



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE
FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“Evaluación de combinaciones de inhibidores de las vías de
señalización PI3K/AKT y Sonic Hedgehog contra glioblastoma”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. Rosalinda Mejía Rodríguez

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
FISIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Director de la tesis:

Dr. José Segovia Vila

Agradecimientos

Mi más profundo agradecimiento al Dr. José Segovia Vila, por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo y por su apoyo a lo largo del doctorado.

Agradezco de manera especial a mis sinodales: Dra. María Eugenia Mendoza Garrido, Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas, Dra. Marta Catalina Romano Pardo, y Dr. Rolando Castañeda Arellano por sus valiosos comentarios, orientación y su apoyo.

A Araceli Navarrete Alonso y Paula Vergara Zubillaga, gracias por la capacitación en técnicas de laboratorio, sus consejos, su ayuda y todos los momentos agradables de convivencia que compartimos.

A Rubén Sánchez Islas agradezco su ayuda técnica y todos los momentos agradables de convivencia que compartimos.

A Guadalupe Espinoza Olivas, muchísimas gracias por su orientación y ayuda durante los trámites administrativos para la obtención de mi grado académico.

El presente trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), en el laboratorio 44 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV, bajo la dirección del Dr. José Segovia Vila. Numero de becario CONACYT 275144.

Dedicatoria

A mi mamá Rosalinda Rodríguez Pacheco por todo su amor, comprensión, confianza, apoyo y entusiasmo que me demuestra cada día.

A mi papá David Mejía Ramírez que en paz descanse, agradezco cada momento que viví a su lado y sé que estaría muy orgulloso de mí.

A mis hermanos Omar y Guillermo, por su sentido del humor, su alegría, sus consejos y por siempre estar ahí para mí.

A mis suegros Rosa Carmina Guzmán Salaiz y Félix Hernández Zepeda y a mis cuñados Félix Augusto Hernández Guzmán y Christopher Hernández Guzmán por toda su ayuda y cariño.

A Christian Hernández Guzmán, mi novio, mi prometido, el papá de mi Saúl, mi compañero de vida, el amor de mi vida y mí todo. Por tanto amor, por toda su ayuda, consejos, porque me hace fuerte y me inyecta energía, porque este logro también es de él.

A mi hermoso bebé Saúl Hernández Mejía, porque cambió mi vida, me motiva y porque todos los días me recuerda qué es la inocencia, la ternura y la felicidad.

Índice

| | |
|---|----|
| 1. Abreviaturas | 6 |
| 2. Resumen..... | 8 |
| 3. Abstract | 9 |
| 4. Introducción | 10 |
| 4.1 Tumores en el cerebro: Glioma..... | 10 |
| 4.2 Origen y desarrollo del GBM..... | 11 |
| 4.3 Terapia contra el GBM | 15 |
| 4.4. AZD5363 o Capivasertib (AstraZeneca)..... | 16 |
| 4.5 AZD8542 (AstraZeneca)..... | 17 |
| 4.6 Curcumina | 18 |
| 4.7 Resveratrol | 20 |
| 5. Planteamiento del problema | 22 |
| 6. Hipótesis..... | 22 |
| 7. Objetivos | 23 |
| 8. Materiales y métodos | 24 |
| 8.1 Cultivo celular..... | 24 |
| 8.2 Cultivo de glioma-esferas..... | 25 |
| 8.3 Ensayo de formación de colonias..... | 25 |
| 8.4 Agentes terapéuticos | 26 |
| 8.5 Ensayo de MTT | 26 |
| 8.6 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)..... | 27 |
| 8.7 Ensayo de proliferación..... | 27 |
| 8.8 Análisis de Western blot | 28 |
| 8.9 Análisis estadístico | 29 |
| 9. Resultados | 30 |
| 9.1 AZD5363, AZD8542, CCR y RV tienen efectos citotóxicos en células de GBM humano | 30 |
| 9.2 La administración combinada de AZD5363, AZD8542, CCR y RV es más efectiva que la monoterapia..... | 32 |
| 9.3 Los tratamientos combinados con AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RV inhiben la formación de colonias derivadas de células de GBM humano | 34 |
| 9.4 La administración de las combinaciones AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RV inhiben la proliferación de células de GBM humano y disminuyen la supervivencia de glioma-esferas | 36 |

| | |
|---|----|
| 9.5 La administración de las combinaciones AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RV inhiben las vías de supervivencia PI3K/AKT y SHH en células de GBM humano | 38 |
| 9.6 AZD5363+AZD8542+CCR y AZD8542+CCR+RV inducen muerte celular asociada a la activación de caspasa-3..... | 39 |
| 10. Discusión | 43 |
| 11. Bibliografía | 50 |

1. Abreviaturas

| | |
|-------------------------------|--|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AKT | Serina/Treonina cinasa, proteína cinasaa B |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| ATP | Adenosin Trifosfato |
| BAD | Proteína agonista de la muerte celular asociada a BCL2 |
| BCL2 | Proteína reguladora de muerte celular, Linfoma de células B2 |
| bFGF | Factor básico de crecimiento de fibroblastos |
| CSCs | Células madre cancerígenas |
| DMEM | Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EdU | 5-etinil-2-deoxi-uriduna |
| EGF | Factor de crecimiento epidérmico |
| FDA | Administración de Alimentos y Medicamentos |
| FKHR | Factor de transcripción, FOXO1 |
| GBM | Glioblastoma |
| GLI | Oncogen homólogo asociado a Glioma |
| GPCR | Receptor acoplado a proteína G |
| GRAS | Generalmente reconocida como segura |
| GSK3β | Glucógeno sintasa cinasa 3 beta |
| HER2 | Tirosina cinasa, erbB-2/neu |
| MGMT | O6 metilguanina ADN metiltransferasa |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |

| | |
|-------------|---|
| PDK1 | Cinasa dependiente de fosfoinositol 1 |
| PH | Homología a Pleckstrina |
| PI3K | Fosfatidilinositol-3-cinasa |
| PIP2 | Fosfatidilinositol 4,5 bisfosfatos |
| PIP3 | Fosfatidilinositol tri fosfato |
| PTCH | Patched |
| PTEN | Enzima homóloga de fosfatasa y tensina |
| RTK | Receptor tirosina cinasa |
| Ser | Serina |
| SHH | Sonic Hedgehog |
| SMO | Smoothened |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| Thr | Treonina |
| VEGF | Factor de crecimiento endotelial vascular |

2. Resumen

El glioblastoma (GBM) es un tumor muy agresivo que presenta vascularización, necrosis y es resistente a tratamientos de radioterapia y quimioterapia. La terapia tradicional no es efectiva para erradicar el GBM, por lo tanto existe una necesidad urgente de desarrollar novedosas estrategias terapéuticas contra el GBM. AZD5363, AZD8542, curcumina (CCR) y resveratrol (RV) son ampliamente estudiados para el tratamiento del cáncer y en el presente estudio, exploramos el efecto de la administración de tratamientos combinados con AZD5363, AZD8542, CCR o RV en células de GBM humano. Encontramos que el tratamiento combinado con AZD5363+AZD8542+CCR y AZD8542+CCR+RV inhiben las vías de supervivencia PI3K/AKT y SHH mediante la disminución de la actividad de AKT, la reducción de la expresión de SMO, p70S6k, S6k, GLI1, p21 y p27, así como la activación de caspasa 3, como marcador de apoptosis. Estos resultados demuestran que los tratamientos combinados AZD5363+AZD8542+CCR y AZD8542+CCR+RV tienen el potencial de ser una interesante alternativa para tratar el GBM.

3. Abstract

Glioblastoma (GBM) is a very aggressive tumor that presents vascularization, necrosis and is resistant to chemotherapy and radiotherapy. Current treatments are not effective in eradicating GBM. Thus, there is an urgent need to develop novel therapeutic strategies against GBM. AZD5363, AZD8542, curcumin (CCR) and resveratrol (RV), are widely studied for the treatment of cancer. In the present study we explored the effects of the administration of combined treatments with AZD5363, AZD8542, CCR or RV on human GBM cells. We found that the combined treatments with AZD5363+AZD8542+CCR and AZD8542+CCR+RV inhibit the PI3K/AKT and SHH survival pathways by decreasing the activity of AKT, the reduction of the expression of SMO, pP70S6k, pS6k, GLI1, p21 and p27, and the activation of caspase-3 as a marker of apoptosis. These results prove that the combined treatments AZD5363+AZD8542+CCR and AZD8542+CCR+RV can be an interesting option against GBM.

4. Introducción

4.1 Tumores en el cerebro: Glioma

El sistema nervioso central (SNC) es uno de los sistemas más complejos e importantes del organismo humano. Se conforma por el cerebro y la médula espinal, se encarga de recibir e integrar toda la información procedente del interior del cuerpo y del entorno que nos rodea para producir respuestas a diversos estímulos.

Es responsable de la percepción sensorial, el procesamiento cognitivo y diversas funciones fisiológicas como la respiración y la frecuencia cardíaca, y funciones conductuales como la toma de decisiones. El SNC está formado por la materia gris y la materia blanca, las cuales están integradas principalmente por células neuronales y células gliales [1]. Las células gliales son comúnmente conocidas como la glía, es el principal tejido de soporte que tienen las neuronas, el cual se compone de astrocitos, oligodendrocitos, microglía y células endociliales.

La glía es el tipo celular más abundante en el Sistema Nervioso Central (SNC). Las células gliales además de brindar soporte participan en funciones importantes como plasticidad, transducción de señales, inmunidad, aportan energía, regulan el microambiente y se encargan del desecho de sustancias metabólicas generadas por las neuronas [2].

Los tumores que se derivan de estas células se denominan gliomas y se clasifican de acuerdo a su origen celular en astrocitomas, oligodendrogliomas, endocilomas y oligoastrocitomas (de composición mixta). La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a los tumores primarios del SNC por grado de malignidad (I-IV), dependiendo de sus características histológicas (que hacen referencia a las células normales del SNC a la que se asemeja la célula tumoral) y a sus alteraciones genéticas. En el caso de los astrocitomas, el tumor de grado I (astrocitoma circunscrito) es benigno, de lento crecimiento y puede ser eliminado con cirugía; el de grado II (astrocitoma difuso) es de bajo grado de malignidad con

infiltración difusa temprana y es incurable con cirugía; el de grado III (astrocitoma anaplásico) presenta un incremento de anaplasia y proliferación; el de grado IV es el tumor más agresivo, también denominado glioblastoma multiforme (GBM), incluye vascularización, necrosis, así como resistencia a quimioterapia y radioterapia [3-5]. Mediante microarreglos de muestras de gliomas grado III y IV se identificaron tres subtipos moleculares: Proneural, Proliferativo y Mesenquimal y se encuentran asociados a cierta expresión de genes, progresión tumoral, activación de vías de señalización y supervivencia [6]. El GBM es de los tumores más agresivos y con peor pronóstico del SNC así como el tumor más letal dentro de los gliomas, lo que dificulta el tratamiento del GBM es su habilidad de migrar e infiltrarse en el parénquima cerebral, por lo que a pesar de ser un tumor poco frecuente es de gran relevancia porque es uno de los tumores con más baja esperanza de vida, tiene una incidencia mundial de 4 nuevos casos por cada 100 000 habitantes por año y a pesar de los avances en las técnicas de cirugía, radioterapia y quimioterapia, los pacientes tienen una media de supervivencia de aproximadamente 15 meses, actualmente el GBM no tiene cura [3, 7-9].

4.2 Origen y desarrollo del GBM

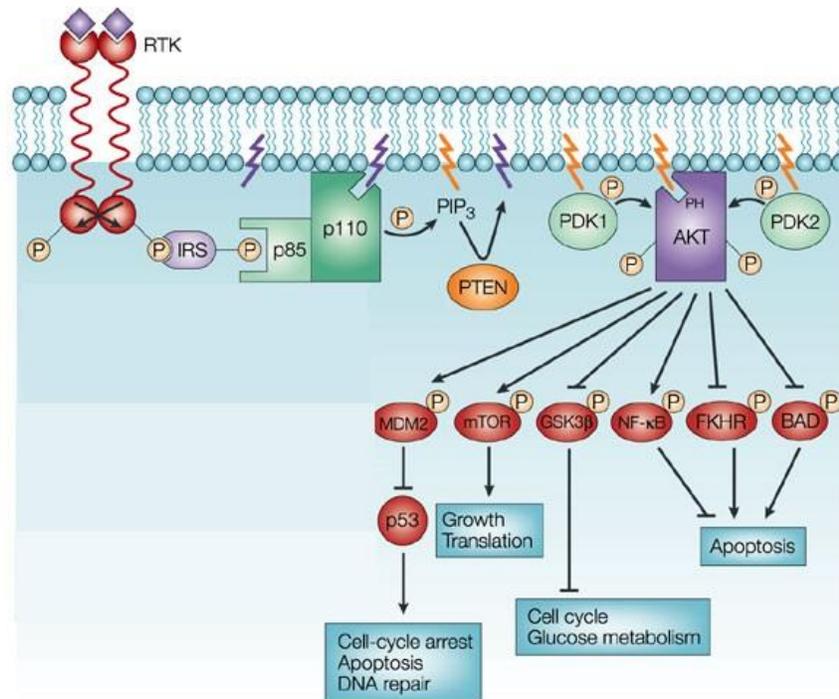
Los procesos patogénicos que subyacen al GBM incluyen la desregulación de diferentes vías de señalización interconectadas e implicadas en la inactivación de genes pro-apoptóticos y de genes reguladores del ciclo celular, así como la amplificación y/o hiperactivación de oncogenes implicados en el crecimiento, la supervivencia, la angiogénesis, la migración y la resistencia a la quimioterapia y la radioterapia [10-13].

Una vía de señalización que frecuentemente está desregulada en el glioma es PI3K/AKT/mTOR. Esta vía se asocia con el aumento del grado tumoral, la disminución de los niveles de apoptosis, la reducción de la supervivencia y la resistencia a la radiación [14-16]. Diversos estudios con muestras de glioblastoma humano muestran que aproximadamente el 80% de las muestras de tejido tienen

alterada la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR, además en pacientes con GBM se incrementan los niveles de fosforilación de AKT [14, 17].

La vía de señalización PI3K/AKT/mTOR, inicia con la unión de ligandos a receptores tirosina cinasa (RTK), con receptores acoplados a proteínas G (GPCR) o por la activación de integrinas [18]. A continuación, se activa la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) mediante la fosforilación de la unidad reguladora p85 y la unión de la subunidad catalítica p110, PI3K activa, fosforila a fosfatidilinositol difosfato (PIP2) convirtiéndolo en el segundo mensajero fosfatidilinositol trifosfato (PIP3), esta reacción se puede revertir por la enzima homóloga de fosfatasa y tensina (PTEN). AKT se activa cuando es reclutada en la membrana plasmática por la unión de PIP3 al dominio de homología de Pleckstrin (PH) de AKT, la translocación de la cinasa AKT a la membrana permite que sea fosforilada en la Thr 308 por la fosfoinositidecinasa 1 (PDK1) que también se translocó a la membrana al interactuar con PIP3, la cual es necesaria y suficiente para la activación de AKT, su máxima actividad se alcanza cuando el complejo MTORC2 fosforila la Ser 473 que se encuentra en el motivo hidrofóbico C-terminal de AKT (Figura 1) [19-21].

