

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Maestría en Ciencias en Neurometabolismo

Evaluación de la actividad del Poro de Transición de la Permeabilidad Mitocondrial mediante el silenciamiento de Bax y Bcl-2 en células de neuroblastoma tratadas con Casiopeína® Illia

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Neurometabolismo

Presenta

I.BT Raúl Campos Mendoza

Dirigido por

Dra. María del Carmen Mejía Vázquez

Dra. María del Carmen Mejía Vázquez

Presidente

Dr. Pablo García Solís

Secretario

Dra. Nancy Hernández Chan

Vocal

Dra. Hayde Vergara Castañeda

Suplente

Dr. José Guadalupe Gómez Soto

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Noviembre, 2019
México

RESUMEN

El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido extracraneal infantil más frecuente a nivel mundial. Los tratamientos contra el NB han resultado ineficientes, llevando a la generación de nuevos compuestos como las Casiopeínas® (Cas), compuestos de cobre(II) con actividad antineoplásica tanto *in vitro* como *in vivo*. Su mecanismo de acción incluye el desacople de la cadena respiratoria, formación de aductos en fracciones nitrogenadas de DNA, generación de especies reactivas de oxígeno (ERO's) y en consecuencia, ocurre la apoptosis por vía mitocondrial. Para que la apoptosis mitocondrial suceda es necesaria la activación del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm), el cual permite el paso no-selectivo de diversas moléculas como Bax, Bcl-2, citocromo C, Ca^{2+} y ERO's. Sin embargo, hasta el momento se desconoce cuáles son las moléculas que pueden inducir la activación del PTPm. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue silenciar la expresión de Bax y Bcl-2 y evaluar su relación con el PTPm. Para llevar a cabo este objetivo, las líneas celulares SK-N-SH (NB humano) y 3T3-L1 (fibroblastos de ratón) fueron silenciadas mediante la técnica CRISPR/cas9 y se trataron con la CL_{50} de cisplatino y CasIIIa. Obtuvimos un silenciamiento génico con rendimientos de transfección mayores al 60%. La generación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y superóxido (O_2^-) no se vio afectada por la ausencia de la proteína Bax, mientras que el silenciamiento de Bcl-2 ocasiono el incremento hasta tres veces más de éstas ERO's. Durante la evaluación de la apoptosis, observamos que la ausencia de Bcl-2 tuvo un efecto protector mientras que la falta de Bcl-2 incrementó los niveles de caspasa-3. Finalmente, la capacidad de retención de calcio (CRC) permitió determinar que la ausencia de la proteína Bax ocasionó que el PTPm se mantuviera cerrado aún en condiciones de estrés; así mismo la CRC demostró que Bcl-2 no es esencial para el funcionamiento del PTPm.

Palabras Clave: Neuroblastoma, Bax, Bcl-2, Casiopeína IIIa, PTPm, CRISPR/Cas9.

Abstract

Neuroblastoma (NB) is the most common childhood extracranial solid tumor worldwide. NB treatments have inefficient results, problems with the generation of new compounds such as Casiopeína® (Cas), copper (II) compounds with antineoplastic activity both in vitro and in vivo. Its mechanism of action includes the decoupling of the respiratory chain, formation of adducts in nitrogen fractions of DNA, generation of reactive oxygen species (ROS) and consequently, apoptosis occurs by mitochondrial route. For mitochondrial apoptosis to happen, it is necessary to activate the mitochondrial permeability transition pore (mPTP), which allows the non-selective passage of various molecules such as Bax, Bcl-2, cytochrome C, Ca²⁺ and ERO's. However, until now it is unknown are the molecules that can induce the activation of mPTP. That is why the objective of this work was to silence the expression of Bax and Bcl-2 and evaluate their relationship with the PTPm. To accomplish this objective, the SK-N-SH (human NB) and 3T3-L1 (mouse fibroblasts) cell lines were silenced by the CRISPR / cas9 technique and treated with the LC50 of cisplatin and CasIIIa. We obtained a gene silencing with transfection yields greater than 60%. The generation of hydrogen peroxide (H₂O₂) and superoxide (O²⁻) was not affected by the absence of the Bax protein, while the silencing of Bcl-2 caused the increase of up to three times more of the EROs. During the evaluation of apoptosis, we observed that the absence of Bcl-2 had a protective effect while the lack of Bcl-2 increased caspase-3 levels. Finally, calcium retention capacity (CRC) will determine the absence of Bax protein caused the PTPm to remain closed even under stress conditions; Likewise, the CRC showed that Bcl-2 is not essential for the operation of the mPTP.

Key words: Neuroblastoma, Bax, Bcl-2, Casiopeínas, mPTP, CRISPR/Cas9

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro mi *Alma Mater*, la universidad que me formó como un ser humano integral y un ciudadano honesto, bajo el lema "Educo en la Verdad y en el Honor" valores de suma importancia y que asumo en mi día a día.

Al apoyo económico brindado por CONACYT-488055 como becario de la Maestría en Ciencias en Neurometabolismo.

Al apoyo económico brindado por FOPER-UAQ-2019-00589I para realizar el proyecto: "Evaluación del silenciamiento de Bax y Bcl-2 en células de neuroblastoma tratadas con Casiopeínas®"

A la Dra. María del Carmen Mejía Vázquez por su asesoría y apoyo en el desarrollo de este proyecto, por su dirección y todo su apoyo en mi formación dentro de la investigación.

A la Dra. Lena Ruíz Azuara por proporcionarnos las Casiopeínas®.

Al Técnico Académico de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro Francisco Josué López Martínez por su asesoría y apoyo técnico en el desarrollo de este proyecto.

Al Técnico Académico de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México Adrián Espinoza Guillén por su asesoría y apoyo técnico en el desarrollo de este proyecto, así como su participación en la elaboración de las Casiopeínas®.

A los miembros de mi sínodo por sus comentarios y revisiones acerca de mi trabajo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
2. ANTECEDENTES	7
2.1 Neuroblastoma	7
2.2 Clasificación del NB	7
2.3 Origen del NB	8
2.4 Tratamientos contra el NB	11
2.5 Casiopeínas® (Cas).....	12
2.7 Mitocondria.....	17
2.8 La mitocondria como un blanco terapéutico	18
2.9 Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial	19
2.10 Regulación de la actividad del PTPm	20
3. HIPÓTESIS	23
4. OBJETIVOS	23
General	23
Específicos	23
5. METODOLOGÍA	23
Muestra	23
Cultivo celular	24
Determinación de la CL para ampicilina en células de NB y fibroblastos	24
Diseño de las secuencias gRNA para CRISPR/Cas9	25
Silenciamiento de Bax y Bcl-2 mediante CRISPR/Cas9.....	25
Evaluación del silenciamiento	25
Tratamientos.....	26
Evaluación de ERO's.....	26
Evaluación de caspasa-3	26
Evaluación de CRC.....	27
Definición del plan de procesamiento y presentación de la información.....	27
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
Diseño de secuencias gRNA para el silenciamiento génico	27
Ensayo de la viabilidad celular con ampicilina en células SK-N-SH y 3T3-L1.....	28
Evaluación del silenciamiento génico.....	29
Ensayo de la viabilidad celular con CasIII y cisplatino en células 3T3-L1.....	33
Evaluación de ERO's	34
Detección de caspasa-3	39
Evaluación de la retención de calcio.....	42
7. CONCLUSIONES	45
8. REFERENCIAS	46

1. INTRODUCCIÓN

El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido extracraneal con mayor prevalencia (10-15%) en infantes entre los 0 y 5 años de edad¹, además de que representa el 50% de todos los tumores malignos diagnosticados en lactantes a nivel mundial². En el 47% de los casos, los tumores sin amplificación del oncogen N-MYC pueden involucionar mediante regresión espontánea asociada a la apoptosis mitocondrial³, por lo que resulta importante potenciar esta vía. El tratamiento utilizado con mayor frecuencia contra el NB, consiste en una terapia multimodal intensiva con una supervivencia menor al 50%, especialmente en pacientes en estadios III y IV de acuerdo con la clasificación del *Children's Oncology Group*⁴. Es por esto que en la búsqueda de nuevos compuestos antitumorales surgen las Casiopeínas® (Cas), una familia de compuestos con centro activo de cobre(II) que han mostrado actividad citotóxica y citostática en experimentos tanto *in vivo*⁵ como *in vitro*⁶. El mecanismo de acción de estos compuestos incluye el desacople de la cadena respiratoria por la interacción con succinato, piruvato y 2-oxoglutarato deshidrogenasa, así como la interferencia en la replicación del DNA mediante la formación de aductos con fracciones nitrogenadas⁷, incremento de ERO's tales como H₂O₂ y O₂⁻, disminución de los niveles de glutatión y disfunción mitocondrial⁸, acompañada de la expresión de Bax, Bcl-2 y citocromo C⁶ desencadenando la apoptosis mitocondrial.

Por otro lado, para que ocurra la apoptosis intrínseca se requiere de una estructura reguladora denominada poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm), encargada de activar el paso de moléculas a través de la membrana mitocondrial⁹. Sin embargo, hasta el momento se desconoce cuáles son las moléculas responsables de la activación del PTPm. Es por ello que el NB tratado con CasIIIa es un buen modelo de estudio para entender este proceso. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue realizar el silenciamiento génico de Bax y Bcl-2 y evaluar su participación en la activación del PTPm.

2. ANTECEDENTES

2.1 Neuroblastoma

El NB es el tumor sólido extracraneal más frecuente de la infancia (0-5 años de edad), con una media de edad al diagnóstico de 17 meses¹. Representa del 10 al 15% de todos los cánceres pediátricos y el 50% de todos los tumores malignos diagnosticados en lactantes; mientras que la tasa de mortalidad mundial es de 0.85 a 1.1 casos por cada millón de niños menores a 15 años de edad¹. El NB deriva de células simpato-adrenales de la cresta neural que migran a través del sistema nervioso simpático (SNS), para formar los ganglios simpáticos y las glándulas suprarrenales¹⁰.

2.2 Clasificación del NB

La variabilidad generalizada en el comportamiento tumoral del NB, está vinculada a múltiples factores relacionados con el pronóstico del paciente tal como se observa en la clasificación clásica del *Children's Oncology Group* (COG): edad del niño al momento del diagnóstico, histología tumoral y terapia a utilizar¹¹.

- Estadio I: tumor localizado, con más del 90% de supervivencia tras resección
- Estadio II: tumor localizado con extensión regional, edad de diagnóstico <18 meses de edad, con o sin amplificación de N-MYC, 90% a 95% de supervivencia con quimioterapia y/o radioterapia
- Estadio III: tumor localizado con metástasis ipsilateral y contralateral, edad de diagnóstico ≥18 meses de edad, amplificación del oncogen N-MYC (40%), poca o nula diferenciación celular, aberración de 11q, 50% a 65% de supervivencia con terapia multimodal
- Estadio IV: tumor con metástasis principalmente a huesos largos y/o médula ósea (MO), edad de diagnóstico >18 meses de edad, amplificación del oncogen N-MYC, pérdida de la heterocigosidad, supervivencia del 40% al 50% con terapia multimodal

- Estadio 4S (*special*): enfermedad ampliamente diseminada en lactantes, edad de diagnóstico <18 meses de edad, con o sin amplificación de N-MYC mayor del 90% de supervivencia debido a la regresión espontánea del tumor

Cuando el NB se encuentra en los estadios I y II, su diagnóstico es favorable; sin embargo, este panorama cambia completamente en el 70% de los pacientes con estadios III y IV donde se produce metástasis¹². Entre los marcadores de mal pronóstico para el NB, se considera que la edad del paciente no sea mayor a 18 meses, metástasis en el momento del diagnóstico, amplificación del oncogen N-MYC (factor pronóstico independiente de mayor malignidad), pérdida de 1p y/o 11q, ganancia de 17q, alteraciones en el número de copias de ADN y pérdida de la heterocigosidad⁴.

2.3 Origen del NB

De acuerdo con un estudio realizado en 2007 se determinó mediante la localización anatómica, marcaje de las células de NB y modelos genéticos de ratón, que el NB es una neoplasia maligna del SNS que se deriva de un sub-linaje del tronco de la cresta neural (CN) simpática denominado células simpato-adrenales¹³, lo que permite entender por qué el NB puede aparecer a lo largo de todo el SNS. Cabe mencionar que la mayoría (65%) de los tumores primarios de NB, surgen en la región abdominal y con menos de un 50% de aparición a lo largo del tronco simpático (desde el cuello hasta la pelvis)¹⁴; sin embargo, la glándula suprarrenal es el sitio donde se producen la mayoría (>50%) de los tumores primarios, por lo que se considera a los precursores de las células de Schwann (PCS) como candidatos de origen adicional del NB. De esta manera se presentan dos tipos de NB de acuerdo con su ubicación anatómica (simpático y suprarrenal), los NB suprarrenales y no suprarrenales muestran características clínicas, biológicas y de pronóstico distintas de acuerdo con el *International Neuroblastoma Risk Group*, las cuales incluyen: edad media del paciente al diagnóstico, edad mayor a 18 meses post-diagnóstico, estadio 4, ploidía ≤ 1 (diploide, hipodiploidía), ganancia de 17q, ganancia de 17q y/o pérdida de 11q así como amplificación de N-MYC¹⁵.

Al presentar el NB una relación de ontogenia directa con las células de la cresta neural (CCN), puede aprovecharse de sus características, especialmente en la interacción molecular que existe con el microambiente embrionario durante el proceso de tumorigénesis¹⁶. Un ejemplo claro es la transición-epitelio-mesénquima (TEM), la cual corresponde a un conjunto de procesos como la activación génica, ruptura de la membrana basal y pérdida de la polaridad celular, las cuales permiten el cambio de un fenotipo epitelial a uno mesenquimal¹⁶. Este proceso es necesario para iniciar la migración de las CCN lo que determina la particularidad de la invasividad presente en el NB. Se ha observado por parte del fenotipo invasivo, una desregulación de los genes FoxD3, Slug y Sox9/10, siendo estos los inductores mínimos de la TEM¹⁷.

Las trayectorias específicas que adoptan las CCN y PCS para poblar sitios anatómicos específicos, coinciden con las ubicaciones de inicio de los tumores en estadio 4S: tejido simpático-suprarrenal, hígado, piel, medula ósea (Fig. 1), lo que da pie al planteamiento de la siguiente hipótesis: el estadio 4S en lugar de una enfermedad metastática real con tumor primario seguida de diseminación metastática, podría ser una patología multifocal derivada de los progenitores de CCN tempranos³. Debido a esto, las CCN que proliferan de manera anormal se unirían a su sitio objetivo, y el número de células excesivas serían eliminadas mediante apoptosis; en caso de que persista la proliferación se dirigiría hacia la diferenciación y de esta manera se puede explicar la aparición temprana (<18 meses de edad) del estadio 4S, así como la ubicación anatómica de los focos tumorales.

