido a estas razones se han empleado compuestos de origen natural como la ERY, la cual ha mostrado tener un potencial anticancerígeno debido a los resultados favorables que se ha tenido en otros estudios como la disminución de la migración, invasión, expresión de marcadores tumorales y algunas proteínas de EMT en un modelo de cáncer de mama y, la disminución del crecimiento de las células cancerosas y un aumento de la apoptosis sin efectos tóxicos en un modelo de cáncer de colon [Gallardo-Pérez, *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2015]. Adicionalmente se reportó que en fibroblastos de ratón 3T3 y células endoteliales humanas HUVEC la eritrosa-4-fosfato a concentraciones en el rango nanomolar no afectaron la viabilidad celular, lo que apunta a que este metabolito no presenta ningún daño aparente sobre células no tumorales [Gallardo-Pérez, *et al.*, 2017].

CSC EN CÁNCER CEREBRALES

El GBM se caracteriza por ser un tumor altamente heterogéneo, lo cual complica su tratamiento. Al igual que en otros tipos de cáncer, se ha propuesto que la progresión tumoral depende de las células madre cancerosas (CSC), responsables de la progresión, recurrencia del tumor, la resistencia a la terapia, etc [Dirkse *et al.*, 2019]. De igual forma se ha reportado que este tumor presenta una alta proporción de CSC (debido a la expresión del marcador CD133 en un 12.5% de la masa tumoral total, el cuál es el principal marcador de troncalidad para este tumor) [Dirkse *et al.*, 2019] en comparación con lo reportado para otros tumores [Gallardo-Pérez, *et al.*, 2017], e incluso se ha reportado que alrededor del 5.01-15.13% de las células de glioma dentro de la materia blanca donde se sabe que invaden las células de glioma son CD133+ [Wang *et al.*, 2019], lo que puede correlacionarse con algunas de las principales características como son la agresividad y la elevada capacidad invasiva de este tumor [Stupp *et al.*, 2005, Hoelzinger *et al.*, 2007]. Por lo que es necesario encontrar mejores alternativas terapéuticas que puedan dirigirse a esta población celular para un mejor tratamiento de la enfermedad.

Los resultados obtenidos muestran que las células U373 CSC sometidas al protocolo de estrés (baja concentración de glucosa, hipoxia y exposición a fármacos) no mostraron un cambio en la morfología, contrario al caso de las células BCSC (breast cancer stem cells) obtenidas a partir de la línea celular MCF7 que mostraron una morfología fibroblastoide agrandada, completamente distinta a la población parental MCF7 [Gallardo-Pérez, *et al.*, 2017]. Esto podría deberse a que a diferencia de las BCSC, las células U373 CSC presentan una proporción mayor en el tumor (0.01 a 2.5% BSCS vs.12.5% U373CSC) [Dirkse *et al.*, 2019], y a su vez a que las U373 CSC presentan una mayor capacidad invasiva como se discute más adelante. Es decir, las CSC de GBM presentan un perfil muy agresivo, debido a diferentes características intrínsecas propias del cáncer de la glía.

En la célula, NOTCH es una vía conservada evolutivamente que regula procesos biológicos, como la proliferación celular, apoptosis, migración, autorrenovación y diferenciación [Bazzoni y Bentivegna, 2019]. Se sabe que la activación de esta vía en las células madre neurales por parte de las células endoteliales del nicho tumoral está involucrada en la propagación de esta población de CSC [Gürsel *et.al.*, 2012; Zhu *et.al.*, 2011]. Esto relaciona con los resultados obtenidos, ya que como se esperaba la expresión de NOTCH se expresa mayormente en la población de CSC U373 (el doble) comparado con la población parental.

Así mismo, se ha reportado una expresión elevada de Oct 3/4 en CSC de varios tumores (incluidos los gliomas), lo cual se ha relacionado con la progresión del tumor y la mortalidad. Se cree que la expresión aberrante de Oct 3/4 podría contribuir a la génesis de CSC y a la progresión de este tumor [Kobayashi *et.al.*, 2012]. En los resultados obtenidos Oct 3/4 se sobreexpresa ocho veces más en la población U373 CSC a comparación de la población parental, lo que indica que la elevada expresión de este marcador se relaciona con la elevada malignidad del GBM.