AKT es una cinasa de serinas y treoninas, comprende tres dominios funcionales, un dominio N-terminal, un dominio PH asociado a la unión de lípidos, se une por una región de bisagra al dominio catalítico de la cinasa que se asocia a la unión de ATP y un dominio C-terminal que contiene un motivo hidrofóbico [22]. AKT regula procesos biológicos importantes como apoptosis, proliferación, supervivencia y migración, mediante la inactivación de proteínas pro-apoptóticas como Bad y caspasa-9 y de proteínas reguladoras del ciclo celular como GSK3 β , FKHR, p21 y p27. Así como la activación de inhibidores de proteínas antiapoptóticas y factores de transducción como NF κ B, Mdm2, mTOR, p70S6k y 4EBD [18, 23] (Figura 1).



Nature Reviews | Cancer

Figura 1. Vía de señalización RTK/PI3K/AKT. Mediante la fosforilación y activación de AKT se regula la activación e inhibición de diversas dianas moleculares, lo que resulta en el crecimiento celular, la supervivencia y la proliferación celular a través de diversos mecanismos. Modificada de [24].

La vía de señalización Sonic Hedgehog (SHH) también se encuentra involucrada en el origen y el desarrollo del GBM. SHH es esencial durante la embriogénesis para el desarrollo de sistema nervioso central, y en adultos se relaciona con el mantenimiento de tejido normal y células troncales. Además, se asocia con el origen, progresión y grado del tumor, inhibición de apoptosis y la autorrenovación de las células madre cancerígenas de diferentes tumores, incluyendo el glioma [25, 26]. El factor de transcripción, homólogo del oncogen asociado al glioma (GLI), por sus siglas en inglés, es el efector final de la vía de señalización SHH y fue el primer gen amplificado descrito en gliomas humanos [27].

La vía se activa cuando el ligando SHH, se une al receptor Patched1 (PTCH1) y suspende la represión de Smoothed (SMO), lo que le permite translocarse a la membrana citoplasmática, donde interactúa con la proteína motora de

microtúbulos intraflagelares (KIF3 α) y con b-arrestina (Arrb2) para promover la liberación de GLI1 del complejo SuFu. Posteriormente, GLI1 se transloca al núcleo donde actúa como factor de transcripción e incrementa la transcripción de los genes ciclina D1, N-myc, Bcl-2 y VEGF. En ausencia del ligando SHH la vía permanece inactiva, ya que el receptor PTCH1 mantiene inhibido constitutivamente al receptor SMO en forma de dímero en el citoplasma, lo que impide señalización intracelular [28] (Figura 2).

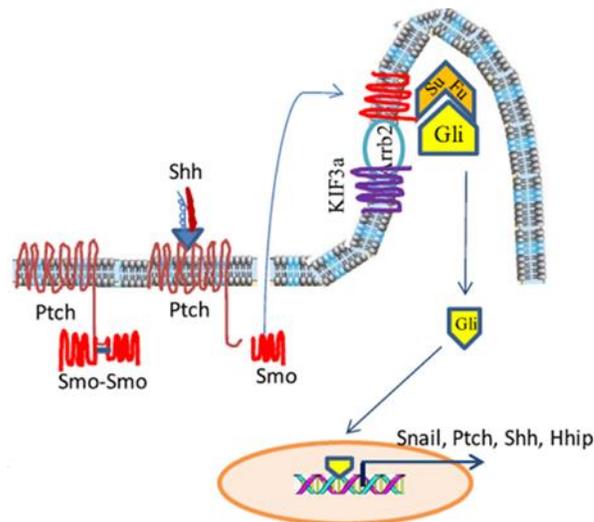


Figura 2. Vía de señalización SHH. La unión de SHH a Ptch libera la represión de SMO lo que permite que GLI sea liberado del complejo SUFU, para translocarse al núcleo donde se une al ADN y activa la transcripción de diversos genes, entre ellos GLI y Ptch [28].

Cabe resaltar que además de que ambas vías contribuyen con la agresividad del GBM, están interconectadas mediante la proteína ribosomal cinasa S6K, que es un efector de la vía de señalización PI3K/AKT y estimula la síntesis de proteínas, el crecimiento celular, supervivencia y proliferación [29] (Figura 3). Mediante inmunofluorescencia para detectar a la proteína S6K en un cultivo celular de muestras de GBM humano, que se incubaron con SAG, un agonista de SMO, se demostró que entre más actividad de SMO hay más fosforilación de S6k [29].

Otra evidencia de la existencia de interconexiones entre estas vías de señalización, es que al cuantificar el ARN mensajero de GLI1 en cultivos celulares

de muestras de GBM humano, incubados con ARN's de interferencia para PTEN, se observa que la disminución de la expresión de PTEN favorece la activación de GLI1 [29].

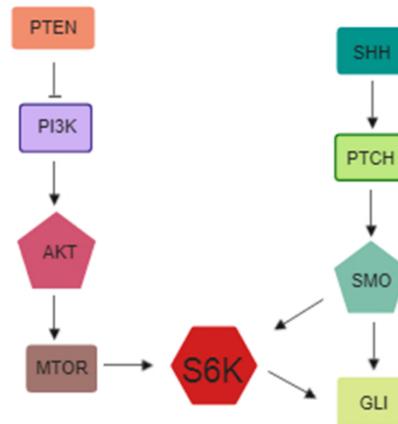


Figura 3. Regulación cruzada de las vías de señalización PI3K/AKT y Shh en GBM. La sobre expresión de Shh incrementa la actividad de S6K y la sobre expresión de los miembros de la vía PI3K/AKT incrementan la actividad de Gli.

4.3 Terapia contra el GBM

La terapia tradicional contra el GBM es en primer lugar la cirugía, seguida de la radioterapia y quimioterapia concomitante o adyuvante con temozolamida y nitrosoureas (carmustina, procarbazona, lomustina y nimustina), también se combina con vincristina o bevacizumab [30-33]. La temozolamida y las nitrosoureas son agentes alquilantes que dañan el ADN, la vincristina es un alcaloide vegetal que inhibe las estructuras microtubulares de las células y el bevacizumab es un anticuerpo contra el factor de crecimiento endotelial (VEGF), que es un mediador de la angiogénesis tumoral [32, 33]. La temozolamida es un agente quimioterapéutico de primera línea contra el glioma, capaz de penetrar la barrera hematoencefálica. Desafortunadamente las células del GBM frecuentemente presentan resistencia contra la radioterapia y contra los agentes alquilantes como la temozolamida.

Un mecanismo de resistencia a la temozolamida es la expresión de O6 metilguanina ADN metiltransferasa (MGMT), una enzima reparadora del ADN, que remueve el grupo metilo agregado por la temozolamida en la posición O6 del residuo de guanina, de esta manera las células del glioma contrarrestan el efecto antitumoral del quimioterapéutico y se vuelven resistentes [34, 35].

Los tratamientos convencionales actuales no son eficaces para erradicar el GBM, por lo que, estrategias experimentales recientes diseñadas para incrementar la eficacia de tratamientos contra el cáncer, incluyen terapias combinadas usando dos o más agentes terapéuticos más los tratamientos convencionales como la quimioterapia, radioterapia y cirugía. La combinación de agentes biológicamente activos con actividades mutuamente interdependientes es una estrategia relevante para aumentar la eficacia de las terapias dirigidas y así poder bloquear simultáneamente múltiples dianas celulares involucradas en el desarrollo del cáncer. Entre los beneficios de la terapia combinada encontramos que mejora la eficiencia comparada con la monoterapia, debido a que es una terapia multiobjetivo. Además, reduce la fármaco-resistencia debido a que el tratamiento constante con monoterapia permite a las células encontrar alternativas para sobrevivir y adicionalmente, el uso de múltiples agentes reduce el tiempo de tratamiento. También previene efectos tóxicos en células sanas y efectos secundarios, ya que se pueden utilizar productos naturales que ejercen un efecto quimio protector, por lo que también se conoce como terapia multi-beneficios [36-38].

4.4. AZD5363 o Capivasertib (AstraZeneca)

AZD5363 es un inhibidor de la cinasa pan-AKT que ha sido probado tanto *in vitro* como *in vivo*. Su estructura química es derivada de heterociclos bicíclicos que son eficaces para inhibir la actividad de AKT, ya que tiene una estructura química muy similar a la del ATP (Figura 4), de esta manera, AZD5363 compite por el sitio

activo de la cinasa, evita la unión del ATP al sitio catalítico de la enzima impidiendo la fosforilación del sustrato por parte de AKT [39].

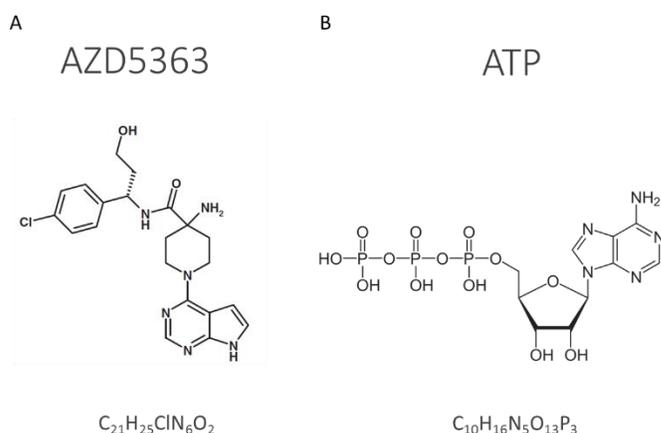


Figura 4. Estructura química de AZD5363 y ATP. Estructura química similar entre estos compuestos, A) AZD5363 y B) ATP. <https://go.drugbank.com/drugs/DB12218>

AZD5363 inhibe el crecimiento de una variedad de xenoinjertos tumorales humanos como cáncer de próstata, mama, renal, gástrico y cerebral, con monoterapia o en combinación con inhibidores del receptor al factor del crecimiento epidérmico (HER2) en modelos de cáncer de mama [40, 41], en combinación con Taxotere para el cáncer gástrico [42] o en combinación con Enzalutamida en el cáncer de próstata [43]. En un panel de 182 líneas celulares tumorales se observó una posible correlación entre la sensibilidad a AZD5363 y la presencia de PI3K/AKT hiperactivada, pérdida de PTEN o amplificación de HER2. Además, AZD5363 disminuye el metabolismo de la glucosa en los xenotipos tumorales U-87 MG [40].

4.5 AZD8542 (AstraZeneca)

AZD8542 es un inhibidor del receptor SMO, de la vía de señalización SHH también probado *in vitro* e *in vivo*, inhibe la expresión de GLI y PTCH en líneas celulares de cancer de próstata y páncreas e *in vivo* inhibe el crecimiento tumoral de xenoinjertos tumorales como cáncer de páncreas y de colon [44].

SMO está compuesto por un dominio transmembranal o TMD y un dominio rico en cisteínas o CRD. Mediante estudios de cristalografía demostraron que una molécula de colesterol se une al dominio CRD y que es indispensable para activar la vía de señalización, ya que al hacer mutaciones puntuales en el sitio de unión al colesterol se interrumpió la transducción de señales. Adicionalmente, mostraron que al agregar Vismodegib, que es un inhibidor de SMO, se provocó un cambio conformacional que no permitió la unión de la molécula de colesterol a SMO y por consiguiente se inhibió la vía de señalización (Figura 5A) [45]. AZD8542 tiene una estructura química heterocíclica muy similar a la de vismodegib, lo que sugiere que induce un cambio conformacional en la estructura de SMO y de esta manera inhibe la vía de señalización (Figura 5B).

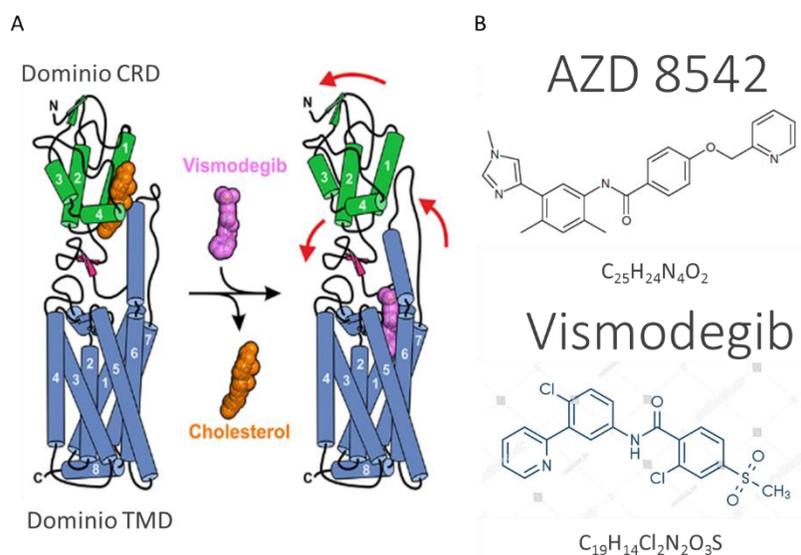


Figura 5. Estructura de la proteína SMO y estructura química de AZD8542 y Vismodegib. A) A SMO se une una molécula de colesterol que es indispensable para activar la vía de señalización de SHH. B) Estructura química similar entre los compuestos AZD8542 y Vismodegib [45].

4.6 Curcumina

La curcumina (CCR) es un compuesto polifenólico amarillo, que se extrae de la raíz de la planta *cúrcuma longa* nativa de Asia, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) ha aprobado la curcumina como "generalmente reconocida como segura" (GRAS) [46]. La CCR es una molécula pleiotrópica que posee

propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antimicrobianas y anticancerígenas (Figura 6).

Además, la CCR es conocida en todo el mundo como especia en la cocina y como colorante en la industria alimenticia, la podemos encontrar en quesos, mantequillas, conservas, mostaza, cereales, sopas, caldos, productos cárnicos y lácteos [47].

Adicionalmente, la CCR se utiliza en la India y China como medicina tradicional y también se emplea como suplemento nutricional en varios países [46, 48]. La CCR atraviesa la barrera hematoencefálica y es inocua para las células cerebrales normales de ratones *in vivo* e *in vitro* [49, 50].

La CCR disminuye la proliferación celular, la migración e induce la apoptosis en múltiples carcinomas humanos como el neuroblastoma, el cáncer de pulmón, el cáncer de próstata, el cáncer de mama y el GBM [49-55]. *In vivo*, la CCR bloquea la formación de tumores y reduce el crecimiento tumoral en el cerebro, además, prolonga la supervivencia en ratones [49, 52, 56]. En particular, la CCR disminuye los niveles de ARN mensajero y proteína de los miembros de la vía de señalización SHH-GLI en las células humanas de GBM [52, 57], además, también disminuye la activación de la vía de supervivencia PI3K/AKT en las células humanas de GBM [50, 58].

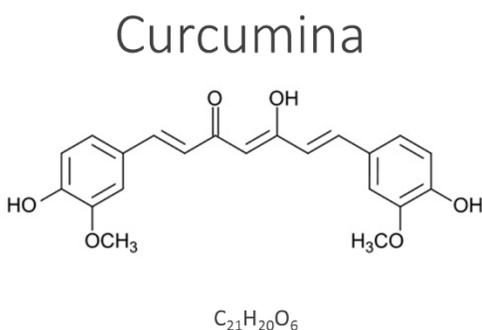


Figura 6. Estructura química de la Curcumina. La CCR es una molécula pleiotrópica debido a su compleja estructura química. Sus grupos hidroxilo y carbonilo, son los responsables de su actividad anticancerígena [59].