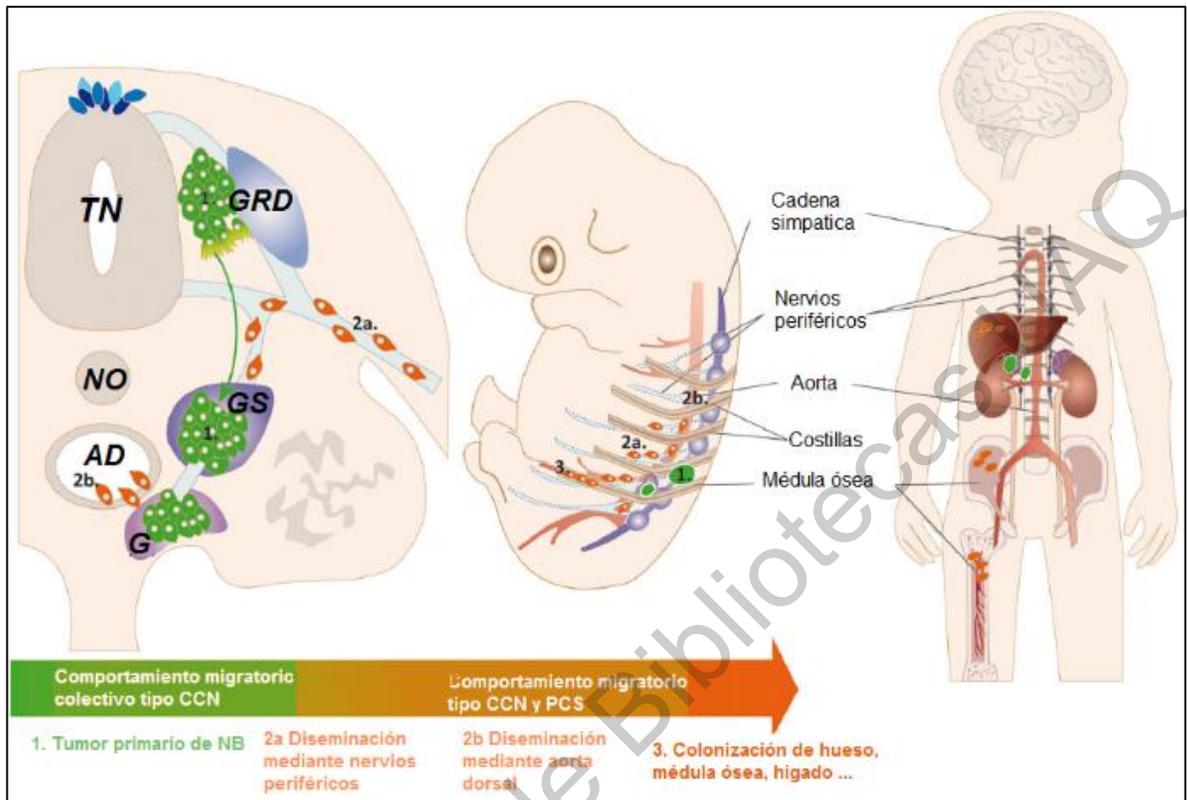


Figura 1. Estrategias migratorias de CCN/PCS utilizadas por el NB. 1) Las células de NB son capaces de anclarse a los órganos y tejidos como las CCN, en un comportamiento migratorio colectivo que las dirige hacia los derivados simpático-suprarrenales donde se unen y forman tumores primarios. Dentro del tumor primario, las células NB que se preparan para la diseminación secundaria cambian hacia conductas migratorias similares a los PCS, 2a) y/o CMH (células madre hematopoyéticas) impulsadas por las CCN, 2b) que les permitirán colonizar focos secundarios como el nicho de NO (notocorda) mediante el secuestro de nervios periféricos y las principales vías migratorias de la aorta¹⁴. Estos mecanismos podrían explicar la aparición rápida, extensa y concomitante de focos metastásicos en niños pequeños afectados por la enfermedad. TN (tubo neural), NO (notocorda), GRD (ganglios de la raíz dorsal), AD (Aorta dorsal) (Imagen modificada de Delloye-Bourgeois & Castellani, 2019).

2.4 Tratamientos contra el NB

Debido a la heterogeneidad en la ubicación, grado y estadio tumoral al momento del diagnóstico, los tratamientos para esta neoplasia incluyen: extirpación quirúrgica, quimioterapia, radioterapia, trasplante de células madre e inmunoterapia⁴. El tratamiento más utilizado contra el NB consiste en una terapia multimodal, donde se utilizan fármacos como el carboplatino, cisplatino, etopósido, ciclofosfamida y doxorubicina; sin embargo, esta aproximación terapéutica suele ser ineficiente (<50% de supervivencia), especialmente en pacientes en estadios III y IV^{18,19}. Hasta la fecha no existe un tratamiento estándar para pacientes con alto riesgo, por lo cual es importante la búsqueda de nuevos fármacos de alta eficacia y especificidad contra el NB.

Los fármacos utilizados en los tratamientos para los tumores sólidos como el NB, buscan eliminar las células malignas sobre las células sanas mediante la activación de mecanismos que disparen o regulen la apoptosis de componentes específicos que participan en ella. La acción de varios fármacos antitumorales en desarrollo, busca promover la apoptosis mitocondrial por medio de cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa (MME) promoviendo la apoptosis²⁰. Algunos de estos compuestos se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Fármacos contra el NB y su mecanismo de acción propuesto en la mitocondria

Fármaco	Tipo	Acción	Línea celular	Referencia
Bortezomib	Generador de ERO's	Apoptosis Liberación de cit C	CLB-Bel CLB-Ma1/CLB-Pe/CLB-Ba CLB-Sedp/ CLB-Ga/CLB-Bw/CLB-Chas	Combaret V. et al. 2008
Perifosina	Inhibidor de Akt	Apoptosis	Fase I del NB	Sun W. et al. 2012
Curcumina	Derivado de plantas	Pérdida de $\Delta\psi_m$ Liberación de cit C	GI-LI-N/HTLA-230/SH-SY5Y LAN5/SK-NBE2c/IMR-32	Pisano M. et al. 2010
CDDO-Me	Activación de Bax	Apoptosis Inhibe Akt	SK-N-AS/SH-SY5Y	Gheeya J.S. et al. 2009
SB415286	Inhibidor de GSK-3 β	Apoptosis	SK-N-BE/SK-N-SH	Dickey A. et al. 2011

Casiopeína IIgly	Generador de ERO's	Apoptosis mitocondrial Inhibe GSH Pérdida del $\Delta\psi_m$ Liberación de cit C, y Bcl-2	CHP-212 SK-N-SH	Gutiérrez et al, 2012
Casiopeína III Ea	Generador de ERO's	Apoptosis mitocondrial Inhibe GSH Pérdida del $\Delta\psi_m$ Liberación de cit C y Bcl-2	CHP-212 SK-N-SH	Gutiérrez et al, 2012
Casiopeína IIIa	Generador de ERO's	Apoptosis mitocondrial Inhibe GSH Pérdida del $\Delta\psi_m$ Liberación de cit C y Bcl-2	CHP-212 SK-N-SH Fase Clínica I	Gutiérrez et al, 2012

Especies reactivas de oxígeno (ERO's), Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), Citocromo C (cit C), Glutación (GSH).

2.5 Casiopeínas® (Cas)

Las Casiopeínas son una familia de moléculas antineoplásicas con un centro activo de cobre(II) cuya fórmula general es $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{N-O})]\text{NO}_3$ y $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$, las cuales fueron diseñados como una alternativa menos tóxica al uso del cisplatino. Este fármaco ha mostrado resultados prometedores como quimioterapéutico en modelos *in vivo* e *in vitro*²¹. El efecto tóxico de las Cas se ha relacionado con la inhibición de la glucólisis y la fosforilación oxidativa, de acuerdo con un estudio realizado con la CasIIgly donde se determinó su participación en la inhibición de la hexocinasa (HK) citosólica y mitocondrial, así como el cese de flujo a través del segmento glucolítico HK-TPI (Triosa-fosfato isomerasa)²².

Adicionalmente, experimentos *in vitro* con mitocondrias aisladas de cardiomiocitos, han mostrado que las Cas aumentan la tasa de consumo de oxígeno en la respiración basal así como la despolarización del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), lo que sugiere que las Cas actúan como desacopladores mitocondriales²³. Así mismo se observó que al utilizar el inmunosupresor ciclosporina A (CsA) posterior al tratamiento con Cas, se inhibió la turgencia de la mitocondria generada como respuesta al estrés oxidativo, demostrando de esta manera la participación de la mitocondria en específico del PTPm, debido a que la

apertura del PTPm se ha asociado con la inflamación de la matriz y la liberación de pequeñas proteínas proapoptóticas, como el citocromo c y el daño oxidativo de las proteínas o los lípidos²⁴. Estos cambios podrían ser responsables del efecto inhibitorio sobre la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias del corazón de rata²² y la apoptosis desencadenada por Cas observada en células neoplásicas y tumores²⁵, además de que han demostrado una selectividad tumoral entre diferentes líneas celulares de una misma neoplasia⁶ y entre células sanas de crecimiento acelerado y crecimiento normal.

El cobre es un metal traza esencial en sistemas biológicos y dependiendo de su concentración y la naturaleza de sus ligandos puede ser tóxico²⁶. Las Cas al contar con el elemento cobre en su estructura son capaces de catalizar reacciones tipo Fenton (Fig. 2), generando el radical hidroxilo (HO•), lo cual culmina con un incremento en la producción de H₂O₂ y O₂⁻ en las mitocondrias, así como una despolarización en la membrana mitocondrial externa. Además se ha observado daño a nivel del ADN mitocondrial que resulta en el desequilibrio de la producción de apoproteínas (E4, A1) de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que contribuye a una mayor producción de ERO's (Especies reactivas de oxígeno) llevando a una disfunción mitocondrial y por ende a la muerte celular⁸.

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* con las Casiopeínas, han hecho uso de la CasIIgly (Fig. 3A) por su eficiencia en la inducción de apoptosis mitocondrial^{21,22,27,28}. Sin embargo, aún falta información sobre la respuesta al tratamiento con otras Cas como la Casiopeína IIIa (Fig. 3B), la cual se encuentra actualmente en Fase Clínica I, y presenta menor toxicidad en la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH en comparación con CasIIgly y CasIIIEa⁶.

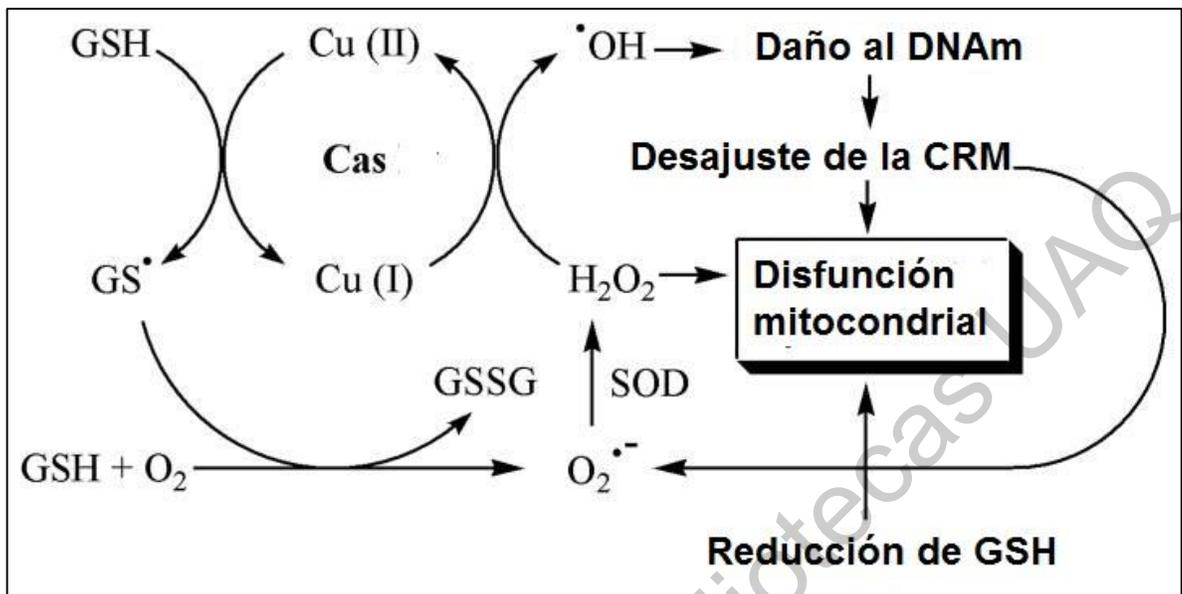


Figura 2. Generación de ERO's mediante Casiopeínas. El cobre brinda a las Cas la capacidad de producir reacciones tipo Fenton. GSH reacciona con Cas, resultando en la reducción del complejo de cobre y la formación del radical glutatilo (GS^\bullet), que a su vez es capaz de reaccionar con otro GS^\bullet para generar glutatión oxidado (GSSG), o con GSH y oxígeno para producir el radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y GSSG. La superóxido dismutasa (SOD) convierte $\text{O}_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 , que reacciona con Cas reducida para producir el radical hidroxilo (HO^\bullet). El HO^\bullet puede iniciar el daño del ADN mitocondrial que se traduce en un desequilibrio de la expresión de las apoproteínas de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) y a su vez, en la producción de más ERO's (Imagen modificada de Kachadourian et al., 2011).

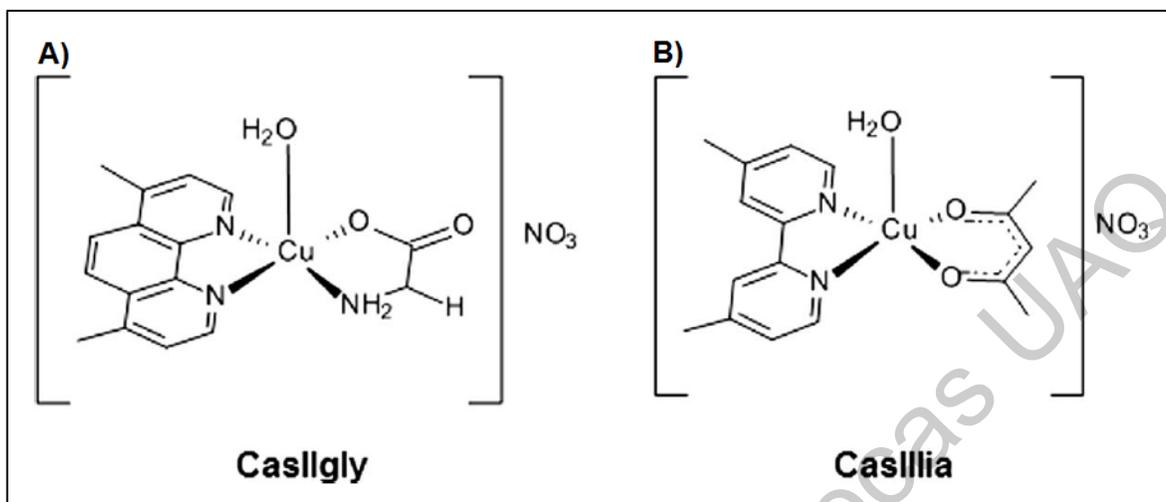


Figura 3. Estructura de la CasIIgly y CasIIIia. A) [Cu (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) (glicinato) (H₂O)] NO₃ (CasIIgly) CuC₁₆H₁₆O₅N₄ · 2H₂O (443.90 g/mol). B) [Cu (4,40-dimetil-2,20-bipiridina) (acetilacetato) (H₂O)] NO₃ (CasIIIia) CuC₁₇H₁₉O₅ · N₃ 2H₂O (444.93 g/mol) (Imagen extraida de Garcia-Ramos et al., 2017).

2.6 Apoptosis

La apoptosis es el conjunto de cambios morfológicos y bioquímicos que concluyen con una muerte celular programada, caracterizada por una serie de eventos entre los que se encuentra reducción del volumen citoplásmico, formación de vesículas en la membrana celular, condensación de la cromatina y fragmentación del núcleo²⁹. Las dos vías apoptóticas más conocidas son la extrínseca, que es activada por receptores de membrana como Fas/CD95 y el receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1)³⁰, asociados con procesos de inflamación y enfermedades neurodegenerativas. Por otro lado, se encuentra la apoptosis intrínseca o mitocondrial la cual es activada por la entrada y salida de moléculas en la mitocondria³⁰.