METALOPROTEASAS Y GLIOBLASTOMA

La sobreexpresión de MMPs se puede relacionar con la alta capacidad de invasión que pueden mostrar las células tumorales, ya que como se mencionó anteriormente se requiere de enzimas proteolíticas para poder degradar la MEC que rodea al tumor [Weinmann y Ottow, 2007].

En este trabajo se observó que tanto la población control así como la población de CSC de la línea celular U373 expresan elevadamente la MMP-1, y que la población CSC sobreexpresa la MMP-9 cerca de 10 veces, esto correlaciona con lo descrito en la literatura para este tipo de tumor, ya que se ha descrito que se han encontrado niveles elevados de MMPs en líneas celulares de

GBM, así como en biopsias en comparación con el astrocitoma de bajo grado (LGA) y muestras de cerebro normal [Hagemann *et al.*, 2012].

Al añadir ERY a bajas concentraciones (350 nM) en la población U373 CSC, se disminuyó importantemente la expresión de la MMP-9 y MMP-1 (cerca del 50%), y esto a su vez correlacionó con la disminución del 80% que se observó en la capacidad invasiva. De manera similar, Lakka *et al.*, 2004 mencionan que en su estudio la inhibición de la MMP-9 mediada por RNAi (RNA de interferencia), logró bloquear significativamente la migración de las células de la línea celular de glioma SNB19; esto sugiere que, la regulación de la actividad de la MMP-9 podría ser de importancia clínica, pues se permitiría regular así la progresión tumoral. Por otra parte, para la MMP-1 se ha reportado un incremento en su expresión en muestras provenientes de gliomas a comparación de LGA (astrocitoma de bajo grado) y de cerebro normal [Hagemann *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2005]. Esto correlaciona con los resultados obtenidos, ya que a pesar de que no hubo diferencia significativa en la expresión de MMP-1 entre la población parental y CSC U373 ambas están altamente expresadas, con una tendencia a expresarse más en la población CSC U373.

Así mismo se ha reportado en un modelo de líneas celulares Y79 y Weri-1 de retinoblastoma que al inhibir las MMP-2 y MMP-9 se disminuyó significativamente la migración y viabilidad de estas células [Webb *et al.*, 2017].

Se sabe que algunas MMP funcionan intracelularmente en diversos tipos de células [Bassiouni *et al.*, 2021]. En tumores se ha reportado que la MMP-1 se acumula intracelularmente durante la fase mitótica del ciclo celular y se localiza en la membrana mitocondrial y el núcleo [Bassiouni *et al.*, 2021]; esta MMP-1 confiere resistencia a la apoptosis al prevenir la degradación de la lámina A/C e inhibir la activación de la caspasa y la fragmentación del ADN, asociándola así con el crecimiento tumoral y la quimiorresistencia [Limb *et al.*, 2005], mientras que para la MMP-9 se ha descrito que es activada por la MMP-26 intracelularmente, y así se libera la MMP-9 para degradar la MEC e inducir la invasión [Zhao *et al.*, 2003]. Así mismo se ha reportado que la inhibición de las MMPs en la célula provoca

cambios en el desarrollo y regulación de la respuesta inflamatoria [Manicone *et al.*, 2008], pronósticos mejores en enfermedades cardiacas, lesiones y trasplantes renales [Cohen *et al.*, 2020; Mosel *et al.*, 2016; Bassiouni *et al.*, 2021], etc.

Es decir, estos antecedentes indican que la inhibición y/o disminución en la expresión de estas MMPs puede perseguirse como un blanco terapéutico para el GBM. Sin embargo, se debe realizar más estudios para evaluar si la inhibición o disminución de estas MMPs podría tener otros efectos en la célula.