4.7 Resveratrol

El resveratrol (RV) es un polifenol natural presente en numerosas plantas y frutos como cacahuates, moras, arándanos y sobre todo en la uva. Además el RV es una fitoalexina, es decir, un compuesto antimicrobiano que se acumula en algunas plantas (Figura 7) [60, 61]. Su síntesis depende de factores de estrés como la radiación UV y la infección por hongos [62]. El RV es un antioxidante, quimioprotector y tiene efectos anticancerígenos en diferentes células cancerosas, como el cáncer colorrectal, de mama, de hígado, de páncreas y de próstata, así como el GBM. Se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que el RV promueve la apoptosis, regula el ciclo celular y disminuye la proliferación y la migración de las células cancerosas [63-67]. El RV atraviesa la barrera hematoencefálica y ejerce efectos protectores contra la lesión isquémica cerebral [68]. En particular, el RV reduce la fosforilación de AKT e induce la activación de p53 en las células humanas de GBM [64], además, también inhibe la vía de señalización SHH al disminuir los niveles de GLI1 en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el de próstata y el gástrico [69, 70]

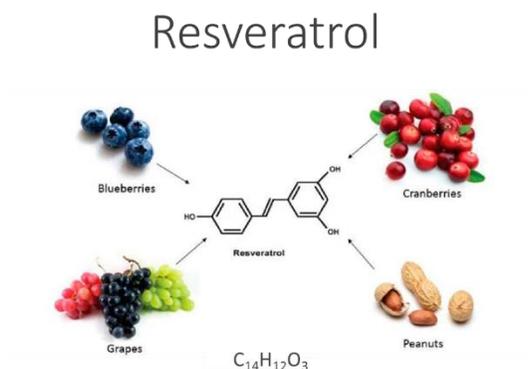


Figura 7. Estructura química del Resveratrol. El RV es una molécula pleitrópica, sus grupos hidroxilo y sus anillos aromáticos son responsables de su actividad anticancerígena y quimioprotectora [61].

Trabajos previos del laboratorio demostraron que la inhibición simultánea de las vías PI3K/AKT y ERK utilizando formas solubles de GAS1 y PTEN tiene un efecto aditivo que reduce el crecimiento del GBM y del cáncer de páncreas [71, 72], por lo tanto, decidimos que sería relevante investigar más a fondo los efectos de los tratamientos farmacológicos combinados que inhiben la actividad de las vías de señalización celular frecuentemente alteradas en el GBM, en particular PI3K/AKT y SHH como estrategia potencial para el tratamiento del GBM. Para este trabajo, seleccionamos agentes que inhiben estas vías, y determinamos sus efectos, cuando se aplican de forma independiente o en combinación, sobre el crecimiento de GBM y la eliminación de las células cancerosas.

En el presente trabajo utilizamos tratamientos combinados con AZD5363, AZD8542, CCR y RV contra el GBM *in vitro*. Demostramos que la administración combinada de AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RVI tiene efectos anticancerígenos a largo plazo, a través de la inhibición de las vías de supervivencia PI3K/AKT y SHH, la regulación de p21 y p27 y la inducción de apoptosis a través de la activación de la caspasa-3 en las líneas celulares humanas U-87 MG y A172 de GBM. Sugerimos que una terapia combinada que inhiba simultáneamente múltiples dianas moleculares de las vías de señalización PI3K/AK y SHH es una potencial estrategia adyuvante para el tratamiento del GBM.

5. Planteamiento del problema

El GBM es el tumor cerebral con peor pronóstico de supervivencia y los tratamientos tradicionales no son efectivos para erradicarlo, por lo tanto existe una necesidad urgente de encontrar un tratamiento alternativo o adyuvante para combatir al GBM y que disminuya los efectos secundarios. Lo que nos lleva a proponer una terapia combinada utilizando los inhibidores de las vías de señalización PI3K/Akt y/o Shh (AZD 5363, AZD 8542, CCR y RV).

6. Hipótesis

La combinación de los inhibidores de las vías de señalización PI3K/Akt y/o Shh (AZD5363, AZD8542, CCR y RV), potenciará el arresto celular y apoptosis, *in vitro* en células de GBM humano.

7. Objetivos

Objetivo General: Evaluar el efecto biológico de terapias combinadas con inhibidores de las vías PI3K/Akt y/o Shh (AZD5363, AZD8542, CCR y RV) contra glioblastoma.

Objetivo específico 1: Evaluar la citotoxicidad y determinar la IC50 de AZD5363, AZD8542, CCR y RV en líneas celulares de GBM humano.

Objetivo específico 2: Determinar si las terapias combinadas con AZD5363, AZD8542, CCR y RV *in vitro* en líneas celulares de GBM humano, generan citotoxicidad.

Objetivo específico 3: Evaluar la eficacia citotóxica de la mejor terapia combinada en líneas celulares de GBM humano.

Objetivo específico 4: Evaluar la transducción de señales de las vías de señalización PI3K/AKT/mTOR y SHH con la terapia combinada líneas celulares de GBM humano.

8. Materiales y métodos

8.1 Cultivo celular

Las células de GBM humano U-87 MG (pasaje cuatro a catorce) fueron obtenidas de la Colección Americana de cultivos tipo (ATCC, Manassas, VA, USA) por sus siglas en inglés y fueron cultivadas en medio DMEM-HG (Dulbecco's Modified Eagle Medium High-Glucose) (Gibco by Life Technologies, cat. 12800-017) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco by Life Technologies, cat. 16000-044), 1% de L-glutamina (Sigma-Aldrich, cat.G8540), 100 U/mL de Penicilina y 100 µg/mL de Estreptomicina (Gibco by Life Technologies, cat. 15140-122), y mantenidas a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. Las células de GBM humano A172 (pasaje dos a catorce) fueron proporcionadas amablemente por el Dr. Benjamín Pineda Olvera (Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Ciudad de México). Como control positivo en el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa, se utilizaron las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (pasaje seis a catorce) fueron obtenidas de la Colección Americana de cultivos tipo (ATCC, Manassas, VA, USA) por sus siglas en inglés, ambas líneas celulares, A172 y SH-SY5Y fueron cultivadas en medio DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium Ham's Nutrient Mixture F12) (Gibco by Life Technologies, cat. 12500-062) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco by Life Technologies, cat. 16000-044), 1% L-glutamina (Sigma-Aldrich, cat.G8540), 100 U/mL de Penicilina y 100 µg/mL de Estreptomicina (Gibco by Life Technologies, cat. 15140-122), y fueron mantenidas en una atmósfera de 95% de aire, 5% de CO₂ y 37°C.

8.2 Cultivo de glioma-esferas

Brevemente, las glioma-esferas fueron generadas como se describió previamente [73-75]. Las células de GBM humano U-87 MG y A172 fueron cultivadas en medio DMEM libre de suero suplementado con 2% de B27 (Gibco by Life Technologies, cat. 12587010), 20 ng/ml del factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés) (Sigma-Aldrich, cat. H9644) y 20 ng/ml del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF, por sus siglas en inglés) (Gold Biotechnology, cat. 1140-02-100) y mantenidas a una temperatura de 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% CO₂. Después de 24 h, las células flotantes se volvieron a sembrar en una caja nueva de cultivo de 60 mm, con medio suplementado libre de suero y el medio fue reemplazado cada 2 días. Los agregados flotantes, conocidos como gliomaesferas se formaron entre 3 y 5 días después de ser sembradas. Para su evaluación morfológica, se tomaron fotos con un microscopio invertido Nikon TMS.

8.3 Ensayo de formación de colonias

Las células se sembraron en cajas de cultivo de 60 mm a una densidad de 300,000 células/caja en medio DMEM y se mantuvieron por 24 h. Posteriormente, las células fueron incubadas en ausencia o presencia de los tratamientos combinados de interés por 24 h. Posteriormente, las células fueron resembradas en cajas de cultivo de 60 mm nuevas a una densidad de 300 células/caja con medio fresco para evaluar su habilidad clonogénica. Las células se mantuvieron por 10 días con recambio de medio completo cada tercer día. Las colonias obtenidas fueron lavadas con PBS, fijadas y teñidas con 0.1% de cristal violeta en etanol y contadas. Una colonia está constituida por al menos 50 células.

8.4 Agentes terapéuticos

Los agentes AZD5363 y AZD8542 (generosamente proporcionados por AstraZeneca), la CCR (Sigma-Aldrich, cat. C1386) y el RV (Sigma-Aldrich, cat. R5010) fueron disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO). Para el ensayo de citotoxicidad, se preparó una solución stock de 10 mmol/L (AZD5363 y AZD8542) 20 mmol/L (CCR y RV), subsecuentemente, fueron diluidas en medio DMEM-HG y DMEM-F12 correspondiente a cada línea celular. Las soluciones para los tratamientos combinados fueron preparados con las concentraciones correspondientes IC₅₀ de cada agente terapéutico. Todas las soluciones fueron almacenadas a -20°C.

8.5 Ensayo de MTT

Las células U-87 MG y A172 fueron sembradas en placas de 48 pozos (15,000 células/pozo). Para los ensayos de citotoxicidad las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de AZD5363, AZD8542, CCR y RV. Para determinar el efecto de los tratamientos combinados en la viabilidad celular, las células fueron expuestas a 11 combinaciones con AZD5363, AZD8542, CCR o RV. Después de 72 horas, las células viables se evaluaron al medir la conversión del colorante bromuro 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, cat. M2128) (5 mg/ml) a formazan, fue adicionado durante 2 horas. A continuación, los cristales de formazán fueron disueltos con DMSO. La absorbancia de la reacción fue cuantificada mediante un lector de microplacas automatizado a una longitud de onda de 595-630 nm (Bio-Rad).

8.6 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)

La extracción de ARN total fue realizada usando el reactivo TRIzol (Invitrogen, cat. #15596026, USA), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Posteriormente, 5 µg de ARN fue tratado con DNAsa (New England BioLabs, cat. #M0303S) y transformado a cADN usando la transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen, cat. #28025013) para realizar la PCR [76]. Para amplificar el ARNm de AKT, los siguientes oligos fueron usados: sentido 5'-GCCATGAAGATCCTCAAGAAGG-3' y antisentido 5'-CATCATCTCGTACATGACCACG-3'. Para amplificar el ARNm de SMO fueron usados los siguientes oligos: sentido 5'-CCCAGTTCATGGATGGTGC-3' y antisentido 5'-GTGGTTGCTCTTGATGGAGAAC-3'. Para amplificar el ARNm de β-actina se usaron los siguientes oligos: sentido 5'-TGGCACCACACCTTCTACA-3' y antisentido 5'-TCACGCACGATTTCCC-3' [72].

8.7 Ensayo de proliferación

La proliferación celular se detectó mediante el ensayo de incorporación de EdU (5-ethynyl-2-deoxy-uridina) de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Click-iTEdU imaging kit, Invitrogen, cat. C10337). Brevemente, las células fueron sembradas en cubreobjetos e incubadas con 20 µM de EdU por 4 h. El EdU fue incorporado al ADN durante la síntesis y fue detectado con una reacción de tipo “click”, una reacción covalente entre un fluoróforo acoplado a un anión azida y un alquino acoplado al EdU, catalizada por cobre [77]. Los núcleos de las células se tiñeron con medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector Laboratories, cat. H-2000-2). Las imágenes fueron obtenidas con un objetivo 40x usando un microscopio confocal TCS SP8 Leica y las imágenes se procesaron con el software Image J (National Institutes of Health, USA).

8.8 Análisis de Western blot

La extracción de proteína fue realizada con un amortiguador de lisis (Tris 1 M, NaCl 150 mM, NP 40 0.5%, Tritón 0.5%, EDTA 0.5 M, NaF 100 mM, Na₃VO₄ 100 mM, PMSF 100 mM) y un coctel de inhibidor de proteasas (Complete Roche Diagnostics, cat. 1183617001). Cada muestra contenía 50 µg de proteína total y fueron separadas en geles SDS-PAGE al 8% o 10%, posteriormente se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad, cat.#1620177), las cuales fueron bloqueadas durante 1 h a temperatura ambiente con una solución de leche libre de grasa al 3% en TBS al 1% y después se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios contra p21 (Cell Signaling, USA; cat.2947T, dilución 1:1000), p27 (Santa Cruz Biotechnology,USA;cat. Sc1641, dilución1:200), ciclina D1 (Biorbyt,USA; cat. Orb10496, dilución 1:1000), caspasa-3 (Cell Signaling, USA; cat.9662S, dilución 1:500), p-AKT (Ser-473) (Cell Signaling, USA; cat. 4060S, dilución 1:1000), t-AKT (Cell Signaling, USA; cat. 4691S, dilución 1:5000), p-p70S6K (Santa Cruz Biotechnology, USA; cat. Sc-8416, dilución 1:1000), pS6K (Cell Signaling, USA; cat. 4858S, dilución 1:1000), SMO (Abcam, UK; cat. Ab113438, dilución 1:200), GLI1 (Cell Signaling,USA; cat. C68H3, dilución 1:500) y β-actina (Sigma Aldrich, USA; cat.A3854, dilución 1:80,000). Las membranas se lavaron e incubaron por 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo HRP-cabra anti-ratón (Invitrogen, Camarillo, CA; Cat. 62-6520, dilución 1:10,000) o HRP-cabra anti-conejo (Invitrogen, Camarillo, CA; Cat. 62-6120, dilución 1:20,000). Las proteínas se revelaron por quimioluminiscencia (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA, cat. NEL104001EA). Las imágenes fueron capturadas con el Sistema de imagen molecular automático FUSION SOLO S (Vilber) y el análisis de densitometría se realizó con el software Image J (National Institutes of Health, USA).

8.9 Análisis estadístico

Para la citotoxicidad, viabilidad celular, formación de colonias, proliferación y niveles de proteína determinada por análisis de Western blot, se usó la prueba estadística de ANOVA de una vía seguida de la prueba Post-Hoc Tukey o Games Howell. Se utilizó el software GraphPad Prism 6. Todos los valores son la media±error estándar de la media (SEM). La significancia estadística es indicada como: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. ns, no significativo.

9. Resultados

9.1 AZD5363, AZD8542, CCR y RV tienen efectos citotóxicos en células de GBM humano

Empleando RT-PCR demostramos que las líneas celulares de GBM humano U-87 MG y A172 expresan AKT y SMO, componentes críticos de las vías de señalización PI3K/AKT y SHH (Fig. 8A) [6, 14-16, 25-27, 78, 79] y dianas moleculares importantes de AZD5363, AZD8542, CCR y RV [39, 44, 50, 52, 57, 58, 64, 69, 70]. Por tanto, las líneas celulares U-87 MG y A172 son buenos modelos para evaluar los efectos de tratamientos con diferentes combinaciones de AZD5363, AZD8542, CCR y RV contra el GBM. Cuando las células U-87 MG y A172 se incubaron con concentraciones crecientes de AZD5363, AZD8542, CCR y RV, observamos mediante un ensayo de MTT que el efecto citotóxico es dosis dependiente, es decir, entre mayor es la concentración del agente, menor es el porcentaje de supervivencia (Fig. 8B).