La apoptosis mediada por las mitocondrias resulta en una de las formas más importantes para inducir la muerte celular programada, debido a que su desregulación resulta en procesos patológicos que en su mayoría están relacionados con el cáncer. Las proteínas de la familia Bcl-2 (Fig. 4) son importantes reguladoras de esta vía, sus miembros tienen funciones tanto proapoptóticas como

antiapoptóticas. En su mayoría, los miembros proapoptóticos inducen un cambio en la permeabilidad de la membrana mitocondrial dando lugar a la liberación de moléculas apoptóticas como cit C y ERO's³¹.

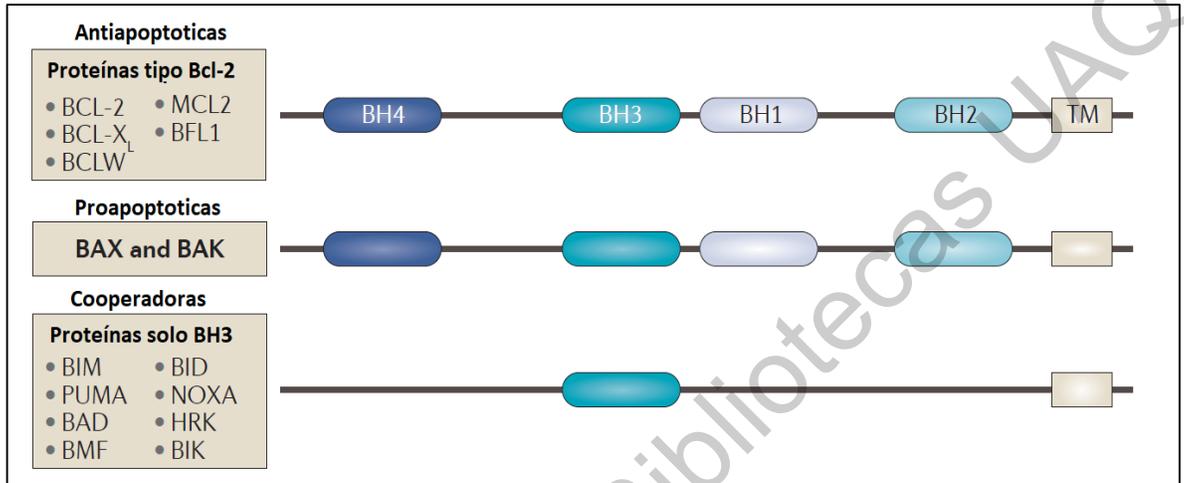


Figura 4. Familia de proteínas Bcl-2. Los miembros de esta familia comparten los dominios de homología Bcl-2 (BH), y son clasificados de acuerdo a su función en subgrupos. Las proteínas cooperadoras solo cuentan con el dominio BH3, el cual les permite actuar como ligando de los otros subgrupos. El dominio transmembranal (TM) permite a las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas su asociación con la MME; con excepción de BFL1, BAD, BID, PUMA y BMF (Imagen modificada de Delbridge et al. 2016).

Posterior a la activación de factores proapoptóticos como Bid/Bad (proteínas con dominio solo-BH3) presentes en el citoplasma, Bax puede traslocar a la mitocondria, donde se oligomeriza y se inserta en la MME³². Por su parte, Bak se encuentra unida a Bcl-x_L hasta que se da la activación y separación de dicha proteína por la translocación de Bax, entonces una vez que Bak se activa, trasloca a la MME donde forma oligómeros al igual que Bax^{32,33}. Por otro lado, las proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 o Bcl-x_L, funcionan previniendo la activación de Bax/Bak por medio de la inhibición de las proteínas con dominio solo-BH3 o mediante la unión con Bax/Bak³³.

Finalmente, ambas vías convergen en la fase efectora, donde se da la activación de las caspasas -3 y -7, encargadas de activar endonucleasas presentes en el citoplasma³⁴. La caspasa-3 es considerada la caspasa efectora más importante, ya que está encargada de la activación de la endonucleasa CAD (desoxirribonucleasa activada por caspasas) por medio de la separación del complejo inhibidor ICAD, de esta forma, CAD es capaz de llevar a cabo la degradación del ADN con la consecuente condensación de la cromatina en el núcleo; así mismo, la caspasa-3 puede modificar la estructura del citoesqueleto y generar la degradación celular en cuerpos apoptóticos³⁵. En casos patológicos como el cáncer se presenta una sobreexpresión de las proteínas antiapoptóticas ocasionando la resistencia a los tratamientos inductores de vías apoptóticas³⁶.

2.7 Mitocondria

La mitocondria es un organelo que se encuentra en la mayoría de las células (a excepción de los hematíes) y en todas las zonas del citoplasma, este organelo dispone de un ADN propio lo que le permite realizar su división independiente a la del resto de la célula. Su función primaria es la producción de ATP, además participa en el metabolismo de ácidos grasos mediante la β -oxidación, y sirve como almacén de calcio³⁷. Se ha relacionado a las mitocondrias con la apoptosis, diferenciación celular y enfermedades como cáncer, Alzheimer, Parkinson y diabetes³⁸.

Este organelo citoplásmico se compone de una matriz rodeada de una doble membrana, separada por un espacio intermembranal. La membrana mitocondrial interna (MMI) presenta invaginaciones o crestas, que contienen una multitud de complejos enzimáticos y proteínas que permiten el paso selectivo de metabolitos. Por su parte, la MME carece de crestas y en condiciones fisiológicas, se vuelve permeable al paso de iones y metabolitos con un peso no mayor de los 6 KDa a través del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC)³⁹.

Las mitocondrias cuentan con la capacidad de precipitar el ion calcio (Ca^{2+}) en su interior en forma de fosfatos. Hasta ahora se han descrito tres sistemas de

transportadores que permiten el flujo de este catión en la mitocondria: 1) el uniporter que transporta un ion Ca^{2+} ; 2) el antiporter $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que permite el transporte de 2 iones de Na^+ desde el citoplasma hacia el interior de la mitocondria y al mismo tiempo permite la salida de un ion Ca^{2+} desde el interior de la mitocondria; y 3) el antiporter $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ que permite el flujo del ion Ca^{2+} desde el citoplasma hacia el interior de la mitocondria, al mismo tiempo que se da la salida de 2H^+ de la mitocondria hacia el citoplasma. Cuando se presentan situaciones de tipo patológico, se activa un mecanismo alternativo de salida del Ca^{2+} desde la mitocondria a través del PTPm⁴⁰.

2.8 La mitocondria como un blanco terapéutico

Debido a que la mitocondria se encuentra relacionada con diversos procesos biológicos como la apoptosis, diferenciación celular, generación de ATP y fosforilación oxidativa, ha sido considerada como un blanco terapéutico, lo que ha dado origen a la farmacología mitocondrial enfocada en la búsqueda de tratamientos que involucren este organelo o alguna molécula relacionada⁴¹. Actualmente existen tres estrategias utilizadas por la farmacología mitocondrial; la primera está orientada a la síntesis de moléculas que se acumulan en el interior de la mitocondria de manera selectiva. La segunda, hace uso de moléculas que se unen a proteínas presentes en el interior de la mitocondria. Finalmente, la última estrategia implica la modulación de los procesos fuera de la mitocondria, como el incremento del ion Ca^{2+} en el citoplasma para generar estrés en la célula³⁷. Siguiendo cualquiera de estas estrategias, la vía mitocondrial resulta una excelente apuesta para la intervención farmacológica, adicionalmente en años recientes se ha observado que los mecanismos que regulan la apoptosis y diferenciación celular están relacionados con la activación del PTPm⁴².

2.9 Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial

Es una estructura que permite el paso no selectivo de moléculas con un tamaño menor a 150 KDa al interior y exterior de la mitocondria, la apertura de esta estructura provoca una despolarización en la célula causada por el paso indiscriminado de Ca^{2+} tanto al interior como al exterior de la mitocondria, lo que genera desde una disminución hasta un cese definitivo en la síntesis de ATP⁴³. De mantenerse el desequilibrio osmótico entre la matriz y el medio circundante, puede producirse la inflamación de la mitocondria llevando a la ruptura de la MME, lo que permitirá la liberación de moléculas proapoptóticas como ERO's, Ca^{2+} y cit C(citocromo C)⁴⁴.

A lo largo de los años se ha debatido sobre los componentes estructurales y regulatorios del PTPm, teniendo una primera aproximación conocida como "teoría clásica", en la cual los componentes esenciales del PTPm son moléculas estructurales como el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) en la MMI y VDAC en la MME. Estas moléculas son activadas por proteínas reguladoras tales como el receptor periférico de benzodiazepina (PBR), Hexocinasa (HK), ciclofilina D (CypD) y proteínas de la familia Bcl-2 como Bax y Bcl-2 (Fig. 5)⁴⁵.

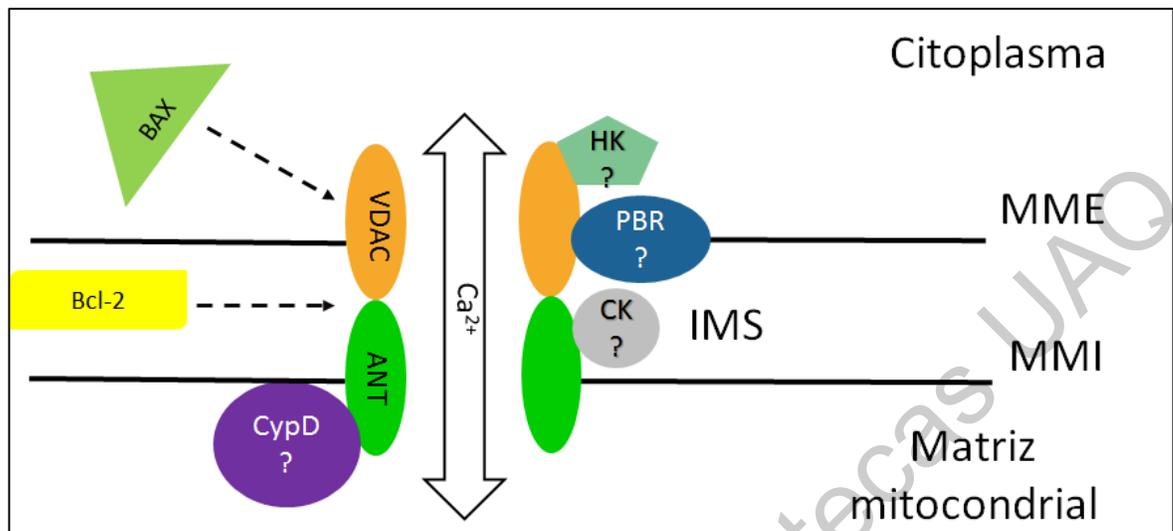


Figura 5. Estructura general del PTPm. El PTPm está formado por el complejo VDAC-ANT-CypD, que permite la comunicación desde el exterior hacia el interior de la mitocondria y viceversa. La hexocinasa (HK), la creatina cinasa mitocondrial (CK), el receptor periférico de benzodiazepina (PBR) y los miembros de la familia Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL y Bax) se incluyen como componentes reguladores putativos⁹.

Sin embargo, se ha concluido que la teoría clásica no explica por completo la estructura y mecanismo del PTPm durante la apoptosis, teniendo como evidencia modelos *knockout* de ratón para ANT donde se observó la funcionalidad del PTPm, presentando concentraciones de Ca^{2+} superiores a las de los ratones *wild type*, demostrando que ANT posee un papel regulador del PTPm mas no uno estructural⁴⁶. Con base en esta información se generó una segunda teoría, en la cual se proponen como componentes esenciales del PTPm a las moléculas accesorias Bcl-2, Bax y CypD, además de la enzima ATP sintasa, es decir, aquellas que no forman parte de la estructura de la doble membrana mitocondrial⁹.

2.10 Regulación de la actividad del PTPm

Diversos elementos están relacionados con la actividad del PTPm (Tabla 2), donde destacan el Ca^{2+} , las ERO's y algunos miembros de la familia de proteínas Bcl-2 (Bax, Bak y Bcl-2)³⁹. Las ERO's y el Ca^{2+} son los mejores marcadores para evaluar la apertura o cierre del PTPm, debido a que la exposición de las mitocondrias a

especies reactivas de oxígeno dispara la formación del PTPm mediante la eliminación de la especificidad de ANT y la modulación positiva de su unión a CypD, para que ésta entre a formar parte del PTPm⁴⁷.

El Ca^{2+} llega hasta el interior de la mitocondria mediante el uniportador de calcio ante estímulos apoptóticos, así como la necesidad de un gradiente de electrones para alimentar la fosforilación oxidativa⁴⁸. El proceso de captación y retención de calcio debe estar sumamente regulado debido a que un exceso de este catión ocasiona pérdidas energéticas, que pueden comprometer la viabilidad celular por la liberación de factores proapoptótico (cit C, ERO's)⁴⁹. Es así que en condiciones donde el Ca^{2+} intracelular es demasiado elevado ($>30 \mu\text{M}$) de manera sostenida y no se puede liberar por los mecanismos convencionales (canales de calcio), se da la formación del PTPm para contrarrestar la alta concentración intramitocondrial⁴⁰. De tal manera que la concentración y flujo de Ca^{2+} se encuentra mediada por la apertura o cierre del PTPm (Fig. 6). La capacidad de retención de Ca^{2+} (CRC) representa una prueba funcional para la evaluación cuantitativa de la sensibilidad de la apertura del PTPm debido a la sobrecarga de Ca^{2+} ²⁷.

Las proteínas proapoptóticas Bax y Bak, se han relacionado con una modulación en la apertura del PTPm, debido a que inducen la liberación de cit C. Ambas proteínas inducen esta liberación por mecanismos diferentes; Bax requiere la presencia de ANT induciendo una caída en el $\Delta\psi\text{m}$ de -40 mV a 15 mV , mientras que Bak requiere de la unión a VDAC para permeabilizar la MME y dar paso a la liberación del cit C para iniciar así la apoptosis⁴¹. Cabe resaltar que los miembros de esta familia no son proteínas constitutivas, por lo que una alteración en su concentración está asociada a un estado patológico⁵⁰. Por su parte, la proteína Bcl-2 se encuentra relacionada con el PTPm debido a que aumenta la capacidad amortiguadora de Ca^{2+} y la estabilización del $\Delta\psi\text{m}$ (-40 mV) mediante la unión a la MME⁵¹. A pesar de las investigaciones actuales de manipulación génica, los componentes esenciales del PTPm responsable de la apoptosis, permanecen sin identificar, además, no se

debe descartar la idea de que existen diversas estructuras con componentes alternativos en función de las condiciones y el tipo celular.