EFFECTOS DE LA ERITROSA SOBRE LA INVASIÓN

Actualmente, los gliomas representan un reto clínico debido a algunas características, como el difícil acceso quirúrgico al tumor, y las complicaciones que una cirugía en el cerebro representa, además de los elevados niveles de recurrencia del tumor. Como mencionan Demuth y Berens, 2004 una de las características más importantes de los gliomas malignos es su comportamiento invasivo, y actualmente no se ha logrado establecer un tratamiento efectivo que ataque esta característica. En este trabajo se observó que la línea celular U373 es altamente invasiva, ya que tanto la población parental como la población CSC invaden de 2 a 4 veces más que la línea celular MDA-MB-231 (la cuál se conoce por ser muy invasiva), siendo la población U373 CSC la que tiende a invadir más. Esto correlaciona con la elevada expresión de MMP-1 y sobre todo MMP-9 en esta población. Los elevados niveles de invasión de la población U373 CSC se vieron afectados al añadir ERY 350 nM durante 24 hrs, ya que se observó una disminución en la invasión del 80% a bajas concentraciones de ERY (350 nM).

Anteriormente se mencionó que las células de glioma pueden invadir a lo largo de las fibras de mielina, en tractos de materia blanca y subpial, perivascularmente (a lo largo de vasos sanguíneos) y perineuronalmente [Viapiano y Lawler, 2009]. Demuth y Berens, 2004, mencionan que las células de glioma presentan esos patrones de invasión debido a que prácticamente todas las

proteínas de la MEC nativas en el cerebro (fibronectina, laminina, colágeno, vitronectina y tenascina) se localizan en el espacio perivascular, e incluso hay reportes que indican que algunos componentes de la MEC tales como la fibronectina parecen estimular la migración de las células del glioma *in vitro* [Ohnishi, *et al.*, 1997]. Por otra parte, Wang *et al.*, 2019 reportaron que alrededor del 15% de las células encontradas durante el proceso invasivo en la materia blanca son CD133+ (es decir presentan un fenotipo troncal o CSC), lo que aunado a lo antes discutido, indica que el uso de la ERY podría inhibir este proceso; esto con base en los resultados de nuestro trabajo pues la aplicación de la ERY en la población U373 CSC disminuyó en un 80% el marcador de troncalidad CD133, en un 50% a NOTCH y en un 5% Oct 3/4, por lo que este compuesto es capaz de afectar los marcadores que favorecen el desarrollo y malignidad de las CSC.

No obstante, la disminución en Oct 3/4 fue escasa (5% sin diferencia significativa) por lo que se piensa que aunque hay reportes como el de [Kobayashi *et.al.*, 2012] donde se demostró que la sobreexpresión de Oct 3/4 indujo la invasión en células de glioma (obtenidas de tumores sólidos) y parece alterar los perfiles de expresión de ARNm de integrina y MMPs promoviendo la invasión y migración; la ERY parece no tener un efecto aparente en la expresión de Oct 3/4 lo cual con base en la literatura, podría relacionarse con la disminución sólo en un 50% de la MMP-1 y la MMP-9, es decir, se piensa que si Oct 3/4 se viera mayormente afectada por la ERY, a su vez se observaría una disminución mayor en la expresión de MMPs, por lo que sería necesario realizar más estudios en esta subpoblación celular para conocer con mayor claridad cuál es el mecanismo por el cual la ERY actúa.

EFFECTOS DE LA ERITROSA SOBRE LA NLK

Uno de los motivos por los cuales las MMPs se pueden sobreexpresar (permitiendo así un perfil invasivo mayor en glioma con respecto a otros tipos de cáncer) es la presencia de un factor de transcripción que se induce bajo la

activación de algunas vías de señalización (tales como la vía Wnt/ β -catenina o NF- κ B) que, a su vez, son activadas extracelularmente por la NLK (o HPI/AMF) al unirse a su receptor gp78.