La sensibilidad para AZD5363 y AZD8542 entre las dos líneas celulares fue diferente, mientras que para CCR y RV fue similar. Analizamos los datos de citotoxicidad de ambas líneas celulares para calcular la IC₅₀ de cada agente, mediante el software Graph Pad Prism 6 (Fig. 8C). La IC₅₀ de U-87 MG para AZD5363 es 45 μ M, para AZD8542 es 50 μ M, para CCR es 24 μ M y para RV es 110 μ M. La IC₅₀ de A172 para AZD5363 es 100 μ M, para AZD8542 es 70 μ M. para CCR es 18 μ M y para RV es 110 μ M. La CCR tiene los valores de IC₅₀ más bajos en ambas líneas celulares, lo cual sugiere es el agente más potente. Para los siguientes experimentos solo trabajamos con los valores de IC₅₀ de cada agente anticancerígeno para cada línea celular.

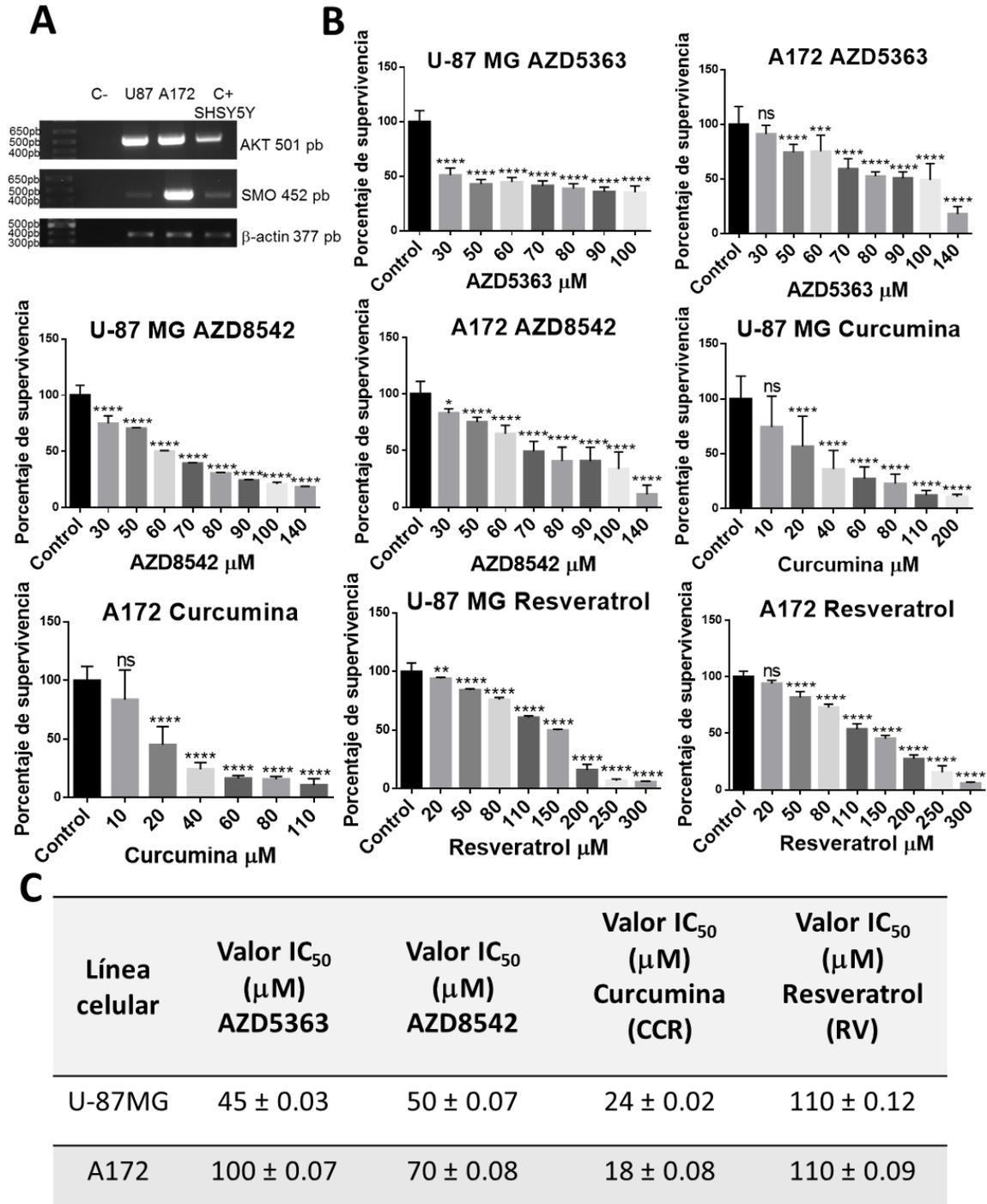


Figura 8. Caracterización molecular y efecto citotóxico de AZD5363, AZD8542, CCR y RV en células de GBM. A) Productos de RT-PCR para AKT (501 pb), SMO (452 pb) y para β-actina (377 pb), las células de neuroblastoma SH-SY5Y se utilizaron como control positivo. B) Efecto citotóxico de AZD5363, AZD8542, CCR y RV en las líneas celulares U-87 MG y A172 mediante un ensayo de MTT. Las barras representan la media ± SEM de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo con una prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Tukey's, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001. ns, no significativo. C) valores de las IC₅₀ para AZD5363, AZD8542, CCR, RV en las líneas celulares U-87 MG y A172.

9.2 La administración combinada de AZD5363, AZD8542, CCR y RV es más efectiva que la monoterapia

El balance entre proliferación celular y muerte celular es regulado por vías de señalización que están interconectadas. Cuando este balance se rompe se puede favorecer el inicio del cáncer, por eso es muy importante encontrar terapias dirigidas contra proteínas aberrantes que alteran el correcto funcionamiento de vías de señalización [80]. Ya que las combinaciones de agentes anticancerígenos contra dianas moleculares específicas mejora la eficacia comparada con la monoterapia [36, 37], examinamos la viabilidad celular de la administración combinada de AZD5363, AZD8542, CCR y RV usando las IC50 previamente determinadas en las líneas celulares de GBM humano U-87 MG y A172 (Fig. 8C). Las células se expusieron a 11 combinaciones con los cuatro agentes anticancerígenos durante 72 h. Mediante un ensayo de MTT, observamos que las 11 combinaciones inducen más del 50 % de muerte en células U-87 MG y A172 (Fig. 9). Estos resultados demuestran que todos los tratamientos combinados son más efectivos que cuando se usan como agentes independientes. Las combinaciones que inducen los niveles más bajos de supervivencia para la línea celular U-87 MG son AZD5363+AZD8542+CCR, AZD5363+AZD8542+CCR+RV, AZD5363+AZD8542+RV y AZD8542+CCR+RV (Fig. 9A). Las combinaciones que inducen los niveles más bajos de supervivencia para la línea celular A172 son AZD5363+CCR+RV, AZD5363+AZD8542+RV, AZD8542+CCR+RV y AZD5363+AZD8542+CCR (Fig. 9B). Basados en el análisis estadístico, para los siguientes experimentos decidimos continuar solo con las combinaciones AZD5363+AZD8542+RV, AZD8542+CCR+RV y AZD5363+AZD8542+CCR, ya que presentan baja supervivencia y coinciden en ambas líneas celulares.

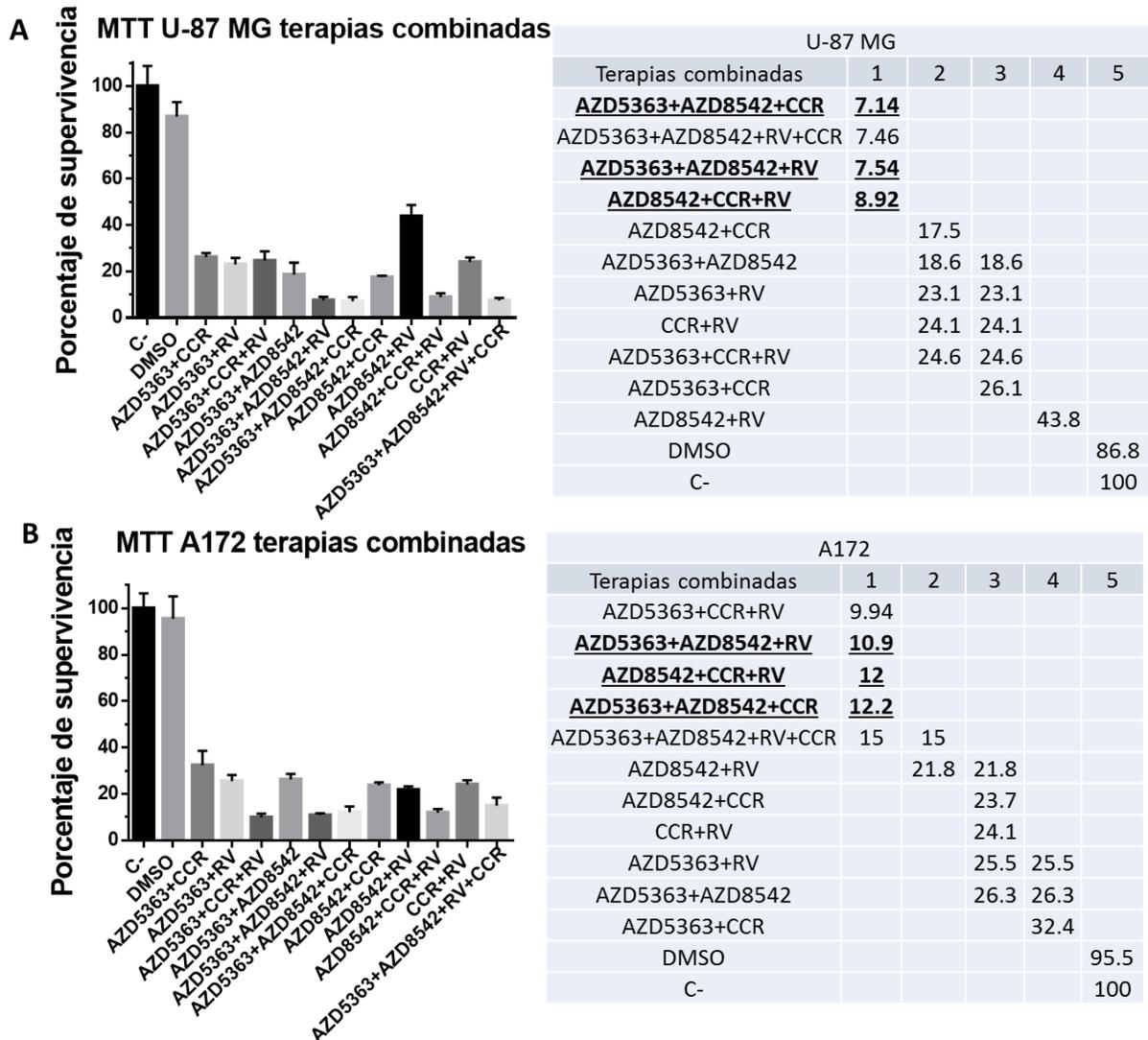


Figura 9. Efectos de las combinaciones en células de GBM humano. Las células U-87 MG y A172 fueron tratadas con las combinaciones de AZD5363, AZD8542, CCR y RV. Después de 72 h de tratamiento, se determinó la viabilidad mediante un ensayo de MTT. Medio fresco y DMSO fueron utilizados como control negativo. A) El panel del lado izquierdo muestra la supervivencia (como porcentaje) de las células U-87 MG, el panel del lado derecho muestra el análisis estadístico. B) El panel del lado izquierdo, muestra la supervivencia (como porcentaje) de las células A172, el panel del lado derecho muestra el análisis estadístico. Las barras representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo con la prueba de ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Games Howell, * $p < 0.05$.

9.3 Los tratamientos combinados con AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RV inhiben la formación de colonias derivadas de células de GBM humano

Los tratamientos convencionales contra el GBM incluyen cirugía, seguida de radioterapia y/o quimioterapia, sin embargo, la tasa de recurrencia es mayor al 90% [32]. La recurrencia del GBM se define como la progresión de células cancerosas residuales después de un tratamiento estándar y estos tumores tienden a ser más agresivos y resistentes a la terapia que el tumor original [32]. Por esta razón es muy importante encontrar tratamientos efectivos a largo plazo que eviten el crecimiento de células cancerosas residuales.

Para determinar la eficacia de las terapias combinadas AZD5363+AZD8542+RV, AZD8542+CCR+RV o AZD5363+AZD8542+CCR y evaluar si pueden tener un efecto prolongado, utilizamos el ensayo in vitro de formación de colonia o clonogénico, para determinar si una sola célula cancerosa puede recuperarse, después de un daño potencialmente letal y evaluar su habilidad para proliferar y crear una nueva colonia, la cual debe contener al menos 50 células [81].

Observamos que las células U-87 MG forman colonias dispersas en comparación con las células A172, que forman colonias aglomeradas (Fig. 10A). La figura 10B muestra que, como se esperaba, las células de los controles crecieron y formaron colonias en ambas líneas celulares. Además, observamos que las células formaron colonias cuando se incubaron con la combinación AZD5363+AZD8542+RV, mientras que las combinaciones AZD5363+AZD8542+CCR y AZD8542+CCR+RV, no formaron colonias. Estos resultados indican que la combinación de AZD5363+AZD8542+RV permite que las células residuales crezcan y probablemente se favorece la recurrencia a largo plazo.

Hay menos colonias de las células A172 cuando son tratadas con la combinación AZD5363+AZD8542+RV comparadas con las colonias de las células U-87 MG, sin embargo, se forman suficientes colonias que podrían desencadenar la recurrencia (Fig. 10C). Basados en estos datos, decidimos que para los siguientes experimentos, solo usaríamos las combinaciones que no formaron colonias.