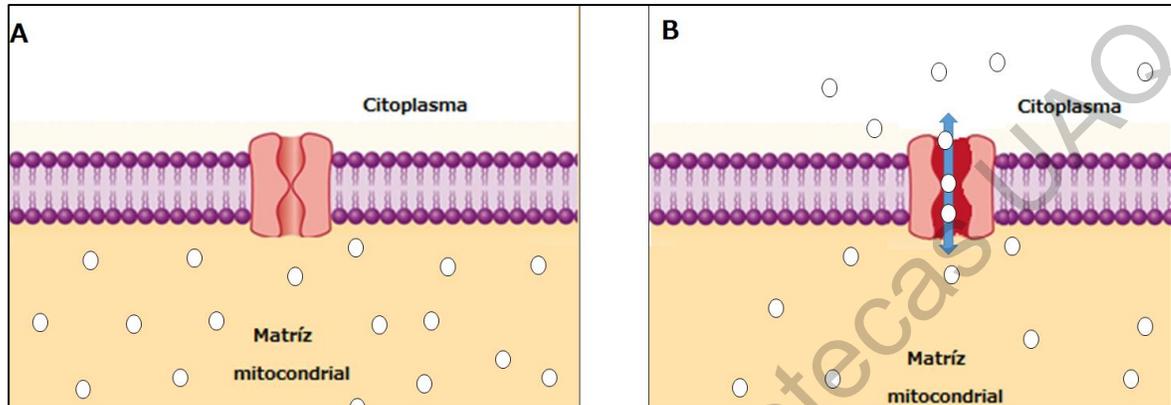


Figura 6. Estado de apertura y cierre del PTPm. (A) El PTPm se encuentra cerrado ante la falta de estímulos proapoptóticos (traslocación de Bax, generación de estrés oxidativo, hipoxia), ocasionando que el Ca^{2+} sea retenido en el interior de la mitocondria hasta alcanzar una concentración superior a los $30 \mu\text{M}$, lo que dispara la apertura de esta estructura para disminuir dichas concentraciones. (B) Con la apertura del PTPm se da un entrada y salida de moléculas, entre ellas el Ca^{2+} . Este intercambio de moléculas busca estabilizar a la célula para llegar a la homeostasis o activar la vía apoptótica mitocondrial⁵² (Imagen modificada de Hou. 2014).

Tabla 2. Estímulos inductores e inhibidores en la apertura del PTPm.

Inductores	Inhibidores
Bax, Bid, Bad, Bak	Bcl-2, Bcl-X _L
Nur77, GD3, P _i	Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa
Ceramida	GSH, ATP, ADP
Ácidos grasos	Incremento del $\Delta\psi\text{m}$
Incremento de Ca^{2+} intracelular	Ciclosporina A, Ácido bongkérkico, trifluoroperacina, dibucaina, tamoxifeno
Incremento de ERO's	
Disminución de pH	
Disminución del $\Delta\psi\text{m}$	
Proteínas víricas	

(Tabla modificada de Tornero et al., 2002).

3. HIPÓTESIS

El silenciamiento de Bax o Bcl-2 reprimirá la actividad del Poro de Transición de la Permeabilidad Mitocondrial en células de neuroblastoma tratadas con Casiopeína® IIIa.

4. OBJETIVOS

General

Evaluar la actividad del Poro de Transición de la Permeabilidad Mitocondrial después del silenciamiento de Bax o Bcl-2 en células de neuroblastoma tratadas con Casiopeína® IIIa.

Específicos

- Demostrar el silenciamiento de las proteínas Bax o Bcl-2 en las líneas celulares SK-N-SH y 3T3-L1
- Establecer la funcionalidad del PTPm luego de silenciar a Bax
- Establecer la funcionalidad del PTPm posterior al silenciamiento de Bcl-2

5. METODOLOGÍA

Muestra

Línea celular de neuroblastoma humana SK-N-SH y línea celular de fibroblastos de ratón 3T3-L1, los grupos estarán divididos de acuerdo con la Tabla 3.

Tabla 3. División de los grupos de estudio de acuerdo a la condición y tratamiento.

Línea celular	SK-N-SH	3T3-L1
Condición	Tipo Silvestre	Tipo silvestre
	Bax KO	Bax KO
	Bcl-2 KO	Bcl-2 KO
Tratamientos	Control (sin tratamiento)	Control (sin tratamiento)
	Cisplatino	Cisplatino
	Casiopeína IIIa	Casiopeína IIIa

KO (Knockout)

Cultivo celular

En placas de 6 pozos se sembraron 2×10^5 células de la línea celular SK-N-SH (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA) por pozo, en 2ml de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma Chemical), suplementado con 10% de SFB y 1% de *Antibiotic-Antimycotic* (Anti-Anti, Sigma Chemical). Las placas se incubaron a 37°C en incubadora de CO₂ (5%) y humedad constante (35%), hasta alcanzar una confluencia $\geq 80\%$.

Determinación de la CL para ampicilina en células de NB y fibroblastos

Se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular, donde las células fueron cultivadas en condiciones estándar de cultivo en placas de 24 pozos. Posteriormente las células se trataron con concentraciones crecientes (1, 10, 25, 75, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$) de ampicilina por 24 h, teniendo como control negativo células sin tratamiento. Finalmente se realizó la evaluación de la viabilidad celular mediante el ensayo de azul de tripano para obtener la concentración letal (CL), para su uso en la selección de moléculas transfectadas.

Diseño de las secuencias gRNA para CRISPR/Cas9

Se realizó el diseño de las secuencias gRNA mediante el software CHOP-CHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>, consultado el 20 de septiembre del 2018), obteniendo las siguientes secuencias gRNA:

Bax: 5´ ACTCGGAAAAAGACCTCTCG 3´

Bcl-2: 5´ GGAGAACAGGGTACGATAAC 3´

Ambas secuencias se insertaron en el vector comercial de silenciamiento génico (ORIGENE, Maryland, USA).

Silenciamiento de Bax y Bcl-2 mediante CRISPR/Cas9

Veinticuatro horas previas al silenciamiento, se realizó cambio de medio a toda la placa. En un tubo Eppendorf de 2 ml se agregó 1µg del vector *Knockout* gRNA (KN404498, ORIGENE, Maryland, USA) en 250µl de medio Opti-MEM (22600134, *ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos*) mezclando suavemente. Después se agregó 1µg de DNA donador (conteniendo el gen de resistencia a ampicilina), mezclando suavemente. Luego se agregaron 2 µl del reactivo *Lipofectamin* (11668-019, *ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos*), dejando incubar la mezcla durante 15 min a temperatura ambiente. Pasados los 15 min, se agregaron 42 µl de la mezcla a cada pozo y la placa se sometió a agitación. Se incubó por 48 h en condiciones estándar de cultivo, realizando pases cada 3 días durante 3 semanas, para asegurar la integración del DNA donador.

Evaluación del silenciamiento

Las células SK-N-SH y 3T3-L1 que fueron sometidas a transfección, se cultivaron bajo las condiciones previamente descritas y se adicionó su respectiva CL (SK-N-SH ≤ 324.33 µg/ml y 3T3-L1 ≤ 260.03 µg/ml) de ampicilina, para la selección de células transfectadas. El rendimiento de la transfección se determinó mediante el

número total de células en medio selectivo sobre el número de células iniciales multiplicado por 100.

Tratamientos

Las células de NB fueron tratadas con 37 $\mu\text{g/ml}$ de cisplatino y 31 $\mu\text{g/ml}$ de CasIIIa por triplicado⁶. Para el caso de las células 3T3-L1 se determinó la CL_{50} para CasIIIa y cisplatino mediante una curva dosis-respuesta, donde se evaluó la viabilidad celular con el ensayo de azul de tripano.

Evaluación de ERO's

En placas de 96 pozos se cultivaron 2×10^4 células de ambas líneas celulares con y sin silenciamiento, bajo las condiciones previamente descritas. Posteriormente se lavaron con tampón de fosfato salino (PBS) 1X, y se determinó la concentración de O_2^- mediante el reactivo MitoSox™ (No. de catálogo M36008, *ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos*) incubando por 10 min. El H_2O_2 se determinó mediante AmplexRed® (No. de catálogo A12222, *ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos*) en ausencia de luz a 37°C, por 30 min. En ambos casos los productos de oxidación se detectaron mediante fluorescencia, de acuerdo a las siguientes condiciones Ex/Em 510/580 nm para MitoSox™ y Ex/Em 530/590 nm para AmplexRed®. Expresando los resultados como URF (Unidades relativas de fluorescencia).

Evaluación de caspasa-3

Las células de cada grupo se cultivaron en cajas de 60 mm en condiciones estándar de cultivo y posteriormente se lavaron con PBS helado suplementado con el cóctel inhibidor de proteasas. La suspensión de células se sometió a lisis mecánica mediante sonicador por 10 min. Los lisados se centrifugaron a 104 g durante 30 min. Posteriormente, se cargó cada uno de los pozos con el equivalente a 20 μg de la solución de proteínas, después se separó en un gel SDS-PAGE y finalmente se transfirió a una membrana de PVDF (0,2 μm) para identificar la presencia de caspasa-3 mediante un anticuerpo primario de ratón (sc-7272, HRP, Santa cruz

Biotechnology, Dallas, Texas, USA), un anticuerpo secundario cabra anti-ratón para Western blot (1705014, Bio-Rad, California, USA), teniendo como control de carga a la proteína β -tubulina y detectando la proteína mediante quimioluminiscencia.

Evaluación de CRC

Se trabajó con 5×10^3 células para obtener mitocondrias mediante centrifugación diferencial, posteriormente a una placa de 96 pozos se le adicionaron 100 μ l de la solución de mitocondrias por pozo, seguido de 100 μ l del reactivo Fura-2 am (ab120873, *ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos*) y se incubó por 1h y 20 min a temperatura ambiente. Finalmente, la fluorescencia se cuantificó en el lector de placas Varioskan Flash (*ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos*) a una longitud de Ex/Em 340/380 nm, expresando los resultados como URF.

Definición del plan de procesamiento y presentación de la información

Los resultados se expresaron de acuerdo a la media \pm desviación estándar. Todas las determinaciones correspondieron a tres réplicas de experimentos independientes y las diferencias entre los grupos se evaluaron por medio del análisis de varianza (ANOVA) donde la significancia fue de $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó mediante el software PRISM GraphPad v7.0.0.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diseño de secuencias gRNA para el silenciamiento génico

De acuerdo con el análisis bioinformático realizado, las secuencias utilizadas fueron las óptimas para lograr el silenciamiento, ya que ambas cumplieron los criterios de diseño establecidos por Mohr et al., (2016), presentando una longitud entre 17-24 nucleótidos, 40-80% de G, C, además de no poseer auto-complementariedad. Para optimizar el proceso de transfección se obtuvieron vectores *Knockout* con el proveedor ORIGENE; estos vectores cuentan con las secuencias gRNA antes mencionadas, y además contienen un marcador de selección de resistencia a la ampicilina.

Ensayo de la viabilidad celular con ampicilina en células SK-N-SH y 3T3-L1

Para evaluar si la transfección fue exitosa, se requería la selección en medio selectivo (medio con ampicilina), por lo que se determinó la CL para ampicilina, obteniendo los siguientes resultados: $324.33 \pm 1.43 \mu\text{g/ml}$ para SK-N-SH y $260.03 \pm 2.06 \mu\text{g/ml}$ para 3T3-L1 (Figs. 7 y 8). Debido a que no existen reportes previos sobre el uso de la ampicilina para el tratamiento de NB o sobre los fibroblastos 3T3-L1, no hay un punto de comparación directo salvo las especificaciones de la FDA sobre las dosis recomendadas en Niños: hasta los 14 años de edad de 100-200 mg/kg de peso y Adultos: de 500 mg a 1 g/kg de peso. De acuerdo con estas concentraciones se pudo determinar que las dosis obtenidas para eliminar el 100% de las células en nuestros cultivos, fueron extremadamente altas.

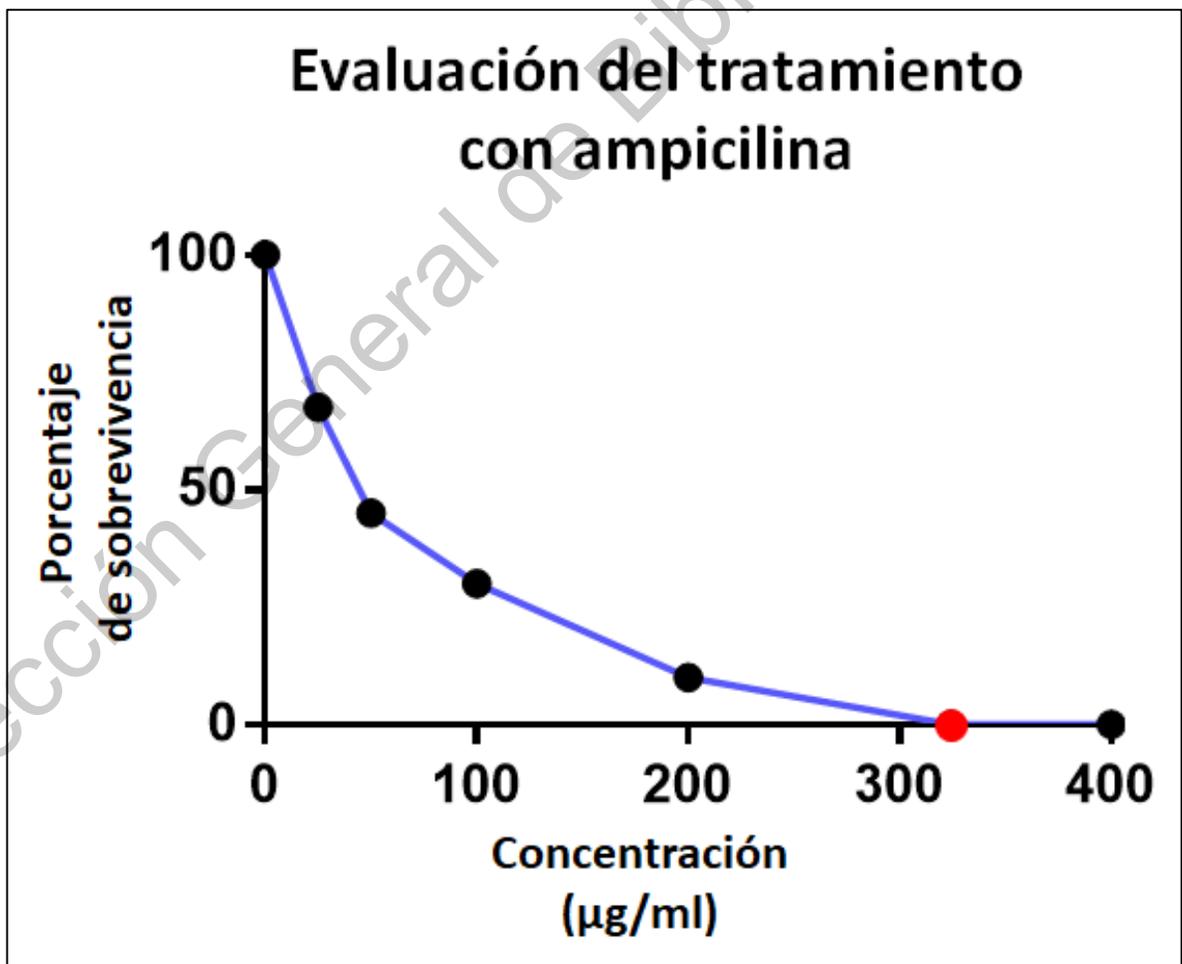


Figura 7. Determinación de la CL en células de NB. Las células SK-N-SH tienen una sobrevivencia

nula a concentraciones $\leq 324.33 \mu\text{g/ml}$ (círculo rojo), este valor rebasa la dosis por kg de peso recomendada por la FDA en niños menores a los 14 años.