El efecto de la ERY sobre la expresión de la NLK no queda claro ya que a pesar de que se sabe que puede impedir la unión de la HPI a su receptor, según los resultados obtenidos sobre la expulsión de la NLK al medio extracelular y los patrones de fosforilación observados, parece ser que la ERY también está afectando internamente a la célula debido a que los contenidos de diferentes proteínas se ven afectados. Por ende, se requiere de más estudios que puedan dilucidar si la ERY está entrando a la célula o no, y si estando dentro cómo es que afecta el patrón de expresión de algunas proteínas, ya sea directamente o por medio de la inhibición de la vía HPI/AMF. Sin embargo, se observa que al añadir la IC50 de ERY 350 nM en la población U373 CSC la expulsión de esta al sobrenadante disminuye en un 80-90%, y de la misma manera la fosforilación de este factor en residuos de treonina se ve disminuido en un 90% y en un 40% en residuos de serina. Estos resultados podrían indicar que internamente la vía está mediada por Wnt/ β -catenina que se ve disminuida en un 90% al añadir ERY.

En resumen, la ERY a concentraciones bajas (en el rango nM) mostró ser eficiente para disminuir una de las principales características de las células de glioma (y que provoca un pronóstico desfavorable para los pacientes), la invasión; debido a que probablemente al inhibir la unión de la HPI con su receptor se disminuyó la expresión de algunos componentes de la vía que impulsan este proceso, tales como Wnt/ β -catenina, vimentina, MMP-1 y MMP-9. Además, también disminuyó en un 80% la expresión del marcador de troncalidad CD133, lo cual podría indicar que estas células están revirtiendo su fenotipo troncal y muriendo al exponerse a ERY, esto podría comprobarse midiendo la expresión de marcadores de apoptosis. Sin embargo, no se descarta realizar más ensayos que permitan conocer si la eritrosa entra a la célula y tenga un efecto directo sobre factores de transcripción, así mismo probar este compuesto en modelos animales, así como dilucidar si la combinación de este compuesto natural con el principal

fármaco empleado hoy día (TMZ) puede generar sinergismo, y por ende potenciar los efectos que la TMZ produce en el glioma, así como probar este compuesto en líneas celulares cerebrales sanas como control negativo. Lo anterior podría proporcionar una alternativa al tratamiento que ha existido para estos pacientes durante años y que al día de hoy no ha logrado mejorar la supervivencia de estos.

CAPÍTULO IX. CONCLUSIONES

El glioblastoma se caracteriza entre otros aspectos por su alta capacidad invasiva y la presencia de células con fenotipo troncal. Esta combinación hace del glioblastoma un cáncer letal, por lo que se requiere de tratamientos que puedan ser efectivos combatiendo dichas características. Anteriormente se había propuesto el uso de compuestos naturales en la clínica, ya que estos presentan una toxicidad menor que los fármacos que actualmente se emplean. La eritrosa no solo es un compuesto de origen vegetal que se ha reportado que puede afectar procesos tales como la migración e invasión, así como la expresión de marcadores tumorales y algunas proteínas de EMT, sino que este ha presentado estos efectos a concentraciones bajas y no ha reportado un efecto adverso en células no tumorales. En el presente estudio se observó que la eritrosa a concentraciones nM (350 nM) puede disminuir significativamente el perfil invasivo de las células troncales de glioblastoma obtenidas a partir de la línea celular U373, característica que no ha podido ser atacada eficientemente en la clínica al día de hoy.