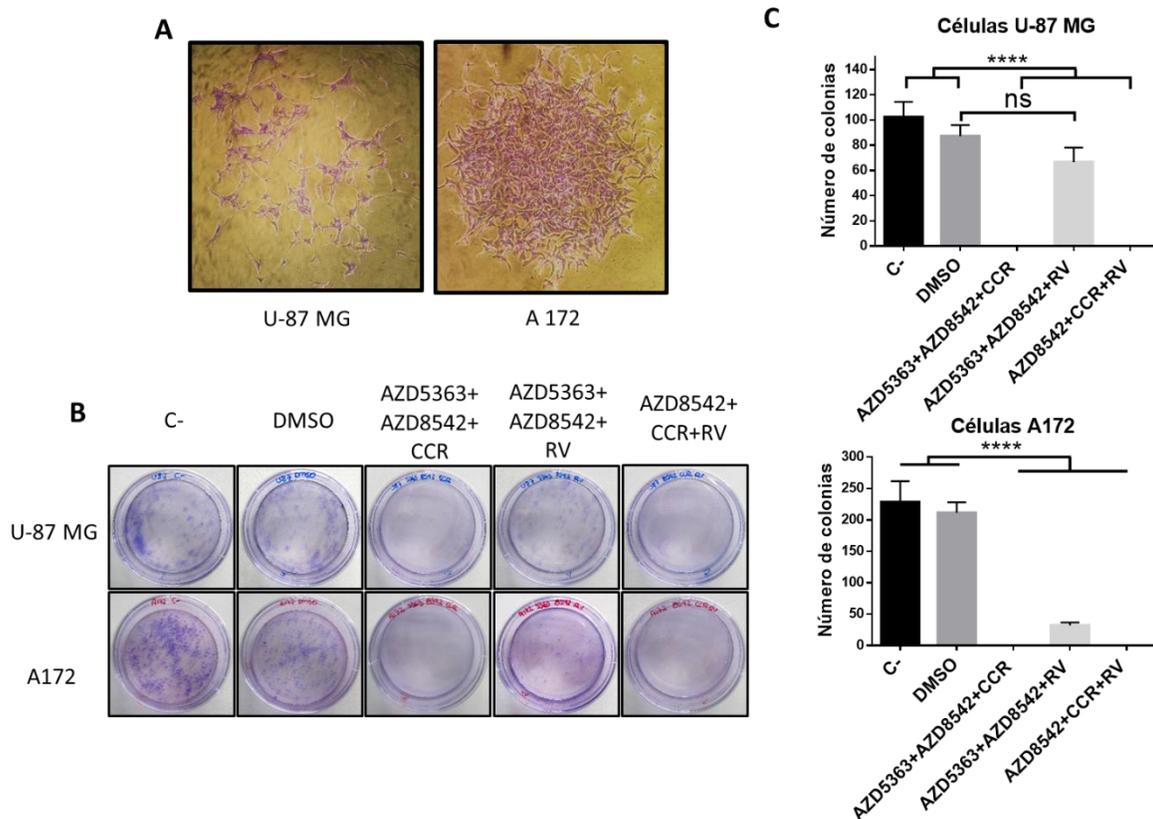


Figura 10. Análisis clonogénico de las combinaciones AZD5363+AZD8542+RV, AZD5363+AZD8542+CCR y AZD8542+CCR+RV para evaluar la supervivencia a largo plazo del GBM humano. A) Imágenes representativas de colonias obtenidas en células controles U-87 MG (panel izquierdo) y A172 (panel derecho). B) Imágenes representativas de las cajas de cultivo con colonias teñidas obtenidas de células tratada U-87 MG (panel superior) y A172 (panel inferior). C) Análisis cuantitativo de la formación de colonias de células tratadas U-87 MG (panel superior) y A172 (panel inferior). Las barras representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo con una prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Tukey, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. ns, no significativo.

9.4 La administración de las combinaciones AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RV inhiben la proliferación de células de GBM humano y disminuyen la supervivencia de glioma-esferas

Para determinar el curso temporal de la muerte de las células tratadas con las diferentes combinaciones que inhiben la formación de colonias, las células U-87 MG y A172 fueron expuestas a AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RV durante 24, 48 y 72 h y posteriormente la viabilidad celular fue determinada mediante un ensayo de MTT. Observamos que después de 24 h de tratamiento, hay aproximadamente 50% de supervivencia en ambas líneas celulares, después de 48 h de tratamiento hay mayor inhibición del crecimiento comparado con los controles (Fig. 11A). Por lo tanto, nos preguntamos cuál es el destino de las células vivas después de 24 h de tratamiento y determinamos su tasa de proliferación, mediante el ensayo de incorporación de EdU. Los resultados muestran que después de 24 h de tratamiento hay una drástica reducción de células que incorporan EdU, comparadas con las células control, en ambas líneas celulares. Esto nos sugiere, que el porcentaje de células que sobreviven después de 24 h de tratamiento con AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RV dejan de proliferar, lo que indica que es probable que las células ya no se recuperen. Después de estos tratamientos, las células de GBM humano adquieren un daño permanente que las conduce a la muerte (Figura 11 B). Adicionalmente, mediante un ensayo de MTT determinamos que los tratamientos combinados con AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RV disminuyen significativamente la viabilidad de glioma-esferas derivadas de células U-87 MG y A172 (Fig. 11C). Estos resultados indican que los tratamientos combinados podrían ser una buena estrategia para el tratamiento del GBM.

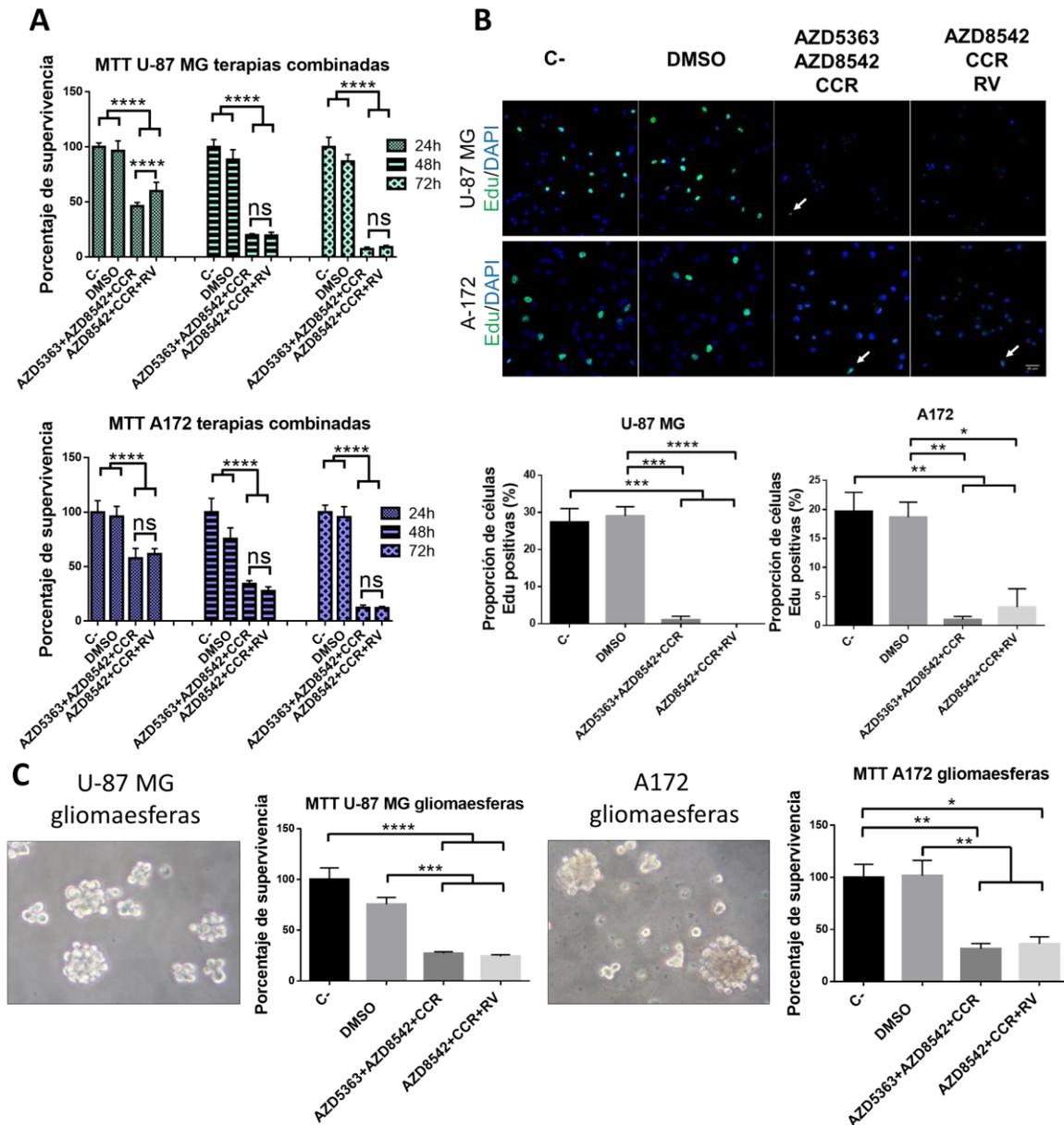


Figura 11. Determinación de los efectos de los tratamientos combinados AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RV contra la recurrencia del GBM. A) Las gráficas muestran supervivencia (como porcentaje) de células U-87 MG (panel superior) y células A172 (panel inferior), las líneas celulares se incubaron con AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RV por 24 h, 48 h y 72 h; la viabilidad celular, se determinó por el ensayo de MTT. B) El panel superior muestra imágenes representativas de células positivas a EdU, U-87 MG y A172, barra 40 μ M. Las células verdes, son células que incorporaron el EdU, las flechas indican células positivas a EdU, tratadas con AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RV. El panel inferior, muestra el porcentaje de células positivas a EdU para ambas líneas celulares. Los datos obtenidos fueron de tres campos por condición experimental. El porcentaje de las células que incorporaron EdU, se obtuvieron de la siguiente manera: EdU+/DAPI+*100. C) Imágenes representativas de glioma-esferas derivadas de células U-87 MG (panel izquierdo) y A172 (panel derecho). Las gráficas muestran la supervivencia de las glioma-esferas (como porcentaje) tratadas con

AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RV por 72 h. El análisis estadístico se hizo con una prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Tukey, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. ns, no significativo.

9.5 La administración de las combinaciones AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RV inhiben las vías de supervivencia PI3K/AKT y SHH en células de GBM humano

La activación de las vías de señalización de PI3K/AKT y SHH están asociadas con el incremento del grado tumoral, proliferación celular, supervivencia, invasión, angiogénesis y disminuyen los niveles de apoptosis en gliomas humanos [6, 13, 14]. Además, las vías de señalización de PI3K/AKT y SHH hacen sinergia para mantener la proliferación celular y favorecer la agresividad del GBM [29, 82].

Para evaluar el mecanismo molecular subyacente al efecto de 48 h de incubación con AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RV sobre la viabilidad celular, determinamos la actividad de las vías de señalización antes mencionadas.

Observamos mediante el análisis de Western blot que los niveles de pAKT y tAKT disminuyen en las células U-87 MG con ambos tratamientos combinados.

Observamos niveles similares de pAKT y tAKT en las células A172 tratadas con la combinación AZD8542+CCR+RV, mientras que los niveles de pAKT aumentan en las células A172 incubadas con la combinación AZD5363+AZD8542+CCR. Cabe destacar, que en estos experimentos el análisis de densitometría fue normalizado con β -actina, ya que observamos una inesperada disminución de AKT total en ambas líneas celulares (Fig. 12B y D). Por otra parte, cuando realizamos el análisis de densitometría normalizando pAKT/tAKT, observamos que la mayoría de la proteína AKT está fosforilada, ya que sus niveles se mantuvieron o aumentaron con respecto al control (Fig. 13). A pesar de que la mayoría de la proteína AKT está fosforilada, observamos una disminución en la expresión de las proteínas p70S6K y S6K, los cuales son efectores cruciales de la vía de señalización PI3K/AKT. Por otro lado, los tratamientos combinados

AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RV inducen una disminución significativa en la actividad de SMO y GLI1 en ambas líneas celulares. En conjunto, estos resultados indican que los tratamientos combinados AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RV inhiben las vías de señalización PI3K/AKT y SHH y de esta forma impiden la sinergia entre las dos vías de señalización en ambas líneas celulares, contribuyendo a lograr un efecto anticancerígeno a largo plazo.

9.6 AZD5363+AZD8542+CCR y AZD8542+CCR+RV inducen muerte celular asociada a la activación de caspasa-3

La proteína p21 se sobre expresa en algunos tipos de cáncer y su sobreactivación está correlacionada positivamente con el grado del tumor, invasión y agresividad, además, es un indicador de mal pronóstico [83]. Frecuentemente, los gliomas malignos sobre expresan p21, mientras que los oligodendrogliomas y astrocitomas de bajo grado son negativos para p21 [84-87]. Además, en astrocitomas de alto grado, p27 citoplasmático está asociado con un mal pronóstico, mientras que p27 nuclear muestra una tendencia hacia un mejor pronóstico [88].

Por lo tanto, decidimos explorar el efecto de 48 h de tratamiento sobre la expresión de p21, p27 y ciclina D1.

Observamos mediante el análisis de Western blot, que las combinaciones AZD5363+AZD8542+CCR y AZD8542+CCR+RV disminuyen la expresión de p21 y p27 en las células U-87 MG (Fig. 14B) y A172 (Fig. 14D), por lo que podemos concluir que ambas combinaciones detienen la actividad anti-apoptótica y oncogénica de p21 y p27.

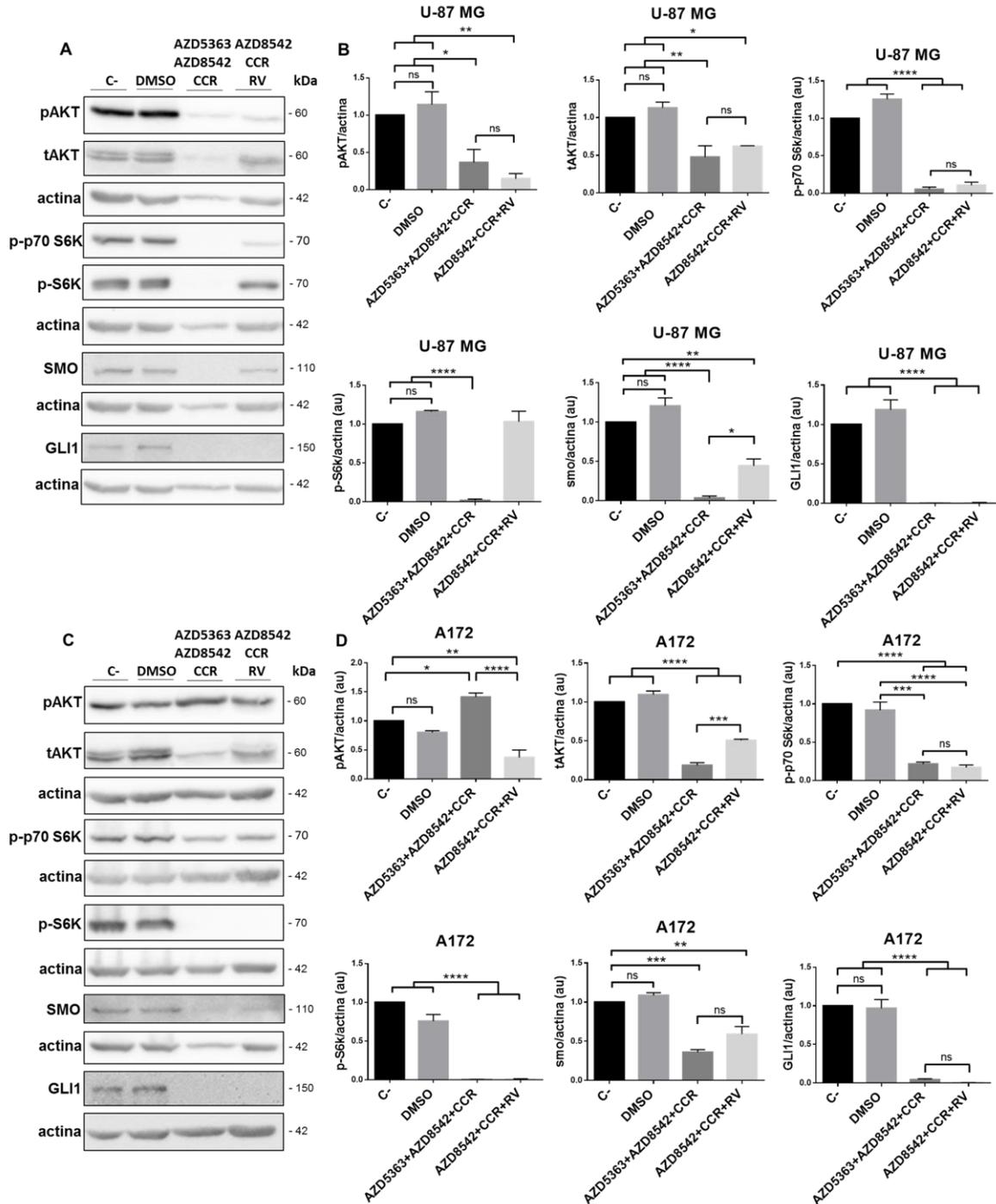


Figura 12. Efecto de los tratamientos combinados con AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RV en la actividad de las vías de supervivencia PI3K/AKT y SHH en células U-87 MG y A172. A) y C) Imágenes representativas del análisis de Western blot de pAKT, tAKT, p-p70S6k, p-S6k, SMO, GLI1 en células U-87 MG (panel superior) y células A172 (panel inferior). B) y D) Análisis cuantitativo del Western blot. Los datos se obtuvieron de tres experimentos independientes. Se usó actina como control de carga. El análisis estadístico se hizo con una prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Tukey, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. ns, no significativo.