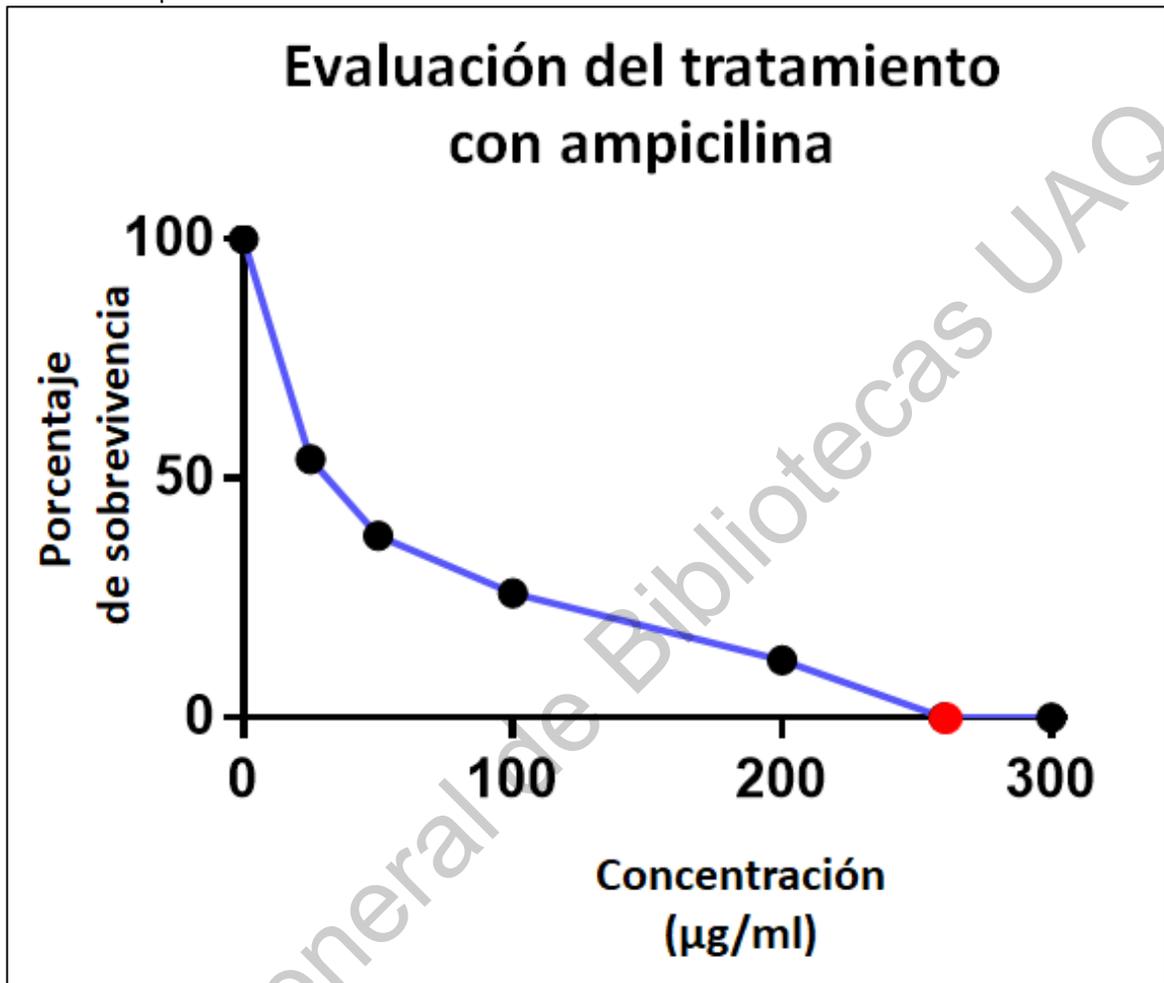


Figura 8. Determinación de la CL en fibroblastos. Las células 3T3-L1 tienen una supervivencia nula a concentraciones $\leq 260.03 \mu\text{g/ml}$ (círculo rojo), este valor rebasa la dosis por kg de peso recomendada por la FDA en niños menores a los 14 años.

Evaluación del silenciamiento génico

Las células de ambas líneas celulares fueron transfectadas de acuerdo a las condiciones especificadas anteriormente en el apartado de metodología, obteniendo rendimientos $>60\%$. Las células silenciadas muestran resistencia a la ampicilina, tal como se observa en las Figuras 9, 10, 11 y 12, además de mantener dicha resistencia hasta 10 pases posteriores a la transfección. De esta manera, queda comprobado que el silenciamiento no compromete la viabilidad de las líneas celulares utilizadas y además permanece a través del tiempo.

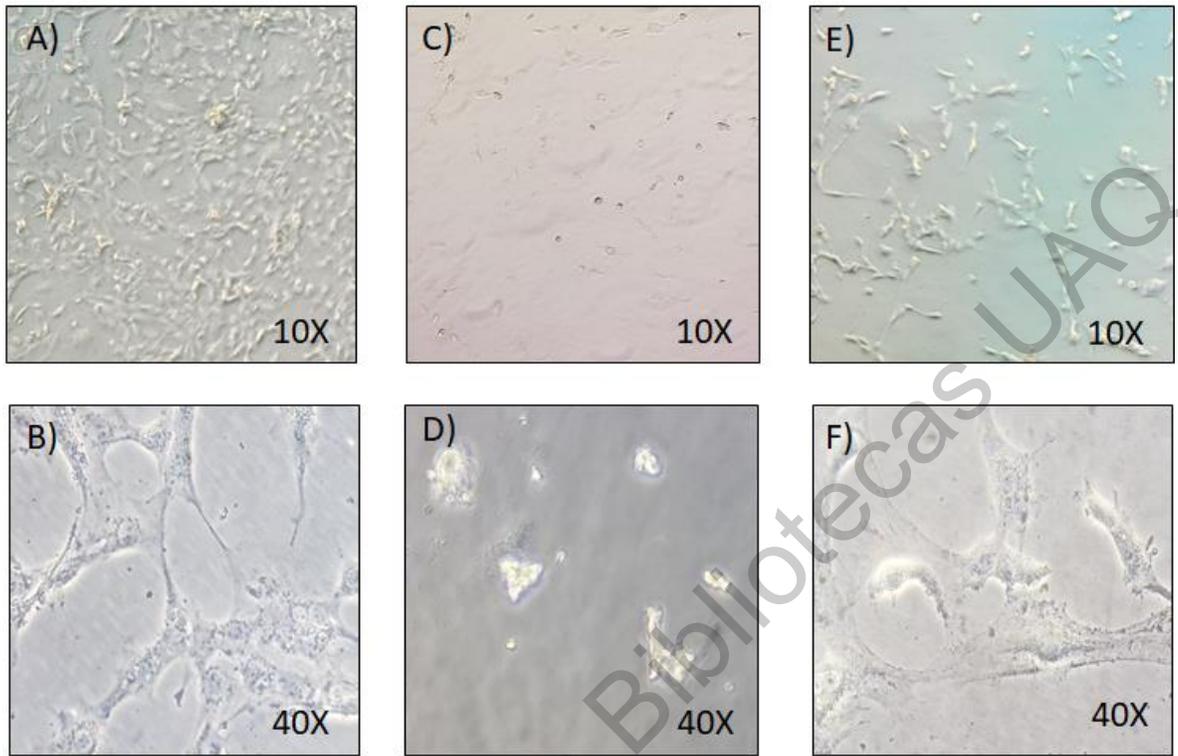


Figura 9. Evaluación del silenciamiento de Bax en células SK-N-SH. A-B) Células control; C-D) Células en medio-selectivo; E-F) Células transfectadas en medio-selectivo con un rendimiento de $73 \pm 4 \%$.

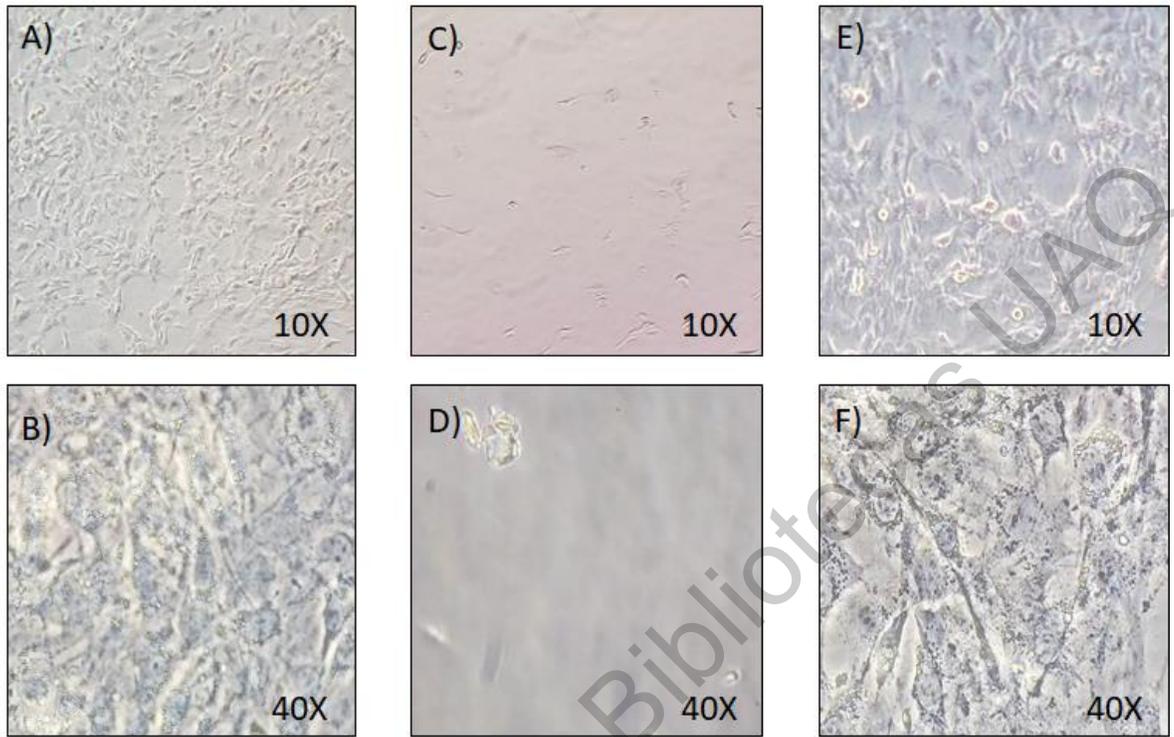


Figura 10. Evaluación del silenciamiento de Bax en células 3T3-L1. A-B) Células control; C-D) Células en medio-selectivo; E-F) Células transfectadas en medio-selectivo con un rendimiento de $78 \pm 5.3 \%$.

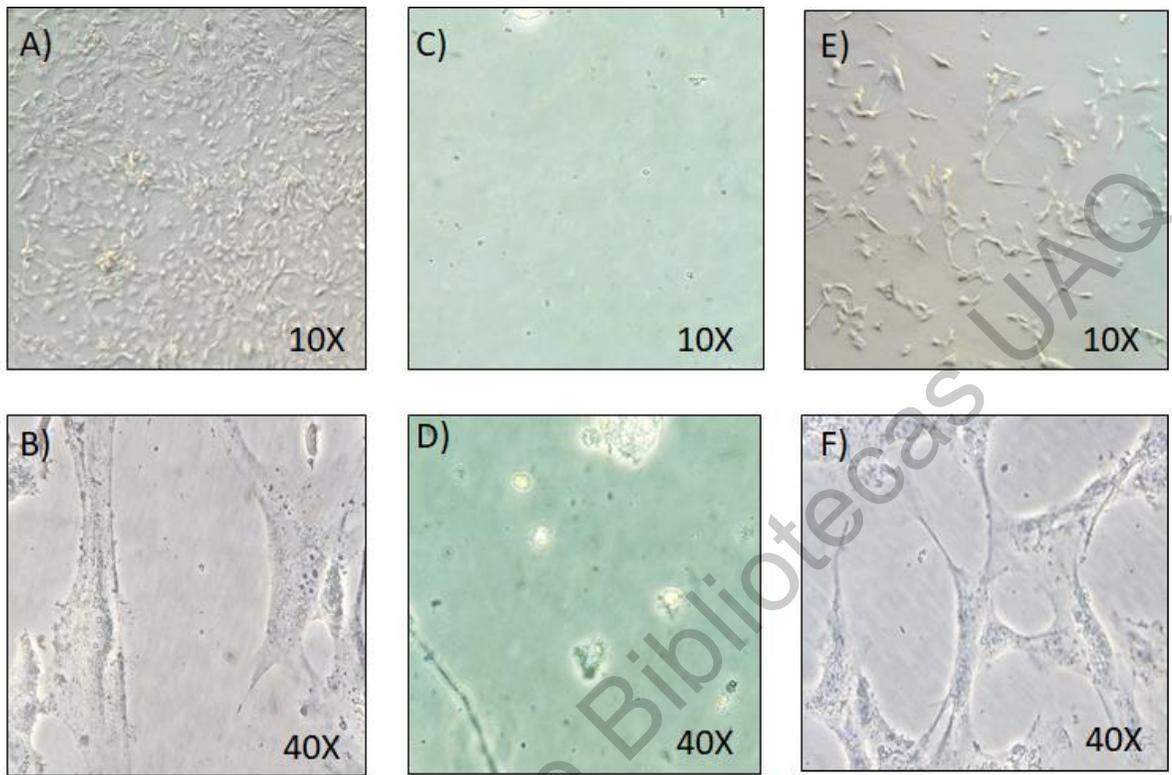


Figura 11. Evaluación del silenciamiento de Bcl-2 en células SK-N-SH. A-B) Células control; C-D) Células en medio-selectivo; E-F) Células transfectadas en medio-selectivo con un rendimiento de $66 \pm 3.6\%$.

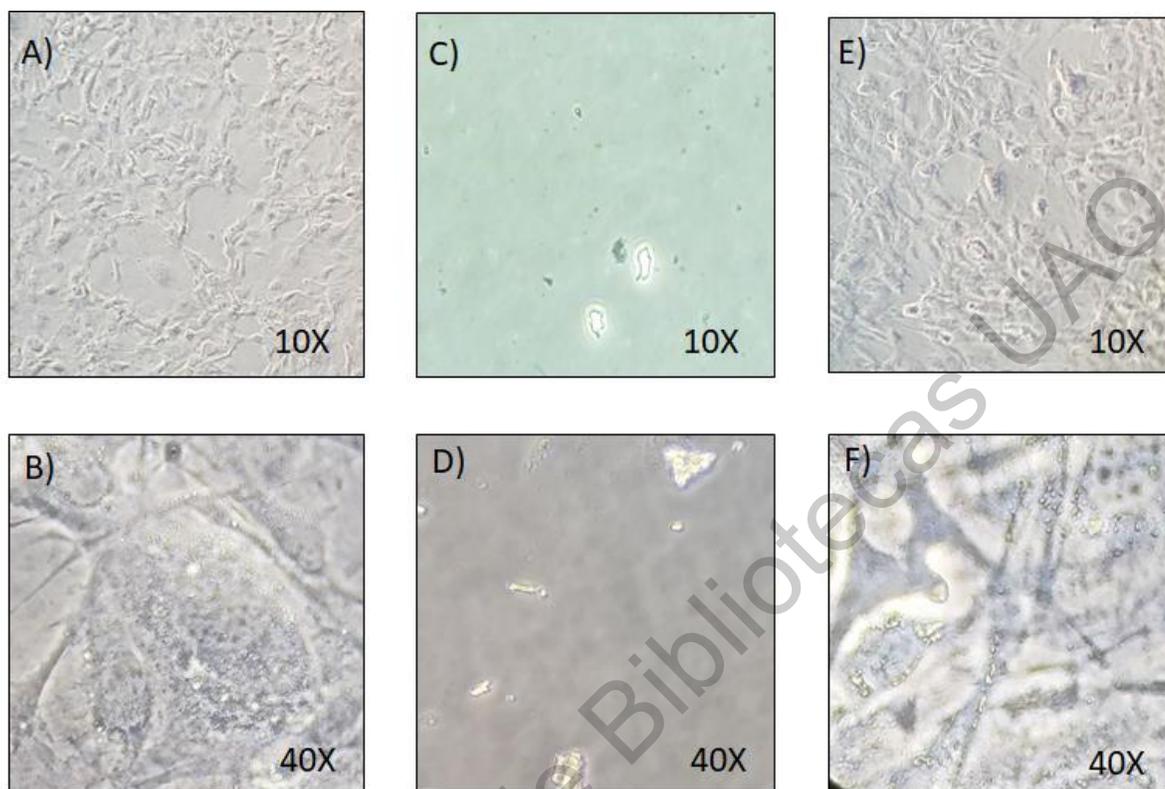


Figura 12. Evaluación del silenciamiento de Bcl-2 en células 3T3-L1. A-B) Células control; C-D) Células en medio-selectivo; E-F) Células transfectadas en medio-selectivo con un rendimiento de $80 \pm 6.6 \%$.