REFERENCIAS

- ABTA. Glioblastoma y astrocitoma maligno. 2018.
- ASCO. Efectos secundarios de la radioterapia.2018.
- Bradshaw A, Wickremsekera A, Tan S, Peng L, Davis P, y Itinteang T. Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme. *Frontiers in surgery*. 2016; 3, 21.
- Bassiouni W, Ali MAM, Schulz R. Multifunctional intracellular matrix metalloproteinases: implications in disease. *FEBS J*. 2021 Dec;288(24):7162-7182. doi: 10.1111/febs.15701. Epub 2021 Jan 22. PMID: 33405316.
- Bazzoni R, Bentivegna A. Role of Notch Signaling Pathway in Glioblastoma Pathogenesis. *Cancers (Basel)*. 2019; 11(3):292. doi: 10.3390/cancers11030292. PMID: 30832246; PMCID: PMC6468848.
- Catalano V, Gaggianesi M, Spina V, Iovino F, Dieli F, Stassi G, et al. Colorectal cancer stem cells and cell death. *Cancers*. 2011; 3(2):1929–46.
- Chen, K, Huang Y, Chen J. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2013;34: 732–740.
- Cheray M, Bégaud G, Deluche E, et al. Cancer Stem-Like Cells in Glioblastoma. In: De Vleeschouwer S, editor. *Glioblastoma*. Brisbane (AU): Codon Publications. 2017. Chapter 4.
- Choi S, Yu Y, Grimmer M, Wahl M, Chang S, Costello J. Temozolomide-associated hypermutation in gliomas. *NeuroOncology*. 2018;20(10), 1300-1309.
- Claes A, Idema A, Wesseling P. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathologica*. 2007; 443–458.
- Chiu C, St-Pierre P, Nabi I, Wiseman M. Autocrine motility factor receptor: a clinical review, *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2008; 8:2, 207-217, doi: 10.1586/14737140.8.2.207
- Cohen L, Sagi I, Bigelman E, Solomonov I, Aloschin A, Ben-Shoshan J, Rozenbaum Z, Keren G, Entin-Meer M. Cardiac remodeling secondary to chronic volume overload is attenuated by a novel MMP9/2 blocking antibody. *PLoS One*. 2020 Apr 9;15(4):e0231202. doi: 10.1371/journal.pone.0231202. Erratum in: *PLoS One*. 2020 Oct 22;15(10):e0241419. PMID: 32271823; PMCID: PMC7145114.

- Coronato S, Laguens G, Girolamo V. Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. *MEDICINA (Buenos Aires)*. 2012; 72: 495-502.
- Das K, Mehrotra A, Nair A, Kumar S, Srivastava A, Sahu R, et al. Pediatric glioblastoma: Clinico-radiological features and factors affecting the outcome. *Childs Nerv Syst*. 2012; 28(12):2055–62.
- Demuth T, Berens M. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol*. 2004;70(2):217-28. doi: 10.1007/s11060-004-2751-6. Dirkse A, Golebiewska A, Buder T, et al. Stem cell-associated heterogeneity in Glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment. *Nat Commun*. 2019;10(1):1787.
- Dunn G, Rinne M, Genovese G, Quayle S, Dunn I, Agarwalla P, . . . Hahn, W. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes Dev*. 2012;26(8):756-84. doi: 10.1101/gad.187922.112
- Fang S, Ferrone M, Yang C, Jensen P, Tiwari S, Weissman M. The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98(25), 14422–14427. doi.org/10.1073/pnas.251401598
- Fairbank M, St-Pierre P, Nabi R. The complex biology of autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase (AMF/PGI) and its receptor, the gp78/AMFR E3 ubiquitin ligase. *Molecular bioSystems*. 2009; 5(8), 793–801. https://doi.org/10.1039/b820820b
- French JJ, Midwinter MJ, Bennett MK, Manas DM, Charnley RM. A matrix metalloproteinase inhibitor to treat unresectable cholangiocarcinoma. *HPB (Oxford)*. 2005;7(4):289-91. doi: 10.1080/13651820510042246. PMID: 18333209; PMCID: PMC2043106.
- Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3, 362–374. https://doi.org/10.1038/nrc1075.
- Friedman GD, Udaltsova N, Chan J, Quesenberry CP Jr, Habel LA. Screening pharmaceuticals for possible carcinogenic effects: initial positive results for drugs not previously screened. *Cancer Causes Control*. 2009 Dec;20(10):1821-35. doi: 10.1007/s10552-009-9375-2.
- Gallardo-Pérez JC, Adán-Ladrón de Guevara A, Marín-Hernández A, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. HPI/AMF inhibition halts the development of the aggressive

phenotype of breast cancer stem cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017;1864(10):1679-1690.

Gao CC, Li GW, Wang TT, Gao L, Wang FF, Shang HW, Yang ZJ, Guo YX, Wang BY, Xu JD. Rhubarb extract relieves constipation by stimulating mucus production in the colon and altering the intestinal flora. *Biomed Pharmacother.* 2021 Jun; 138:111479. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111479. Epub 2021 Mar 25. PMID: 33774313.