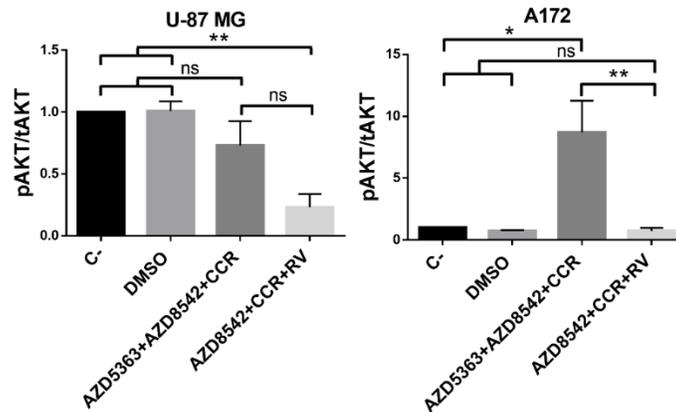


Figura 13. Efecto de los tratamientos combinados con AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RV en la actividad de AKT en las células U-87 MG y A172. Análisis cuantitativo de Western blot para células U-87 MG (panel izquierdo) y A172 (panel derecho). Los datos se obtuvieron de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo con una prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Tukey, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. ns, no significativo.

Por otro lado, observamos en los análisis del Western blot que la expresión de ciclina D1 disminuye en las células U-87 MG (Fig. 14B) y A172 (Fig. 14D) tratadas con la combinación, AZD5363+AZD8542+CCR, mientras que con la combinación AZD8542+CCR+RV la expresión de ciclina D1 se conserva. Adicionalmente, evaluamos la activación de caspasa-3 (cas3) como un marcador de apoptosis. Observamos una activación discreta de cas3 después de exponer a las células A172 a la combinación AZD8542+CCR+RV (Fig. 14D) y observamos un efecto más intenso al exponer a las células U-87 MG y A172 a la combinación AZD5363+AZD8542+CCR y a las células U-87 MG a la combinación AZD8542+CCR+RV (Fig. 14B y D). Estos datos muestran que los tratamientos combinados con AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RV inducen apoptosis en las células U-87 MG y A172.

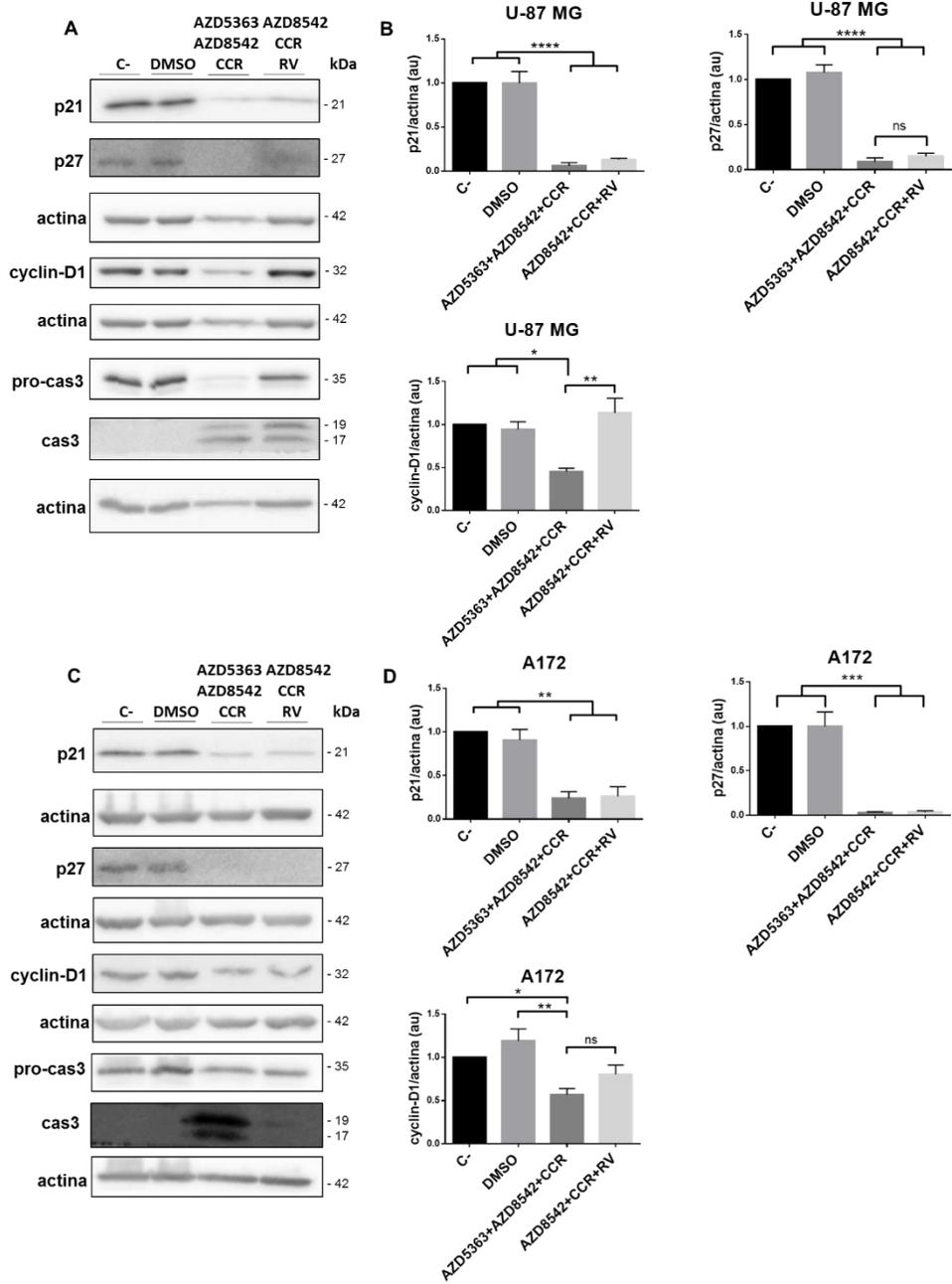


Figura 14. Efecto de los tratamientos combinados con AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RV sobre el ciclo celular y la apoptosis dependiente de caspasa 3 en células U-87 MG y A172. A) y C) son imágenes representativas del análisis de Western blot de p21, p27, ciclina D1, pro-caspasa y caspasa3 en células U-87 MG (panel superior) y A172 (panel inferior). B) y D) análisis cuantitativo del western blot en ambas líneas celulares. Los datos se obtuvieron de tres experimentos independientes. La actina se usó como control de carga. El análisis estadístico se hizo con una prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. ns, no significativo.

10. Discusión

En el presente estudio, demostramos que AZD5363, AZD8542, la CCR y el RV tienen efectos citotóxicos en las líneas celulares de GBM humano U-87 MG y A-172 GBM (Fig. 8B). Las principales dianas moleculares de estos cuatro agentes son las vías de señalización PI3K/AKT y SHH, que contribuyen a la agresividad del GBM y están interconectadas promoviendo la viabilidad del GBM humano, a través de la proteína cinasa ribosómica S6, un efector de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR que estimula la síntesis de proteínas, el crecimiento, la supervivencia y la proliferación de las células cancerosas [29]. Además, existen pruebas de que la señalización de PI3K/AKT regula la localización nuclear y la actividad transcripcional de GLI1 en melanomas, GBM y cáncer de próstata [89].

La CCR y el RV han sido clasificados recientemente como PAINS (pan assay interference compounds) por sus siglas en inglés, estos compuestos tienen actividad falsa contra una gran variedad de dianas moleculares, la actividad falsa de CCR y RV en múltiples ensayos puede deberse al uso de mezclas no puras de estos compuestos, lo que conduce a una respuesta contra múltiples objetivos [90, 91]. Además, hay estudios que demuestran que CCR y RV tienen actividad biológica limitada debido a su baja biodisponibilidad oral, incluso con administración intravenosa [92-95], sin embargo, hay diferentes estrategias farmacéuticas que pueden mejorar la biodisponibilidad de CCR y RV, incluyendo agentes potenciadores [96], nanopartículas [97, 98], complejos de fosfolípidos [99], liposomas [100, 101], dispersiones sólidas [102, 103] y microemulsionantes [104]. Por otra parte, CCR y RV son moléculas químicamente inestables, un hecho que complica su estudio; sin embargo, hay estrategias que pueden evitar su inestabilidad química, como es el uso de lípidos o nanopartículas [90]. A pesar de algunas características mencionadas previamente, la información obtenida en este estudio, junto con múltiples investigaciones que lo respaldan, indican que los tratamientos que incluyen el uso de CCR y RV, pueden ser útiles para el desarrollo de posibles estrategias terapéuticas alternativas contra el GBM. Considerando las

propiedades de la CCR y el RV, creemos que los presentes resultados proporcionan una interesante aproximación del potencial de los tratamientos propuestos. Los datos fueron obtenidos *in vitro*, por lo que serán necesarios futuros estudios en animales para determinar su eficacia y seguridad.

Recientes estrategias experimentales diseñadas para incrementar la eficacia de tratamientos contra el cáncer, incluyen terapias combinadas usando dos o más agentes más tratamientos convencionales, como quimioterapia, radioterapia y cirugía. Las combinaciones de agentes biológicamente activos son una buena estrategia para bloquear simultáneamente diferentes dianas moleculares implicadas en el desarrollo del cáncer para inducir la muerte de las células cancerosas.

Además, a diferencia de las monoterapias, las terapias combinadas reducen la resistencia a fármacos, los efectos tóxicos y tienen múltiples beneficios como la disminución del tiempo de duración de los tratamientos y el uso de productos naturales [37]. En este trabajo, observamos que los tratamientos combinados son más efectivos al disminuir la supervivencia celular que los agentes utilizados de manera independiente (Fig. 9).

De las once combinaciones evaluadas las más efectivas en ambas líneas celulares, fueron AZD5363+AZD8542+CCR, AZD5363+AZD8542+RV y AZD8542+CCR+RV, sugiriendo que los compuestos asociados con estas combinaciones son complementarios y contribuyen a inducir un mejor efecto. La combinación de los cuatro agentes juntos no fue significativamente diferente a las combinaciones de tres agentes. Por lo tanto, decidimos descartar la combinación AZD5363+AZD8542+CCR+RV.

Los tratamientos combinados tienen otras propiedades terapéuticas [105]. Por ejemplo, el RV y la CCR son agentes cardio protectores [106, 107] y representan una terapia novedosa anti-angiogénica [108, 109], éstas son propiedades que pueden ayudar durante el tratamiento del cáncer.

Estudios anteriores han demostrado que cuando se retira un agente anticancerígeno, unas pocas células cancerosas sobreviven y pueden llegar a

reanudar la división y seguir proliferando [110-112]. Además, algunas células cancerosas tratadas con fármacos sufren una detención prolongada del crecimiento, pero no mueren [113]. En conjunto, estos resultados indican que algunos agentes anticancerígenos no son eficaces para lograr un efecto a largo plazo. Así pues, utilizamos ensayos clonogénicos para determinar la eficacia de los tratamientos combinados sobre la capacidad de las células individuales supervivientes para generar colonias.

Los resultados demuestran que las líneas celulares de GBM humano U-87 MG y A-172 son resistentes a la combinación de AZD5363+AZD8542+RV, mientras que los tratamientos combinados de AZD5363+AZD8542+CCR y AZD8542+CCR+RV no permiten la formación de colonias, por lo que estos tratamientos reducen la probabilidad de recurrencia del cáncer (Fig. 10C). En este sentido, observamos una disminución drástica de la proliferación celular durante las primeras 24 h de cultivo tanto en las líneas celulares humanas de GBM U-87 MG como en la A-172 (Fig. 11B). Estas observaciones sugieren que tras 24 horas de tratamiento las células están irreversiblemente dañadas. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en el ensayo clonogénico. Por otro lado, se sabe que el GBM tiene una composición celular heterogénea, que incluye una pequeña subpoblación de células madre cancerígenas (CSCs) que promueven la iniciación del tumor y la resistencia a la quimioterapia y radioterapia, contribuyendo así a la progresión y recurrencia del tumor. Las glioma-esferas son un modelo bien establecido de células madre de GBM [73, 114-116].

En el presente trabajo demostramos que las combinaciones de AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RV reducen la viabilidad de las glioma-esferas derivadas de las células U-87 MG y A-172 (Fig. 11C). En este sentido, nuestros resultados sugieren una posible estrategia terapéutica para reducir la recurrencia del GBM.

La combinación de AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RV mantiene o incluso aumenta la expresión de AKT en células U-87 MG y A-172, sin embargo, los efectores río abajo de AKT como p70S6K y S6K, disminuyen. Estos

resultados concuerdan con los datos obtenidos en otras líneas celulares, por ejemplo la fosforilación de AKT aumenta en las células de cáncer de próstata PC3, DU145, LNCaP, en las células de cáncer de mama BT474 y en las células de meningioma, tras ser tratadas con AZD5363, un inhibidor de AKT competitivo con ATP [40, 41, 117]. CCR y RV también son inhibidores de la cinasa AKT y pueden unirse al sitio catalítico de la proteína [39, 118, 119]. Tras el reclutamiento de AKT a la membrana plasmática, adopta una conformación activa, exponiendo el sitio de unión al ATP y permitiendo el acceso a las cinasas reguladoras que fosforilan los residuos reguladores de Ser-473 y Thr-308 de AKT (Figura 15A) [22, 120, 121]. Cuando un inhibidor de AKT competitivo por ATP se une al sitio catalítico, permite una acumulación de AKT inactiva y altamente fosforilada en la membrana plasmática, lo que impide la interacción con las fosfatasas PP2A y PHLPP1, manteniendo así niveles estables de AKT fosforilada (Figura 15B) [122]. Previamente se ha reportado que los inhibidores de AKT competitivos con ATP causan una fosforilación aberrante en los residuos reguladores de AKT y que también reducen la fosforilación de las dianas de AKT río abajo, como GSK3 α/β , FOXO3 y S6k, por lo tanto, inhiben el crecimiento de células cancerosas *in vitro*, y el crecimiento tumoral en modelos animales de xenotrasplante [112, 123, 124].