Ensayo de la viabilidad celular con CasIIIa y cisplatino en células 3T3-L1

Debido a que no se contaba con la CL_{50} para fibroblastos tratados con CasIIIa y cisplatino, ésta se determinó mediante una curva dosis-respuesta mediante un ensayo con azul de tripano. Así, obtuvimos una CL_{50} de $66.59 \pm 1.87 \mu\text{g/ml}$ para CasIIIa y $33.66 \pm 1.54 \mu\text{g/ml}$ para cisplatino (Fig. 13). En comparación a lo reportado por García et al., (2017), el valor de la CL_{50} de CasIIIa en fibroblastos es dos veces superior a la CL_{50} para NB ($31 \mu\text{g/ml}$), reiterando la selectividad tumoral de éste compuesto. Sin embargo, la CL_{50} de cisplatino en NB ($37 \mu\text{g/ml}$)⁶, es ligeramente superior a nuestros resultados. Finalmente, con la información obtenida se demostró que la selectividad tumoral de la CasIIIa es independiente de la tasa de proliferación celular.

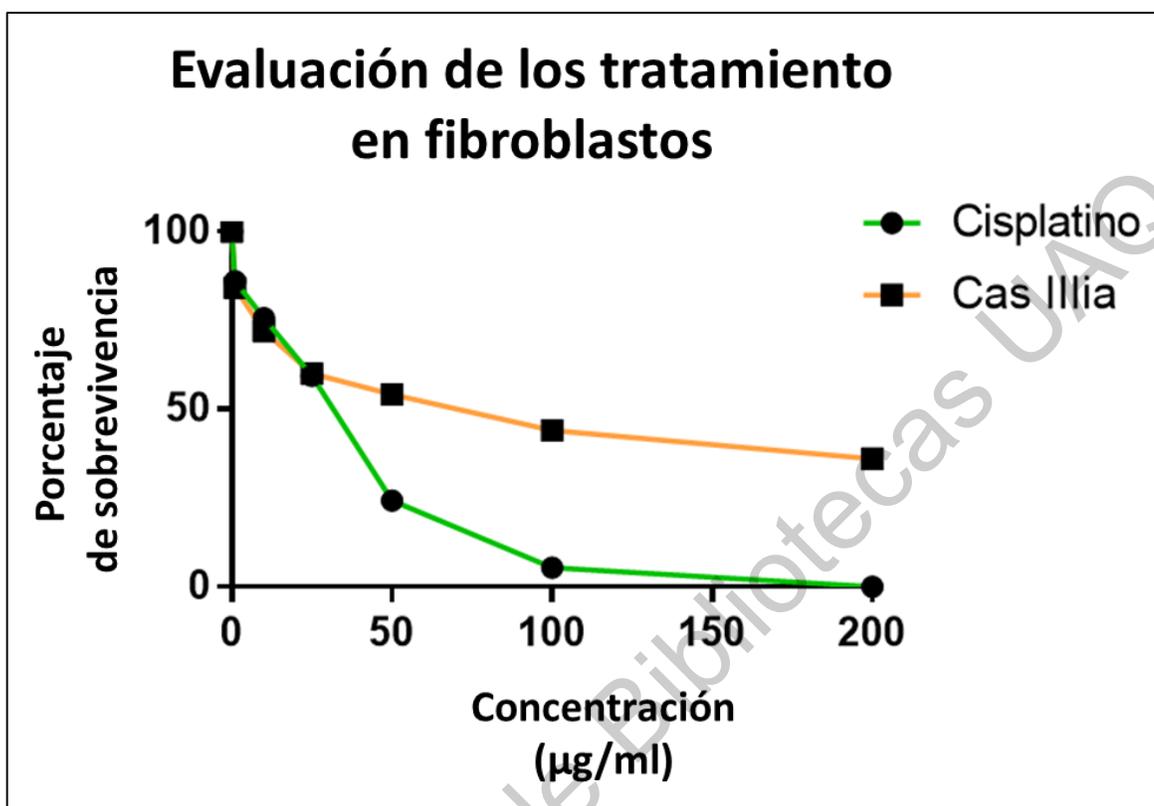


Figura 13. Determinación de la CL_{50} para CasIIIa y cisplatino en fibroblastos. En verde se observa la curva de supervivencia para el tratamiento con Cisplatino y en naranja la curva de supervivencia ante el tratamiento con CasIIIa.

Evaluación de ERO's

En células control el tratamiento con cisplatino incrementó 3 veces la concentración de H_2O_2 , mientras que el tratamiento con CasIIIa lo duplicó. Por su parte, todas las células Bax *KO* permanecieron sin cambio. Mientras que todas las células Bcl-2 *KO*, mostraron un incremento de H_2O_2 similar al grupo no-silenciado (Figs. 14 y 15).

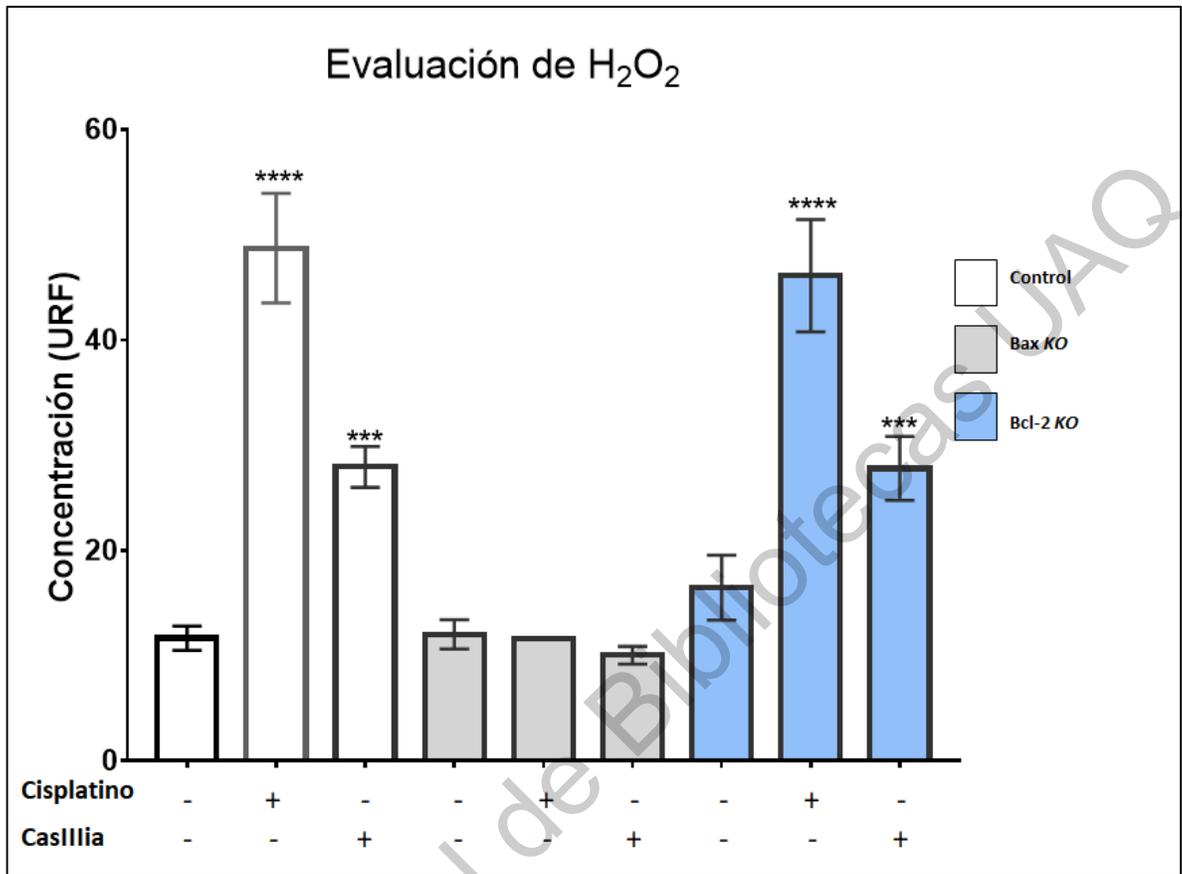


Figura 14. Concentración de H₂O₂ en células de NB, Bax KO y Bcl-2 KO tratadas con cisplatino o CasIIIa (****P<0.01; ***P<0.05).

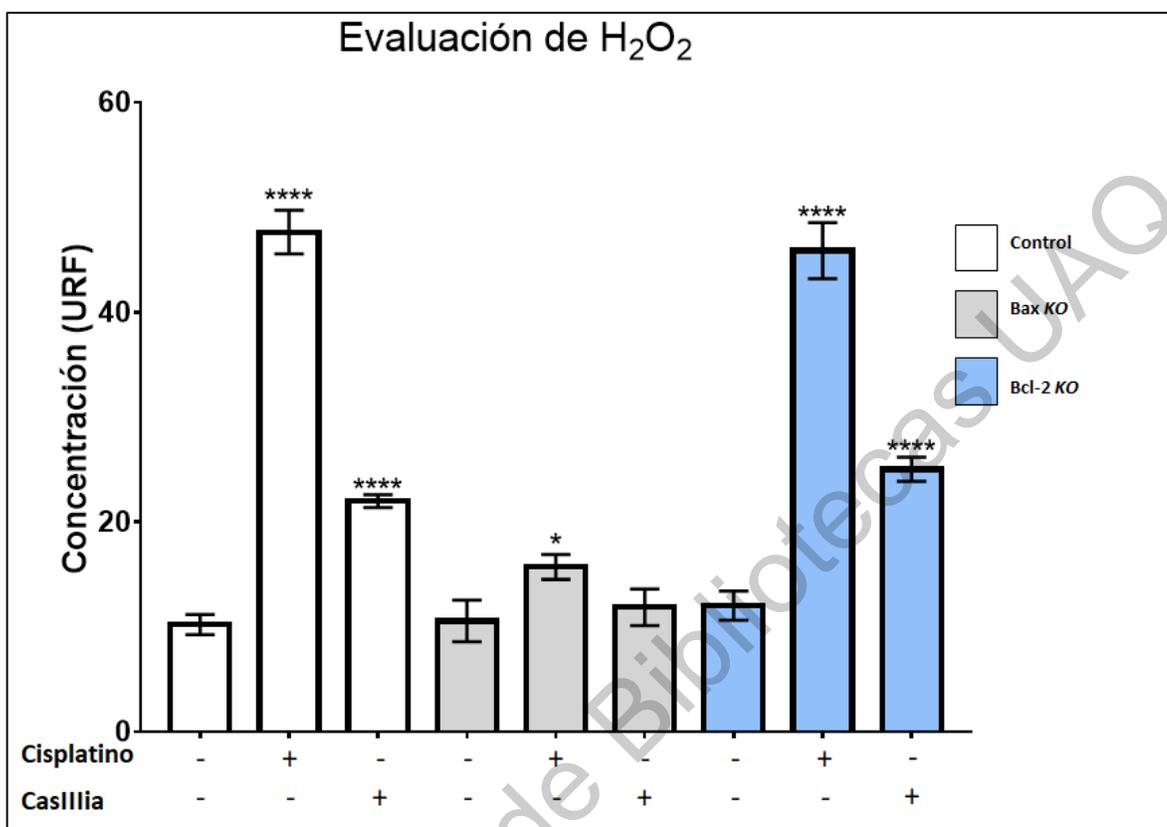


Figura 15. Concentración de H₂O₂ en células 3T3-L1, Bax KO y Bcl-2 KO tratadas con cisplatino o CasIIIa (****P<0.01; *P<0.05).

El tratamiento con cisplatino en células sin silenciamiento y células Bcl-2 KO, mostró mayor incremento de H₂O₂ que el tratamiento con CasIIIa. Este resultado corresponde a lo propuesto por nuestro grupo de trabajo, donde se observó una relación entre el consumo de GSH y las Cas por reacciones de tipo Fenton; es decir, a mayor concentración de H₂O₂ se tiene un mayor consumo de GSH⁸. Sin embargo, hace falta evaluar la concentración de GSH para comprobar esta hipótesis.

En células sin silenciamiento, los tratamientos duplicaron la expresión de O₂⁻ de manera estadísticamente significativa. En tanto que en las células Bax KO la expresión de O₂⁻ no mostró cambios. Finalmente, las células Bcl-2 KO tuvieron un incremento de O₂⁻ de dos y tres veces superior al control cuando fueron tratadas con cisplatino y CasIIIa, respectivamente (Figs. 16 y 17).

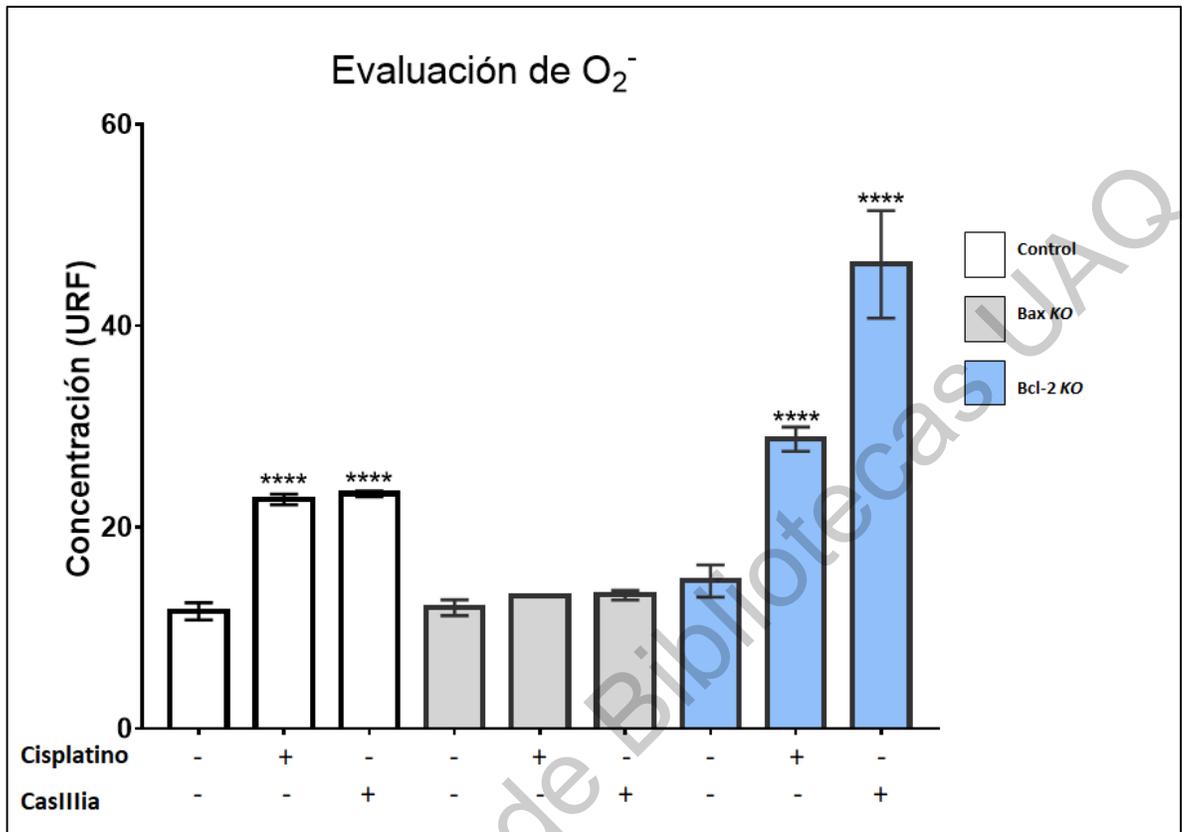


Figura 16. Concentración de O_2^- en células de NB, Bax KO y Bcl-2 KO tratadas con cisplatino o CasIIIa (**** $P < 0.01$).