Globocan. 2020. Obtenido de <https://gco.iarc.fr/today/home>

Gürsel B, Berry N, Boockvar J. The Contribution of Notch Signaling to Glioblastoma via Activation of Cancer Stem Cell Self-renewal. *Neurosurgery.* 2012; 70(2), N19–N21. doi: 10.1227/01.neu.0000410937.38828.6f

Hagemann C, Anacker J, Ernestus R, Vince G. A complete compilation of matrix metalloproteinase expression in human malignant gliomas. *World journal of clinical oncology.* 2012; 3(5), 67–79. <https://doi.org/10.5306/wjco.v3.i5.67>

Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144 (5): 646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi M, Simjee S. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pacific journal of cancer prevention.* 2017;18(1), 3–9. .

Hoelzinger D, Demuth T, Berens M. Autocrine Factors That Sustain Glioma Invasion and Paracrine Biology in the Brain Microenvironment, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute.* 2007; Volume 99, Issue 21, 1583–1593.

Jeffery C, Bahnson B, Chien W, Ringe D, Petsko G. Crystal Structure of Rabbit Phosphoglucose Isomerase, a Glycolytic Enzyme That Moonlights as Neuroleukin, Autocrine Motility Factor, and Differentiation Mediator†,‡. *Biochemistry.* 2000; 39(5), 955–964. doi:10.1021/bi991604m

Jintao X, Yongli S, Liming Y, Quanwei Y, Chunyan L, Xingyi C, Yun J. Near-infrared spectroscopy for rapid and simultaneous determination of five main active components in rhubarb of different geographical origins and processing. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2018 Dec 5; 205:419-427. doi: 10.1016/j.saa.2018.07.055. Epub 2018 Jul 18. PMID: 30048943.

Kobayashi K, Takahashi H, Inoue A, Harada H, Toshimori S, Kobayashi Y, Goto K, Sugimoto K, Yano H, Ohnishi T, Tanaka J. Oct-3/4 promotes migration and

invasion of glioblastoma cells. *J Cell Biochem.* 2012;113(2):508-17. doi: 10.1002/jcb.23374. PMID: 21938739.

Lakka S, Gondi C, Yanamandra N. *et al.* Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis. *Oncogene.* 2004;23, 4681–4689. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207616>.

Limb GA, Matter K, Murphy G, Cambrey AD, Bishop PN, Morris GE, Khaw PT. Matrix metalloproteinase-1 associates with intracellular organelles and confers resistance to lamin A/C degradation during apoptosis. *Am J Pathol.* 2005 May;166(5):1555-63. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62371-1. PMID: 15855654; PMCID: PMC1606407.

Liu L, Yi T, Zhao X. Antitumor effect of D-erythrose in an abdominal metastatic model of colon carcinoma. *Oncology Letters.* 2015;9(2), 769–773. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2764>.

Li Y, Wang Y, Kang S, Zhang JH, Guo W, Wang N, Jin X, Fang SM. Association of single nucleotide polymorphism in matrix metalloproteinases promoter with susceptibility to ovarian cancer. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2005;40(7):472-5.

Liu N, Yang C, Bai W, Wang Z, Wang X, Johnson M, Wang W, Zhang P, Yang H, Lui H, Cheng Y, Tu Y. CADM2 inhibits human glioma proliferation. *Oncology Reports.* 2019;41(4): 2273-2280. doi: 10.3892/or.2019.7010.

Louis D, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee W, et al, Ellison D. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors. *Acta Neuropathol.* 2016; 131(6):803-20. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1.

Maffuz-Aziz A, Labastida S, Sherwell S, Ruvalcaba E, Domínguez C, Tenorio J, Rodríguez S. Supervivencia de pacientes con cáncer de mama. Análisis por factores pronóstico, clínicos y patológicos. *Ginecol Obstet Mex.* 2016; 84(8):498-506.

Manicone AM, McGuire JK. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Semin Cell Dev Biol.* 2008 Feb;19(1):34-41. doi: 10.1016/j.semcdb.2007.07.003. Epub 2007 Jul 10. PMID: 17707664; PMCID: PMC2235912.

Mikhail D, Kornienko V, Pronin I. Brain Metastases. *Advanced Neuroimaging. Springer.* 2018.