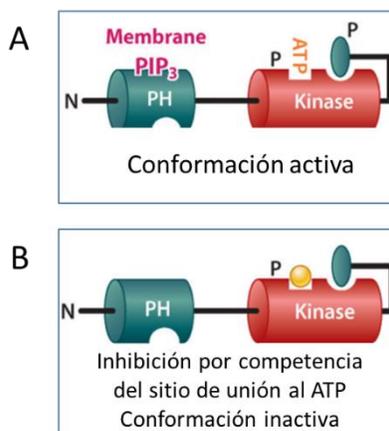


Figura 15. Conformaciones de la cinasa AKT. Los inhibidores de AKT competitivos por el sitio de unión al ATP generan una acumulación de AKT inactiva y altamente fosforilada en la membrana plasmática A) Conformación activa de la cinasa AKT. B) Conformación inactiva de la cinasa AKT por la inhibición por competencia del sitio de unión al ATP [125].

Por otra parte, previamente se demostró que la hiperfosforilación de AKT inducida por un inhibidor competitivo de ATP hace que la enzima AKT esté extremadamente activa tras eliminar el inhibidor del medio de cultivo, lo que sugiere que podría promover la oncogénesis [124]. En este sentido, cabe destacar que en los ensayos de formación de colonias, observamos que tras retirar la combinación AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RV del medio de cultivo, ni las células U-87 MG ni las células A172 sobreviven, a pesar de que en el western blot observamos niveles elevados de AKT fosforilada, estas observaciones sugieren que las combinaciones podrían causar daños irreversibles a las células o induciendo la activación de diferentes programas de muerte celular, esto, sin embargo, tendrá que ser evaluado en modelos animales para determinar si existe un efecto a largo plazo.

Por otra parte, la actividad inhibidora del crecimiento de p21 está asociada a su localización nuclear, ya que la p21 citoplasmática promueve la proliferación celular y tiene actividad antiapoptótica [83, 126, 127] inhibiendo proteínas implicadas en la apoptosis, como procaspasa-3, caspasa-8, caspasa-10 y el ensamble del complejo ciclinas tipo D (D1, D2 y D3) con CDK4 y CDK6. Además, p21 también suprime genes como MYC y E2F1 que tienen actividad anti apoptótica [127]. Estos datos coinciden con nuestros resultados, ya que observamos que en las células U-87 MG y A172 tratadas con AZD5363+AZD8542+CCR o AZD5363+AZD8542+RV, la expresión de p21 y p27 disminuye y la caspasa-3 se activa (Fig. 14). Además, AKT fosforila a p21 en Thr-145 y a p27 en Thr-157 para que permanezcan en el citoplasma. Cuando se bloquea AKT, p21 y p27 pierden su actividad oncogénica [128-131]. Por lo tanto, cuando empleamos los tratamientos combinados AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RVI para inhibir la actividad de AKT en las células U-87 MG y A172, observamos una marcada disminución de la expresión de p21 y de p27. Esto nos sugiere que AKT puede contribuir a la proliferación de células tumorales fosforilando y reteniendo a p21 y p27 en el citosol. Se sabe que p21 y p27, promueven específicamente el ensamblaje de los complejos cdk4/ciclina-D1, y es necesaria una interacción directa entre la cinasa y la ciclina, por lo que en ausencia de p21 y p27 la mayor parte del complejo se disocia y hay una mínima actividad cinasa, mientras que en su presencia casi

todo el complejo permanece intacto [132]. En este sentido, lo más probable es que en las células U-87 MG y A172 tratadas con las combinaciones AZD5363+AZD8542+CCR o AZD5363+AZD8542+RV, el complejo cdk4/ciclina-D1 se disocie por la ausencia de p21 y p27 y se impida la proliferación celular a pesar de que observamos una discreta disminución de la expresión de ciclina-D1 (Fig. 14). El ensayo de incorporación de Edu corrobora estos hallazgos, ya que muestra que la proliferación disminuye notablemente en las células U-87 MG y A172 tras 24 h con los tratamientos combinados (Fig. 11B).

En la figura 16 se muestra un modelo propuesto del mecanismo de acción de los tratamientos combinados. La estrategia terapéutica de emplear la administración combinada de AZD5363, AZD8542, CCR y RV en células GBM humano, demuestra que los tratamientos combinados son potenciales estrategias antitumorales. En este caso, las combinaciones AZD5363+AZD8542+CCR y AZD5363+AZD8542+RV, disminuyen la proliferación e inducen muerte celular asociada con la apoptosis, en células de GBM humano, al inhibir las vías de supervivencia PI3K/AKT y SHH, por la disminución de la actividad de AKT, la reducción de la expresión de SMO, p70S6K, S6K, GLI1, p21 y p27, así como la activación de la caspasa-3. Adicionalmente, se pueden considerar como una alternativa para combatir a las células madre cancerosas del GBM humano. Estos resultados sugieren que merece la pena seguir investigando el uso de terapias combinadas para contrarrestar este tipo de cáncer.

Aún quedan muchas preguntas por contestar, por lo que las perspectivas generales de este trabajo son, evaluar las combinaciones AZD5363+AZD8542+CCR y AZD8542+CCR+RV, *in vitro* en líneas celulares no cancerosas y en modelos murinos.

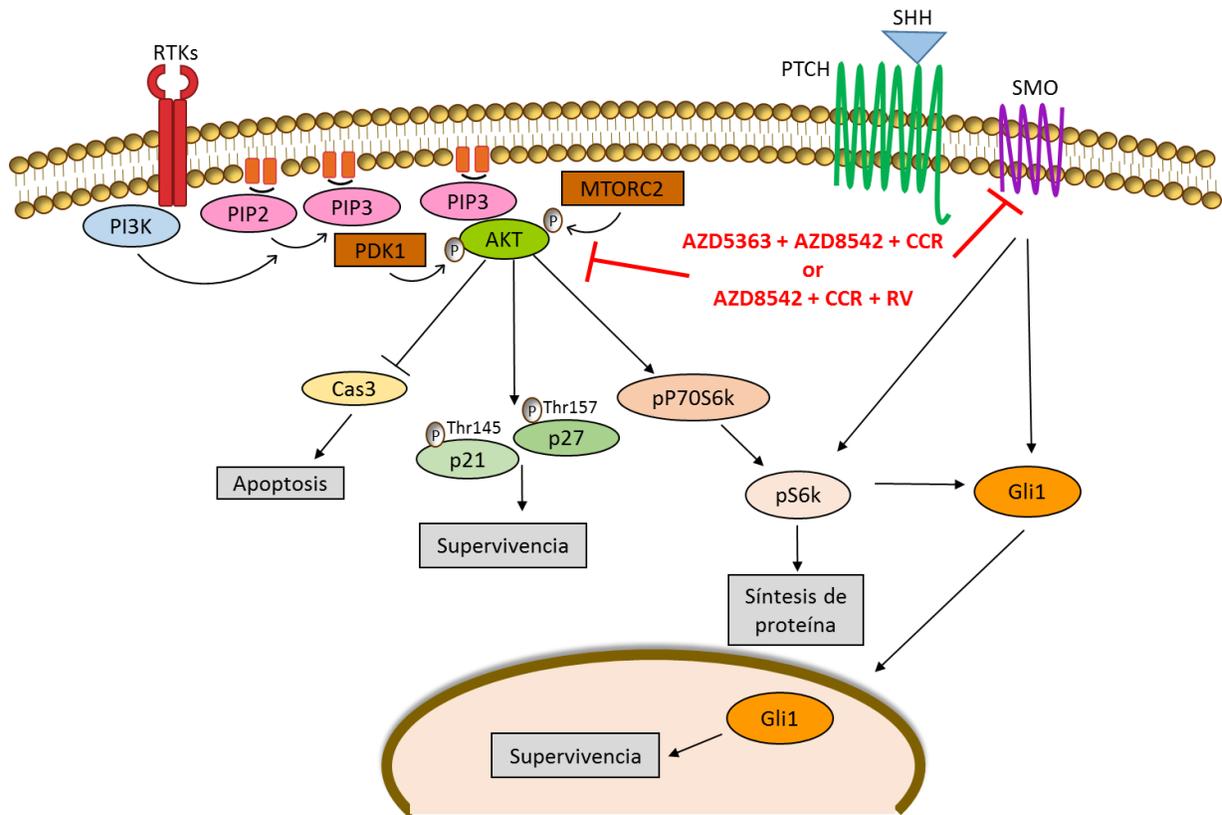


Figura 16. Modelo propuesto para explicar la acción de los tratamientos combinados. Las combinaciones AZD5363+AZD8542+CCR o AZD8542+CCR+RV disminuyen la activación de AKT, reduce la expresión de SMO, p70S6k, S6k, GLI1, p21, p27 y activa a la caspasa 3 en las líneas celulares U-87 MG y A172.

11. Bibliografía

1. Alqadah, A., et al., *Asymmetric development of the nervous system*. Dev Dyn, 2018. **247**(1): p. 124-137.
2. Verkhatsky, A., et al., *The Concept of Neuroglia*. Adv Exp Med Biol, 2019. **1175**: p. 1-13.
3. Furnari, F.B., et al., *Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment*. Genes Dev, 2007. **21**(21): p. 2683-710.
4. Lopez-Gonzalez, M.A. and J. Sotelo, *Brain tumors in Mexico: characteristics and prognosis of glioblastoma*. Surg Neurol, 2000. **53**(2): p. 157-62.
5. Adamson, C., et al., *Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going*. Expert Opin Investig Drugs, 2009. **18**(8): p. 1061-83.
6. Phillips, H.S., et al., *Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis*. Cancer Cell, 2006. **9**(3): p. 157-73.
7. Reifenberger, G., et al., *Pathology and Classification of Tumors of the Nervous System*. Oncology of CNS Tumors, 2010: p. 3-75.
8. Maher, E.A., et al., *Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter*. Genes Dev, 2001. **15**(11): p. 1311-33.
9. Ostrom, Q.T., et al., *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016*. Neuro Oncol, 2019. **21**(Suppl 5): p. v1-v100.
10. Nakada, M., et al., *Aberrant signaling pathways in glioma*. Cancers (Basel), 2011. **3**(3): p. 3242-78.
11. Godard, S., et al., *Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes*. Cancer Res, 2003. **63**(20): p. 6613-25.
12. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1061-8.
13. Hui, A.B.-Y., et al., *Detection of Multiple Gene Amplifications in Glioblastoma Multiforme Using Array-Based Comparative Genomic Hybridization*. Laboratory Investigation, 2001. **81**: p. pages717-723.
14. Chakravarti, A., et al., *The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas*. J Clin Oncol, 2004. **22**(10): p. 1926-33.
15. Ruano, Y., et al., *Identification of survival-related genes of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma multiforme*. Cancer, 2008. **112**(7): p. 1575-84.
16. Mure, H., et al., *Akt2 and Akt3 play a pivotal role in malignant gliomas*. Neuro Oncol, 2010. **12**(3): p. 221-32.
17. Li, X., et al., *PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma*. Oncotarget, 2016. **7**(22): p. 33440-50.
18. Matsuoka, T. and M. Yashiro, *The Role of PI3K/Akt/mTOR Signaling in Gastric Carcinoma*. Cancers (Basel), 2014. **6**(3): p. 1441-63.
19. Hay, N., *The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer*. Cancer Cell, 2005. **8**(3): p. 179-83.
20. Holand, K., F. Salm, and A. Arcaro, *The phosphoinositide 3-kinase signaling pathway as a therapeutic target in grade IV brain tumors*. Curr Cancer Drug Targets, 2011. **11**(8): p. 894-918.

21. Engelman, J.A., *Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(8): p. 550-62.
22. Kumar, C.C. and V. Madison, *AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors*. Oncogene, 2005. **24**(50): p. 7493-501.
23. Los, M., et al., *Switching Akt: from survival signaling to deadly response*. Bioessays, 2009. **31**(5): p. 492-5.
24. Vivanco, I. and C.L. Sawyers, *The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(7): p. 489-501.
25. Wetmore, C., *Sonic hedgehog in normal and neoplastic proliferation: insight gained from human tumors and animal models*. Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**(1): p. 34-42.
26. Clement, V., et al., *HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity*. Curr Biol, 2007. **17**(2): p. 165-72.
27. Kinzler, K.W., et al., *Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma*. Science, 1987. **236**(4797): p. 70-3.
28. Xu, X., et al., *Sonic Hedgehog Signaling in Thyroid Cancer*. Front Endocrinol (Lausanne), 2017. **8**: p. 284.
29. Filbin, M.G., et al., *Coordinate activation of Shh and PI3K signaling in PTEN-deficient glioblastoma: new therapeutic opportunities*. Nat Med, 2013. **19**(11): p. 1518-23.
30. J., S., B. E., and L.-L. M., *Effects of Gas1 on gliomas: a review on current preclinical studies*. Journal of Cancer Metastasis and Treatment, 2016. **2**: p. 101-111.
31. Taal, W., J.E. Bromberg, and M.J. van den Bent, *Chemotherapy in glioma*. CNS Oncol, 2015. **4**(3): p. 179-92.
32. Weller, M., et al., *Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma--are we there yet?* Neuro Oncol, 2013. **15**(1): p. 4-27.
33. Chamberlain, M.C., *Temozolomide: therapeutic limitations in the treatment of adult high-grade gliomas*. Expert Rev Neurother, 2010. **10**(10): p. 1537-44.
34. Sato, A., et al., *MEK-ERK signaling dictates DNA-repair gene MGMT expression and temozolomide resistance of stem-like glioblastoma cells via the MDM2-p53 axis*. Stem Cells, 2011. **29**(12): p. 1942-51.
35. Stupp, R., et al., *Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions*. J Clin Oncol, 2007. **25**(26): p. 4127-36.
36. Yap, T.A., A. Omlin, and J.S. de Bono, *Development of therapeutic combinations targeting major cancer signaling pathways*. J Clin Oncol, 2013. **31**(12): p. 1592-605.
37. Bayat Mokhtari, R., et al., *Combination therapy in combating cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(23): p. 38022-38043.
38. Orozco, M., et al., *Dutasteride combined with androgen receptor antagonists inhibit glioblastoma U87 cell metabolism, proliferation, and invasion capacity: Androgen regulation*. Steroids, 2020. **164**: p. 108733.
39. Addie, M., et al., *Discovery of 4-amino-N-[(1S)-1-(4-chlorophenyl)-3-hydroxypropyl]-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidine-4-carboxamide (AZD5363), an orally bioavailable, potent inhibitor of Akt kinases*. J Med Chem, 2013. **56**(5): p. 2059-73.
40. Davies, B.R., et al., *Preclinical pharmacology of AZD5363, an inhibitor of AKT: pharmacodynamics, antitumor activity, and correlation of monotherapy activity with genetic background*. Mol Cancer Ther, 2012. **11**(4): p. 873-87.
41. Lamoureux, F., et al., *Blocked autophagy using lysosomotropic agents sensitizes resistant prostate tumor cells to the novel Akt inhibitor AZD5363*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(4): p. 833-44.