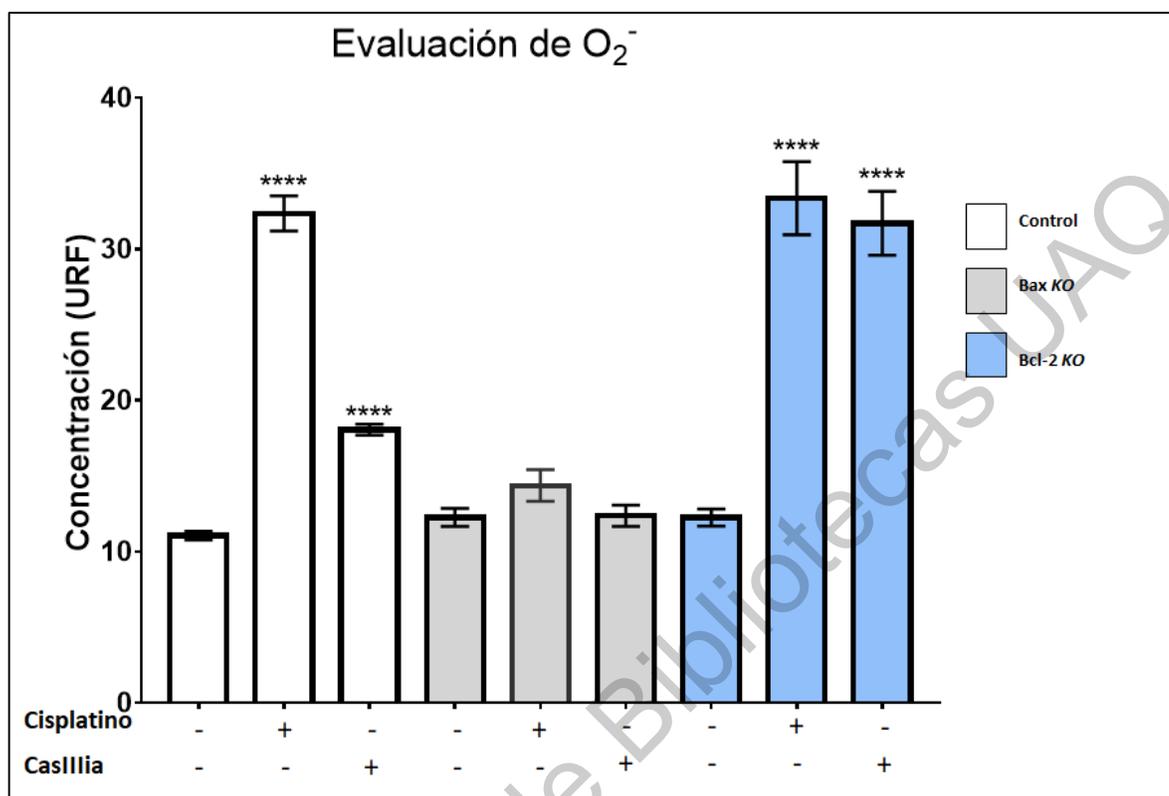


Figura 17. Concentración de O₂⁻ en células 3T3 (****P= <0.01).

Tal y como fue reportado previamente por Kachadourian et al., (2011), el cisplatino es capaz de generar un daño a nivel del DNA mitocondrial a causa del desequilibrio en la expresión de las apoproteínas de la cadena respiratoria, lo que genera una mayor liberación de O₂⁻, en células control tratadas con cisplatino. Rivero-Müller, et al., (2007) demostraron que las Cas inducen un daño a nivel del DNA mitocondrial, lo que nos permite entender el comportamiento observado en la Fig. 17.

Nuestros resultados evidencian una mayor generación de O₂⁻ en las células control tratadas con cisplatino y CasIIIia lo que nos permite inferir que ambos tratamientos inducen un daño a nivel del DNA, el cual es responsable del incremento de O₂⁻. De esta forma se puede demostrar que el incremento de ERO's no está en relación con el tratamiento. Sin embargo, este aumento de O₂⁻ no se presenta en las células que tienen el silenciamiento de Bax, demostrando que ésta proteína es necesaria para la liberación de O₂⁻ a través del PTPm. Por el contrario, el silenciamiento de Bcl-2

presentó un incremento de O_2^- posterior a la aplicación de los tratamientos, demostrando que la ausencia de la proteína Bcl-2 no condiciona su salida. Este comportamiento está dado presumiblemente por la ausencia de la proteína antiapoptótica Bcl-2, tal y como se ha reportado previamente³³.

Detección de caspasa-3

Realizamos un *Western-blot* para corroborar la inducción de la apoptosis posterior a los tratamientos. El análisis en células de NB (Fig. 18) y fibroblastos (Fig 20), reveló que el tratamiento con Cisplatino y CasIIIa inducen la generación de caspasa-3; sin embargo, este comportamiento cambia en las células Bax *KO*, donde se presentó una disminución de caspasa-3 en relación al grupo control. La ausencia de la proteína Bax ocasiona que no se presente un cambio en el $\Delta\psi_m$, tal y como fue reportado en un estudio previo sobre la dinámica de la mitocondria y la generación de proteínas estructurales⁵⁴. En dicho estudio se evaluó la inhibición de proteínas responsables de la dinámica mitocondrial entre ellas Bax, teniendo como resultado que, al inhibir esta proteína, la mitocondria se encuentra rígida por la baja generación de proteínas estructurales que le permitan adaptarse a los cambios de su entorno.

Por otro lado, la casi nula expresión de caspasa-3 observada en los grupos Bax *KO* con tratamientos, se debe a que los mismos requieren de la participación de Bax para inducir apoptosis^{55,56}. Este resultado se reforzó con la evaluación de la viabilidad celular en NB y fibroblastos posterior a los tratamientos (Figs. 19 y 21), demostrando de esta manera que el silenciamiento de Bax tiene un efecto protector contra la apoptosis.

Para el grupo con silenciamiento de Bcl-2, se observó un comportamiento en el cual se induce en las mitocondrias un estado laxo por los múltiples cambios en el $\Delta\psi_m$ que no pueden ser regulados, pero si el proceso se prolonga la célula culmina con la inducción de la apoptosis⁵⁷. Dicho postulado concuerda con nuestros resultados y se tradujo en una mayor generación de caspasa-3 cuando Bcl-2 estaba ausente.

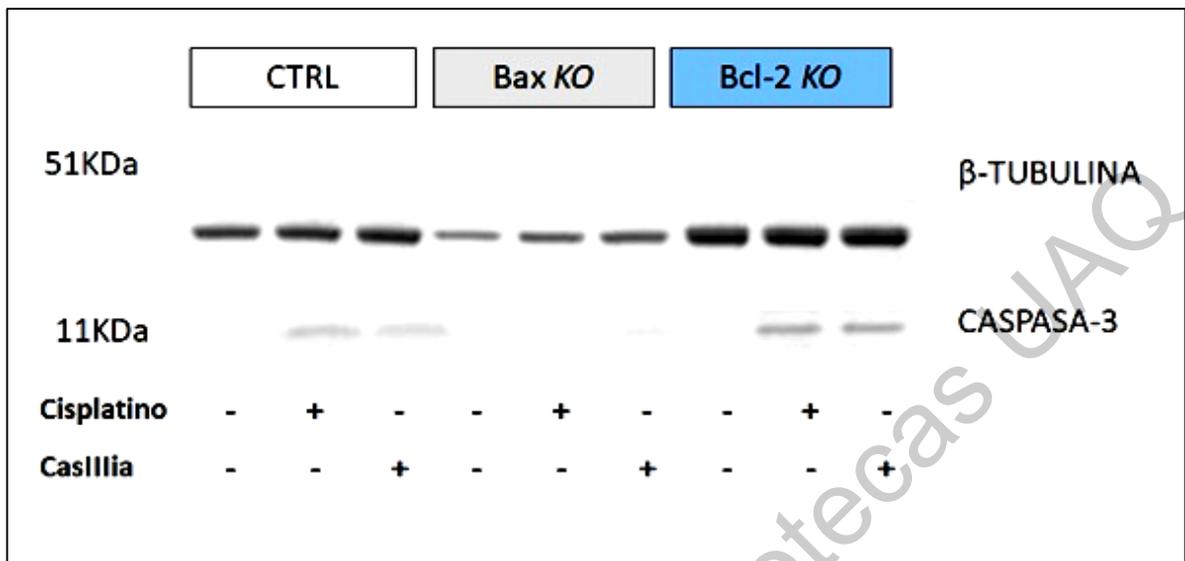


Figura 18. Evaluación de la generación de caspasa-3 en NB. Se observa una reducción en la generación de las proteínas evaluadas en las células Bax KO; mientras que las células Bcl-2 KO presentan un incremento en relación al grupo control.

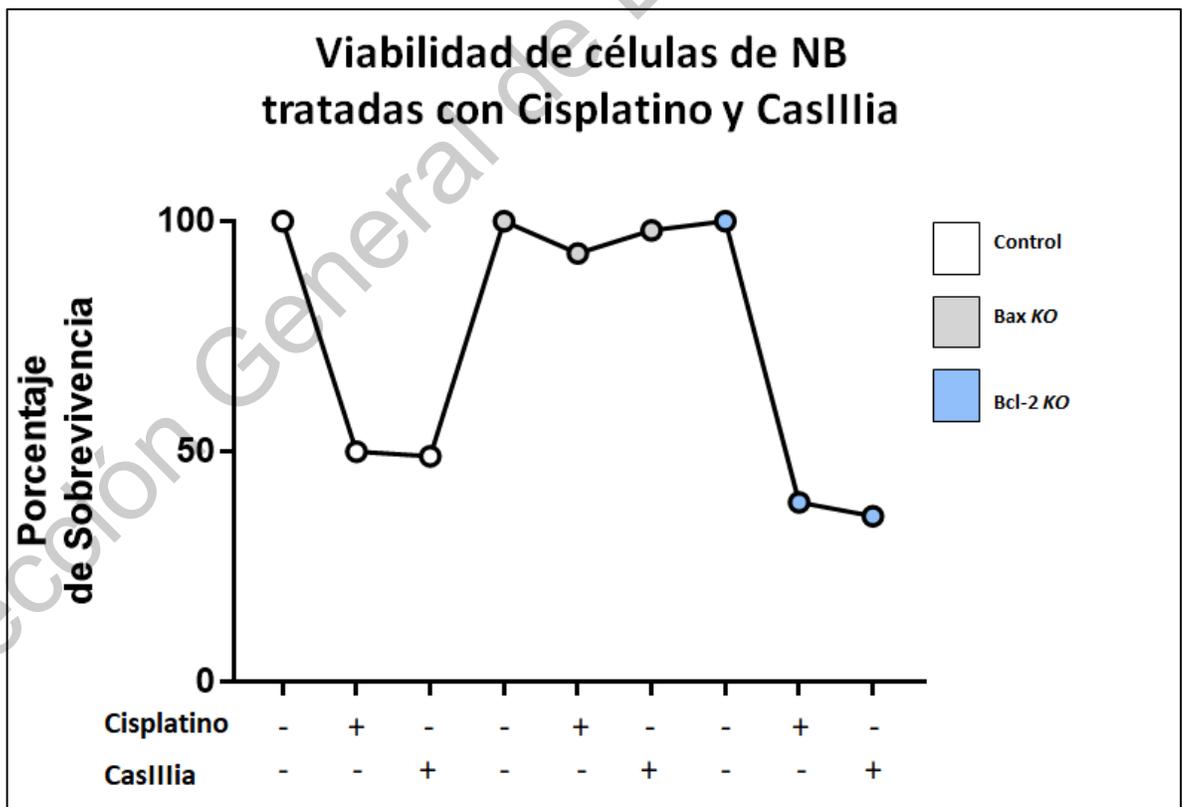


Figura 19. Porcentaje de supervivencia de NB después del tratamiento. Se observa un menor porcentaje de apoptosis en células Bax KO.

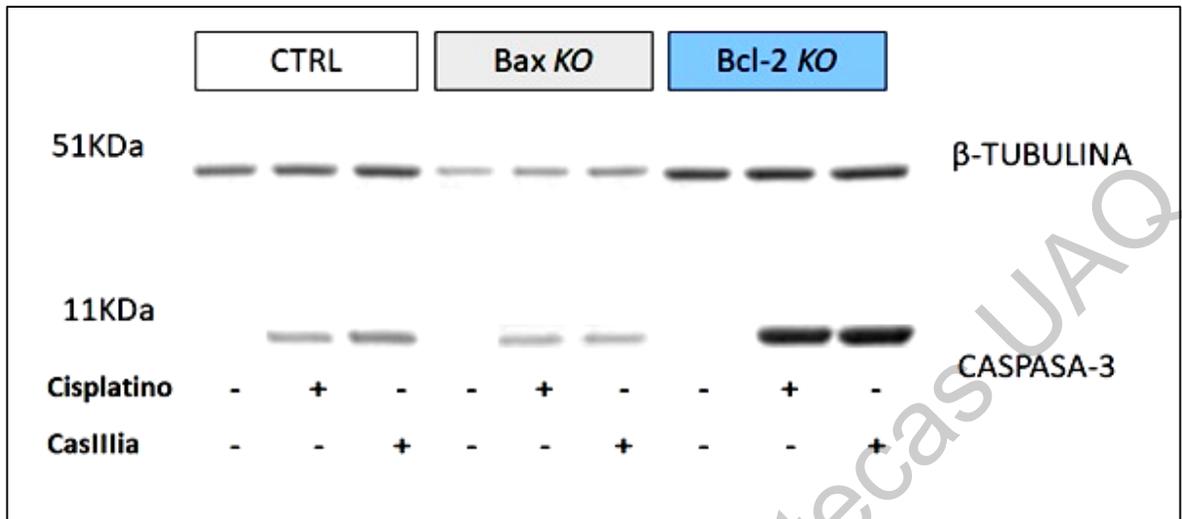


Figura 20. Evaluación de la presencia de caspasa-3 en células 3T3-L1. Se observa un decremento de la presencia de caspasa 3 en las células Bax KO; por otro lado, en las células Bcl-2 KO se presenta un aumento de estas proteínas.