Moreno-Sánchez R, Marín-Hernández Á, Gallardo-Pérez JC, et al. Physiological Role of Glutamate Dehydrogenase in Cancer Cells. *Front Oncol.* 2020; 10:429.

- Moser MA, Arcand S, Lin HB, Wojnarowicz C, Sawicka J, Banerjee T, Luo Y, Beck GR, Luke PP, Sawicki G. Protection of the Transplant Kidney from Preservation Injury by Inhibition of Matrix Metalloproteinases. *PLoS One*. 2016 Jun 21;11(6):e0157508. doi: 10.1371/journal.pone.0157508. PMID: 27327879; PMCID: PMC4915675.
- Niinaka, Y., Paku, S., Haga, A., Watanabe, H., & Raz, A. Expression and secretion of neuroleukin/phosphohexose isomerase/maturation factor as autocrine motility factor by tumor cells. *Cancer research*. 1998; 58(12), 2667–2674.
- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre P, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch N, Maiorka P, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil M, Lütolf U, Kleihues P. Genetic pathways to glioblastoma: a populationbased study. *Cancer Res*. 2004; 64(19):6892–9.
- Ohnishi T, Arita N, Hiraga S, Taki T, Izumoto S, Fukushima Y, Hayakawa T. Fibronectin-mediated cell migration promotes glioma cell invasion through chemokinetic activity. *Clin Exp Metastasis*. 1997;15(5):538-46. doi: 10.1023/a:1018422926361.
- Oike T, Susuki Y, Sugawara, K., Shirai, K., Noda, S., Tamaki, T., . . . Nakano, T. Radiotherapy plus concomitant adjuvant temozolomide for glioblastoma: Japanese monoinstitutional results. *PLoS One*. 2013; 8(11): e78943.
- OMS. Cáncer. Datos y cifras. 2018. Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Page-McCaw A, Ewald A, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8: 221-33. doi: 10.1038/nrm2125.
- Pascual J, González F, Prieto R, Cerdán S, Roda J. La barrera hematoencefálica: desarrollo de una estructura que permite la heterogeneidad funcional del sistema nervioso central. *REV NEUROL*. 2004; 38 (6): 565-581.
- Pardridge M. The blood-brain barrier. Permeability, substrate transport and drug and gene targeting. In Edvinsson L, Krause DN, eds. *Cerebral blood flow and metabolism*. 2 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2002; p. 119-39.
- Perkins S, Rubin J, Leonard J, Smyth M, El Naqa I, Michalski J, et al. Glioblastoma in children: A single-institution experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011;80(4):1117–21.
- Plumb JA. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Med*. 2004;88:165-169.
- Renkiewicz R, Qiu L, Lesch C, Sun X, Devalaraja R, Cody T, Kaldjian E, Welgus H, Baragi V. Broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor marimastat-induced

musculoskeletal side effects in rats. *Arthritis Rheum.* 2003 Jun;48(6):1742-9. doi: 10.1002/art.11030. PMID: 12794843.

Rimas L, Wainwright D, Ladomersky E, Sachdev S, Sonabend A, Stupp R. Newly Diagnosed Glioblastoma: A Review on Clinical Management. *Oncology (Williston Park).* 2019; 13; 33 (3): 91-100.

Rulseh A, Keller J, Klener J, Šroubek J, Dbalý V, Syrůček M, Tovaryš F, Vymaza J. Long-term survival of patients suffering from glioblastoma multiforme treated with tumor-treating fields. *World J SurgOnc.* 2012; **10**, 220. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-10-220>.

Sánchez-Herrera F, Castro E, Gordillo L, Vaca M, Santana B, Perezpeña M, et al. Glioblastoma multiforme in children: Experience at Hospital Infantil de Mexico Federico Gomez. *Childs Nerv Syst.* 2010; 25(5):551–7.

Schneider M, Ströbele S, Nonnenmacher L, Siegelin MD, Tepper M, Stroh S, et al. A paired comparison between glioblastoma “stem cells” and differentiated cells. *Int J Cancer.* 2016; 138(7):1709–18. doi:10.1002/ijc.29908.