42. Li, J., et al., *The AKT inhibitor AZD5363 is selectively active in PI3KCA mutant gastric cancer, and sensitizes a patient-derived gastric cancer xenograft model with PTEN loss to Taxotere.* J Transl Med, 2013. **11**: p. 241.
43. Toren, P., et al., *Combination AZD5363 with Enzalutamide Significantly Delays Enzalutamide-resistant Prostate Cancer in Preclinical Models.* Eur Urol, 2015. **67**(6): p. 986-990.
44. Hwang, R.F., et al., *Inhibition of the hedgehog pathway targets the tumor-associated stroma in pancreatic cancer.* Mol Cancer Res, 2012. **10**(9): p. 1147-57.
45. Byrne, E.F.X., et al., *Structural basis of Smoothed regulation by its extracellular domains.* Nature, 2016. **535**(7613): p. 517-522.
46. Gupta, S.C., S. Patchva, and B.B. Aggarwal, *Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials.* AAPS J, 2013. **15**(1): p. 195-218.
47. Sharma, R.A., A.J. Gescher, and W.P. Steward, *Curcumin: the story so far.* Eur J Cancer, 2005. **41**(13): p. 1955-68.
48. Gupta, S.C., et al., *Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2012. **39**(3): p. 283-99.
49. Purkayastha, S., et al., *Curcumin blocks brain tumor formation.* Brain Res, 2009. **1266**: p. 130-8.
50. Zanutto-Filho, A., et al., *The curry spice curcumin selectively inhibits cancer cells growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma.* J Nutr Biochem, 2012. **23**(6): p. 591-601.
51. Wang, X., et al., *Curcumin exerts its tumor suppressive function via inhibition of NEDD4 oncoprotein in glioma cancer cells.* Int J Oncol, 2017. **51**(2): p. 467-477.
52. Du, W.Z., et al., *Curcumin suppresses malignant glioma cells growth and induces apoptosis by inhibition of SHH/GLI1 signaling pathway in vitro and vivo.* CNS Neurosci Ther, 2013. **19**(12): p. 926-36.
53. Karmakar, S., et al., *Curcumin activated both receptor-mediated and mitochondria-mediated proteolytic pathways for apoptosis in human glioblastoma T98G cells.* Neurosci Lett, 2006. **407**(1): p. 53-8.
54. Mukhopadhyay, A., et al., *Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines.* Oncogene, 2001. **20**(52): p. 7597-609.
55. Mehta, K., et al., *Antiproliferative effect of curcumin (diferuloylmethane) against human breast tumor cell lines.* Anticancer Drugs, 1997. **8**(5): p. 470-81.
56. Zhuang, W., et al., *Curcumin promotes differentiation of glioma-initiating cells by inducing autophagy.* Cancer Sci, 2012. **103**(4): p. 684-90.
57. Yin, S., et al., *MicroRNA-326 sensitizes human glioblastoma cells to curcumin via the SHH/GLI1 signaling pathway.* Cancer Biol Ther, 2018. **19**(4): p. 260-270.
58. Zhao, J., et al., *Curcumin potentiates the potent antitumor activity of ACNU against glioblastoma by suppressing the PI3K/AKT and NF-kappaB/COX-2 signaling pathways.* Onco Targets Ther, 2017. **10**: p. 5471-5482.
59. Priyadarsini, K.I., *The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent.* Molecules, 2014. **19**(12): p. 20091-112.
60. Burns, J., et al., *Plant foods and herbal sources of resveratrol.* J Agric Food Chem, 2002. **50**(11): p. 3337-40.
61. Shrikanta, A., A. Kumar, and V. Govindaswamy, *Resveratrol content and antioxidant properties of underutilized fruits.* J Food Sci Technol, 2015. **52**(1): p. 383-90.
62. Langcake, P. and R.J. Pryce, *The production of resveratrol by Wis vinifera and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury.* Physiological Plant Pathology, 1976. **9**.

63. Carter, L.G., J.A. D'Orazio, and K.J. Pearson, *Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence*. *Endocr Relat Cancer*, 2014. **21**(3): p. R209-25.
64. Clark, P.A., et al., *Resveratrol targeting of AKT and p53 in glioblastoma and glioblastoma stem-like cells to suppress growth and infiltration*. *J Neurosurg*, 2017. **126**(5): p. 1448-1460.
65. Le Corre, L., et al., *Resveratrol and breast cancer chemoprevention: molecular mechanisms*. *Mol Nutr Food Res*, 2005. **49**(5): p. 462-71.
66. Sheth, S., et al., *Resveratrol reduces prostate cancer growth and metastasis by inhibiting the Akt/MicroRNA-21 pathway*. *PLoS One*, 2012. **7**(12): p. e51655.
67. Yang, S., et al., *Resveratrol elicits anti-colorectal cancer effect by activating miR-34c-KITLG in vitro and in vivo*. *BMC Cancer*, 2015. **15**: p. 969.
68. Wang, Q., et al., *Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils*. *Brain Res*, 2002. **958**(2): p. 439-47.
69. Gao, Q., et al., *Resveratrol inhibits the hedgehog signaling pathway and epithelial-mesenchymal transition and suppresses gastric cancer invasion and metastasis*. *Oncol Lett*, 2015. **9**(5): p. 2381-2387.
70. Slusarz, A., et al., *Common botanical compounds inhibit the hedgehog signaling pathway in prostate cancer*. *Cancer Res*, 2010. **70**(8): p. 3382-90.
71. Daniel-Garcia, L., et al., *Simultaneous Treatment with Soluble Forms of GAS1 and PTEN Reduces Invasiveness and Induces Death of Pancreatic Cancer Cells*. *Onco Targets Ther*, 2020. **13**: p. 11769-11779.
72. Sanchez-Hernandez, L., et al., *Additive effects of the combined expression of soluble forms of GAS1 and PTEN inhibiting glioblastoma growth*. *Gene Ther*, 2018. **25**(6): p. 439-449.
73. Erhart, F., et al., *Gliomasphere marker combinatorics: multidimensional flow cytometry detects CD44+/CD133+/ITGA6+/CD36+ signature*. *J Cell Mol Med*, 2019. **23**(1): p. 281-292.
74. Im, C.N., et al., *BIS-mediated STAT3 stabilization regulates glioblastoma stem cell-like phenotypes*. *Oncotarget*, 2016. **7**(23): p. 35056-70.
75. Qiang, L., et al., *Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines*. *Cancer Lett*, 2009. **279**(1): p. 13-21.
76. Romero-Trejo, D., et al., *The systemic administration of neural stem cells expressing an inducible and soluble form of growth arrest specific 1 inhibits mammary gland tumor growth and the formation of metastases*. *Cytotherapy*, 2021. **23**(3): p. 223-235.
77. Takayama, Y., K. Kusamori, and M. Nishikawa, *Click Chemistry as a Tool for Cell Engineering and Drug Delivery*. *Molecules*, 2019. **24**(1).
78. Becher, O.J., et al., *Gli activity correlates with tumor grade in platelet-derived growth factor-induced gliomas*. *Cancer Res*, 2008. **68**(7): p. 2241-9.
79. Du, W., et al., *Targeting the SMO oncogene by miR-326 inhibits glioma biological behaviors and stemness*. *Neuro Oncol*, 2015. **17**(2): p. 243-53.
80. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
81. Franken, N.A., et al., *Clonogenic assay of cells in vitro*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(5): p. 2315-9.
82. Chang, L., et al., *[Corrigendum] Activation of sonic hedgehog signaling enhances cell migration and invasion by induction of matrix metalloproteinase-2 and -9 via the phosphoinositide-3 kinase/AKT signaling pathway in glioblastoma*. *Mol Med Rep*, 2015. **12**(5): p. 7815.
83. Abbas, T. and A. Dutta, *p21 in cancer: intricate networks and multiple activities*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(6): p. 400-14.
84. Kokunai, T., et al., *Overcoming of radioresistance in human gliomas by p21WAF1/CIP1 antisense oligonucleotide*. *J Neurooncol*, 2001. **51**(2): p. 111-9.

85. Korkolopoulou, P., et al., *Expression of retinoblastoma gene product and p21 (WAF1/Cip 1) protein in gliomas: correlations with proliferation markers, p53 expression and survival*. Acta Neuropathol, 1998. **95**(6): p. 617-24.
86. Kokunai, T. and N. Tamaki, *Relationship between expression of p21WAF1/CIP1 and radioresistance in human gliomas*. Jpn J Cancer Res, 1999. **90**(6): p. 638-46.
87. Jung, J.M., et al., *Increased levels of p21WAF1/Cip1 in human brain tumors*. Oncogene, 1995. **11**(10): p. 2021-8.
88. Hidaka, T., et al., *The combination of low cytoplasmic and high nuclear expression of p27 predicts a better prognosis in high-grade astrocytoma*. Anticancer Res, 2009. **29**(2): p. 597-603.
89. Stecca, B., et al., *Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(14): p. 5895-900.
90. Nelson, K.M., et al., *The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin*. J Med Chem, 2017. **60**(5): p. 1620-1637.
91. Vang, O., *Resveratrol: challenges in analyzing its biological effects*. Ann N Y Acad Sci, 2015. **1348**(1): p. 161-70.
92. Ipar, V.S., A. Dsouza, and P.V. Devarajan, *Enhancing Curcumin Oral Bioavailability Through Nanoformulations*. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2019. **44**(4): p. 459-480.
93. Ma, Z., et al., *Pharmaceutical strategies of improving oral systemic bioavailability of curcumin for clinical application*. J Control Release, 2019. **316**: p. 359-380.
94. Galiniak, S., D. Aebisher, and D. Bartusik-Aebisher, *Health benefits of resveratrol administration*. Acta Biochim Pol, 2019. **66**(1): p. 13-21.
95. Chimento, A., et al., *Progress to Improve Oral Bioavailability and Beneficial Effects of Resveratrol*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(6).
96. Shoba, G., et al., *Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers*. Planta Med, 1998. **64**(4): p. 353-6.
97. Xie, X., et al., *PLGA nanoparticles improve the oral bioavailability of curcumin in rats: characterizations and mechanisms*. J Agric Food Chem, 2011. **59**(17): p. 9280-9.
98. Gokce, E.H., et al., *Resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles versus nanostructured lipid carriers: evaluation of antioxidant potential for dermal applications*. Int J Nanomedicine, 2012. **7**: p. 1841-50.
99. Maiti, K., et al., *Curcumin-phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats*. Int J Pharm, 2007. **330**(1-2): p. 155-63.
100. Kunwar, A., et al., *Transport of liposomal and albumin loaded curcumin to living cells: an absorption and fluorescence spectroscopic study*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1760**(10): p. 1513-20.
101. Neves, A.R., et al., *Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability*. Int J Nanomedicine, 2013. **8**: p. 177-87.
102. Chang, C.W., et al., *Development of a Solid Dispersion System for Improving the Oral Bioavailability of Resveratrol in Rats*. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2017. **42**(2): p. 239-249.
103. Seo, S.W., et al., *Preparation and pharmacokinetic evaluation of curcumin solid dispersion using Solutol(R) HS15 as a carrier*. Int J Pharm, 2012. **424**(1-2): p. 18-25.
104. Yang, F.F., et al., *Improving oral bioavailability of resveratrol by a UDP-glucuronosyltransferase inhibitory excipient-based self-microemulsion*. Eur J Pharm Sci, 2018. **114**: p. 303-309.

105. Vengoji, R., et al., *Natural products: a hope for glioblastoma patients*. *Oncotarget*, 2018. **9**(31): p. 22194-22219.
106. Abdelgawad, I.Y., M.K.O. Grant, and B.N. Zordoky, *Leveraging the Cardio-Protective and Anticancer Properties of Resveratrol in Cardio-Oncology*. *Nutrients*, 2019. **11**(3).
107. Carlson, L.J., et al., *Polymeric micellar co-delivery of resveratrol and curcumin to mitigate in vitro doxorubicin-induced cardiotoxicity*. *J Pharm Sci*, 2014. **103**(8): p. 2315-22.
108. Ding, Q., et al., *Preparation of curcumin-loaded poly(ester amine) nanoparticles for the treatment of anti-angiogenesis*. *J Biomed Nanotechnol*, 2014. **10**(4): p. 632-41.
109. Wong, J.C. and R.R. Fiscus, *Resveratrol at anti-angiogenesis/anticancer concentrations suppresses protein kinase G signaling and decreases IAPs expression in HUVECs*. *Anticancer Res*, 2015. **35**(1): p. 273-81.
110. Demarcq, C., et al., *The role of cell cycle progression in cisplatin-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells*. *Cell Growth Differ*, 1994. **5**(9): p. 983-93.
111. Kung, A.L., et al., *Cytotoxic effects of cell cycle phase specific agents: result of cell cycle perturbation*. *Cancer Res*, 1990. **50**(22): p. 7307-17.
112. Luo, Y., et al., *Potent and selective inhibitors of Akt kinases slow the progress of tumors in vivo*. *Mol Cancer Ther*, 2005. **4**(6): p. 977-86.
113. Chang, B.D., et al., *A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents*. *Cancer Res*, 1999. **59**(15): p. 3761-7.
114. Bao, S., et al., *Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response*. *Nature*, 2006. **444**(7120): p. 756-60.
115. Chen, J., et al., *A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy*. *Nature*, 2012. **488**(7412): p. 522-6.
116. Lathia, J.D., et al., *Cancer stem cells in glioblastoma*. *Genes Dev*, 2015. **29**(12): p. 1203-17.
117. John, P., et al., *AKT1(E17K) -mutated meningioma cell lines respond to treatment with the AKT inhibitor AZD5363*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2022. **48**(2): p. e12780.
118. Vishwakarma, V., et al., *Potent Antitumor Effects of a Combination of Three Nutraceutical Compounds*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 12163.
119. Hsieh, T.C., et al., *Biochemical and cellular evidence demonstrating AKT-1 as a binding partner for resveratrol targeting protein NQO2*. *PLoS One*, 2014. **9**(6): p. e101070.
120. Cheng, J.Q., et al., *The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery*. *Oncogene*, 2005. **24**(50): p. 7482-92.
121. Lazaro, G., E. Kostaras, and I. Vivanco, *Inhibitors in AKTion: ATP-competitive vs allosteric*. *Biochem Soc Trans*, 2020. **48**(3): p. 933-943.
122. Chan, T.O., et al., *Resistance of Akt kinases to dephosphorylation through ATP-dependent conformational plasticity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(46): p. E1120-7.
123. Han, E.K., et al., *Akt inhibitor A-443654 induces rapid Akt Ser-473 phosphorylation independent of mTORC1 inhibition*. *Oncogene*, 2007. **26**(38): p. 5655-61.
124. Okuzumi, T., et al., *Inhibitor hijacking of Akt activation*. *Nat Chem Biol*, 2009. **5**(7): p. 484-93.
125. Wenthur, C.J., et al., *Drugs for allosteric sites on receptors*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2014. **54**: p. 165-84.
126. Suzuki, A., et al., *Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP*. *Oncogene*, 1998. **17**(8): p. 931-9.
127. Dotto, G.P., *p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle?* *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1471**(1): p. M43-56.

128. Zhou, B.P., et al., *Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(3): p. 245-52.
129. Liang, J., et al., *PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest*. Nat Med, 2002. **8**(10): p. 1153-60.
130. Min, Y.H., et al., *Cytoplasmic mislocalization of p27Kip1 protein is associated with constitutive phosphorylation of Akt or protein kinase B and poor prognosis in acute myelogenous leukemia*. Cancer Res, 2004. **64**(15): p. 5225-31.
131. Shin, I., et al., *PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization*. Nat Med, 2002. **8**(10): p. 1145-52.
132. LaBaer, J., et al., *New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors*. Genes Dev, 1997. **11**(7): p. 847-62.