Singh S, Hawkins C, Clarke I, Squire J, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004; 432(7015):396–401.

SMeO. Prevención y diagnóstico oportuno en cáncer. 2016. Obtenido de https://www.smeo.org.mx/descargables/COPREDOC_GUIA.pdf

Stewart B, Wild C. World Cancer Report 2014. IARC.

Stieber D, Golebiewska A, Evers L, Lenkiewicz E, Brons NH, Nicot N, et al. Glioblastomas are composed of genetically divergent clones with distinct tumourigenic potential and variable stem cell-associated phenotypes. *Acta Neuropathol.* 2014; 127(2):203–19. doi:10.1007/s00401-013-1196-4.

Stupp R, Manson W, van den Bent M, Weller M, Fisher B, Taphoorn M, Bogdahn, U. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;10;352(10):987-96. doi: 10.1056/NEJMoa043330.

Subramanian A, Harris A, Piggott K, Shieff C, Bradford R. Metastasis to and from the central nervous system - the 'relatively protected site'. *The Lancet Oncology.* 2002, 3, 498-507. doi.org/10.1016/S1470-2045(02)00819-7.

Tam W, Weinberg R. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med.* 2013; 19, 1438–1449. <https://doi.org/10.1038/nm.3336>

- Van Damme J, Struyf S, Opdenakker G. Chemokine protease interactions in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2004; 14: 201-8.
- Viapiano M, Lawler S. Glioma Invasion: Mechanisms and Therapeutic Challenges. En B. Teicher, *Cancer Drug Discovery.* 2009. Springer. 1220-1244.
- Vihinen P, Kähäri V. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer.* 2002; 99: 157-166.
- Wang J, Xu S, Duan J, Yi L, Guo Y, Shi Y, Li L, Yang Z, Liao X, Cai J, Zhang Y, Xiao H, Yin L, Wu H, Zhang J, Lv S, Yang Q, Yang X, Jiang T, Zhang X, Bian X, Yu S. Invasion of white matter tracts by glioma stem cells is regulated by a NOTCH1-SOX2 positive-feedback loop. *Nat Neurosci.* 2019;22(1):91-105. doi: 10.1038/s41593-018-0285-z.
- Watanabe H, Carmi P, Hogan V... Raz, T., Silletti, S. Nabi R, Raz, A. Purification of human tumor cell autocrine motility factor and molecular cloning of its receptor. *J Biol Chem.* 1991, 266. 13442-13448.
- Webb AH, Gao BT, Goldsmith ZK, Irvine AS, Saleh N, Lee RP, Lendermon JB, Bheemreddy R, Zhang Q, Brennan RC, Johnson D, Steinle JJ, Wilson MW, Morales-Tirado VM. Inhibition of MMP-2 and MMP-9 decreases cellular migration, and angiogenesis in in vitro models of retinoblastoma. *BMC Cancer.* 2017 Jun 20;17(1):434. doi: 10.1186/s12885-017-3418-y. PMID: 28633655; PMCID: PMC5477686.
- Weinmann H y Ottow E. Recent development in novel anticancer Therapies. *Comprehensive Medicinal Chemistry II.* 2007. Elsevier.
- Wesolowski J, Rajdev P, Mukherji S. Temozolomide (Temodar). *Pharmacology vignette.* 2010; 31:1383– 84.
- Yu Z, Pestell T, Lisanti M, Pestell R. Cancer Stem Cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012; 44(12): 2144–2151. doi: 10.1016/j.biocel.2012.08.022.
- Zhang J, Stevens M, Bradshaw T. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. *Current Molecular Pharmacology.* 2012, 5, 102-114.
- Zhao YG, Xiao AZ, Newcomer RG, Park HI, Kang T, Chung LW, Swanson MG, Zhou HE, Kurhanewicz J, Sang QX. Activation of pro-gelatinase B by endometase/matrilysin-2 promotes invasion of human prostate cancer cells. *J Biol Chem.* 2003 Apr 25;278(17):15056-64. doi: 10.1074/jbc.M210975200. Epub 2003 Feb 13. PMID: 12586837.