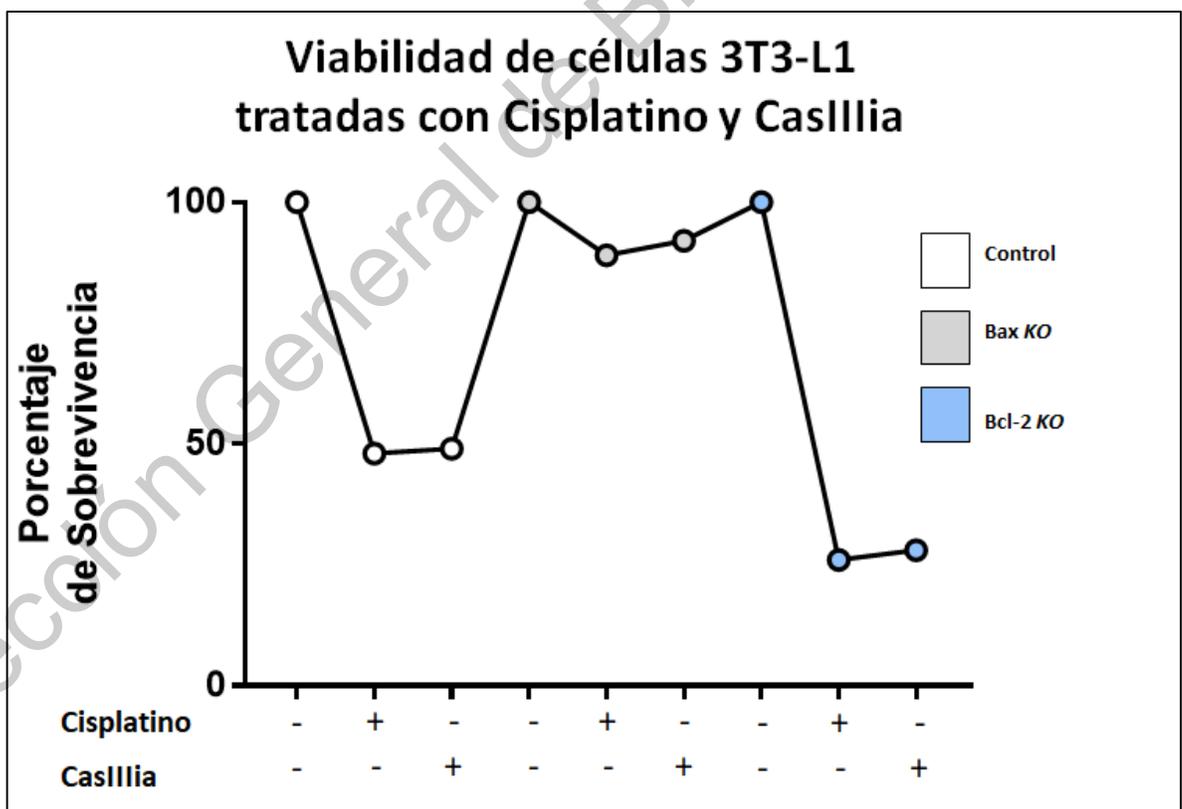


Figura 21. Porcentaje de supervivencia de fibroblastos después del tratamiento. Se observa

un ligero decremento en el porcentaje de apoptosis de las células Bax *KO*, contrariamente a lo observado en las células Bcl-2 *KO*.

Evaluación de la retención de calcio

La evaluación mediante fluorescencia de la retención de calcio, nos proporcionó la siguiente información en células de NB (Fig 22) y fibroblastos (Fig 23). En células control cuando el PTPm se encontraba cerrado por falta de estímulos apoptóticos, tuvo un valor de 1.76 ± 0.06 URF para NB y 1.66 ± 0.04 URF para fibroblastos. Por otro lado, cuando las células de NB o fibroblastos fueron tratadas con su respectiva CL_{50} de cisplatino y CasIIIa, los valores disminuyeron hasta alcanzar una diferencia estadísticamente significativa. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Hou et al. (2014), donde se plantea que ante estímulos inductores de la apoptosis como el aumento de ERO's, el PTPm pasa de un estado basal a uno activo, permitiendo que el calcio y los compuestos proapoptóticos sean liberados al exterior de la mitocondria, de tal forma que los resultados de esta evaluación en conjunto con la apoptosis confirmaron la actividad del PTPm. Además, con los valores de los grupos sin transfección con tratamiento se pudo determinar mediante las URF el momento en el cual el PTPm se encuentra activo.

Para las células Bax *KO* en ambas líneas celulares se presentó un comportamiento similar. Cuando no se aplica cisplatino o CasIIIa la CRC se mantuvo sin diferencia estadística significativa, en cambio cuando se aplicaron los tratamientos, la CRC se incrementó sobre el valor del estado basal. El incremento en la CRC se debe a que al incrementarse la actividad de la fosforilación oxidativa por acción de la producción e ERO's se requiere un flujo constante de electrones, el cual está dado por el gradiente de Ca^{2+} que va desde el exterior de la mitocondria hasta el espacio intramitocondrial mediante el uniporter de calcio, tal y como fue reportado previamente⁴⁸. Con estos datos podemos afirmar que el PTPm dejó de funcionar y por lo tanto, la proteína Bax es esencial en su actividad además de ser necesaria para que se induzca la apoptosis con los tratamientos empleados.

La CRC en las células de NB y fibroblastos con silenciamiento de Bcl-2 se redujo por efecto de los compuestos con centro activo metálico, lo que propició la generación de ERO's ocasionada por reacciones de tipo Fenton⁸. A su vez, el incremento de ERO's indujo el aumento del gradiente de calcio hacia el interior de la mitocondria, ocasionando la apertura del PTPm por un exceso de Ca²⁺ intramitocondrial⁴⁸. Además, se observó un comportamiento muy similar al grupo control con tratamiento, esto es debido en parte a que al vaciar su contenido de Ca²⁺ intramitocondrial, la mitocondria puede regresar a su estado basal.

Finalmente, con todos los resultados presentados en este trabajo podemos confirmar que el PTPm requiere de la presencia de la proteína Bax por su efecto sobre el $\Delta\psi_m$, que a su vez afecta a la propia estructura de la mitocondria; mientras que la proteína Bcl-2 no tiene un verdadero efecto sobre la actividad del PTPm.

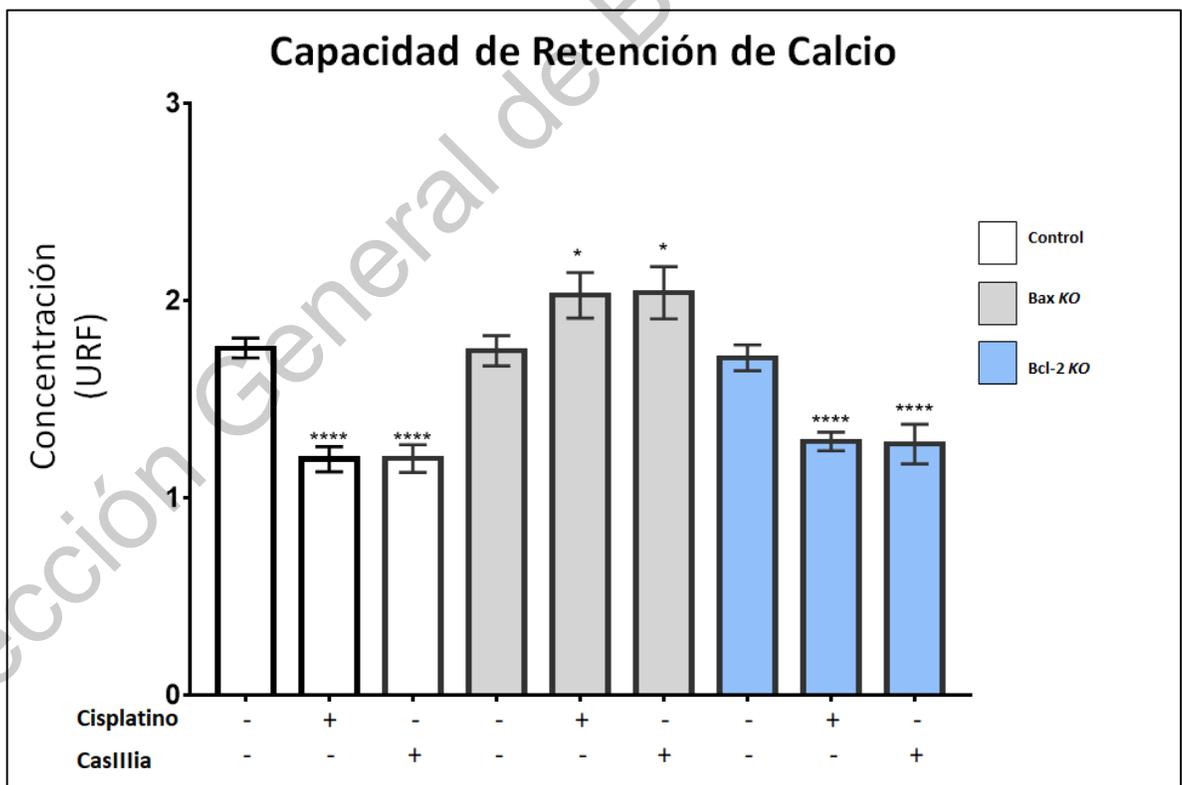


Figura 22. Capacidad de retención de calcio en células de NB. Cuando el PTPm se encuentra en un estado basal, los niveles de la CRC están en 1.76 ± 0.06 . Valores superiores a éste indican

un cierre del PTPm; mientras que, en un estado activo, la CRC presenta valores inferiores (*P<0.001; ****P= <0.0001).

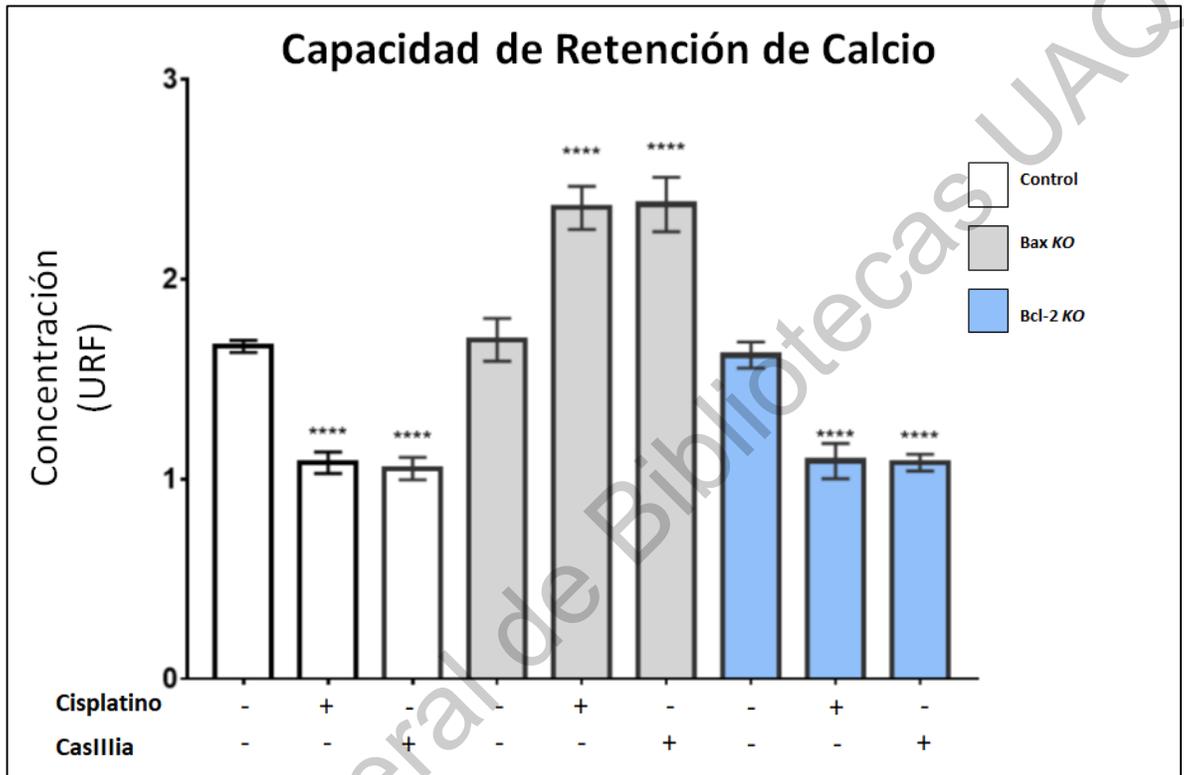


Figura 23. Capacidad de retención de calcio en células 3T3-L1 Cuando el PTPm se encuentra en un estado basal los niveles de la CRC están en 1.6 ± 0.04 . Valores superiores a éste indican un cierre del PTPm; mientras que, en un estado activo, la CRC tiene valores inferiores (****P <0.0001).

7.CONCLUSIONES

El silenciamiento de las proteínas Bax y Bcl-2 no compromete la viabilidad celular de las líneas SK-N-SH y 3T3-L1. Además, se pudo comprobar que el silenciamiento mediante CRISPR/Cas9 se mantiene a través del tiempo con rendimientos superiores al 60%.

La ausencia de la proteína Bax no influye en la generación de las ERO's tanto en células sanas como células tumorales, mientras que la falta de la proteína Bcl-2 incrementa los niveles de ERO's. Si bien se puede inferir con nuestros resultados y estudios previos un daño a nivel del DNA, en nuestras líneas silenciadas hace falta realizar el análisis pertinente para confirmarlo, de igual manera hace falta realizar la evaluación de los niveles de GSH en relación con la concentración de H₂O₂.

El silenciamiento de Bax presenta un efecto protector contra la apoptosis inducida por nuestros tratamientos, de manera lógica también se presenta un mayor nivel de apoptosis cuando se silencia la proteína antiapoptótica Bcl-2.

Cuando se tiene silenciada la proteína Bax el PTPm pierde su estado de actividad y comienza a almacenar moléculas al interior de la mitocondria.

Este trabajo cumplió con el objetivo de evaluar la funcionalidad del PTPm ante la ausencia de Bax y Bcl-2, teniendo como resultado adicional resultados que corroboran el mecanismo de acción del cisplatino y la CasIIIa, además de observar una selectividad tumoral por parte de la CasIIIa independiente de la tasa de proliferación celular.

8 REFERENCIAS

1. Valter, K., Zhivotovsky, B. & Gogvadze, V. Cell death-based treatment of neuroblastoma. *Cell Death Dis.* **9**, 1–15 (2018).
2. Teeara, B. *et al.* The ALKF1174L mutation potentiates the oncogenic activity of MYCN in neuroblastoma. *Cancer Cell* **9**, 973–975 (2012).
3. van Noesel, M. M., Hählen, K., Hakvoort-Cammel, F. G. & Egeler, R. M. Neuroblastoma 4S: a heterogeneous disease with variable risk factors and treatment strategies. *Cancer* **80**, 834–43 (1997).
4. Tolbert, V. P., Coggins, G. E., Maris, J. M. & Maris, J. M. Genetic susceptibility to neuroblastoma. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **42**, 81–90 (2017).
5. Bravo-Gómez, M. E., García-Ramos, J. C., Gracia-Mora, I. & Ruiz-Azuara, L. Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonato)]NO₃ and [Cu(N-N)(glycinato)]NO₃ complexes, (Casiopeínas®). *J. Inorg. Biochem.* **103**, 299–309 (2009).
6. García Ramos, J. C. *et al.* The mitochondrial apoptotic pathway is induced by Cu(II) antineoplastic compounds (Casiopeínas®) in SK-N-SH neuroblastoma cells after short exposure times. *BioMetals* **30**, 43–58 (2017).
7. Marín-Hernández, A. *et al.* Casiopeína II-gly and bromo-pyruvate inhibition of tumor hexokinase, glycolysis, and oxidative phosphorylation. *Arch. Toxicol.* **86**, 753–766 (2012).
8. Kachadourian, R., Brechbuhl, H. M., Ruiz-Azaara, L., Gracia-Mora, I. & Day, B. J. Casiopeína II-gly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. *Natl. Jewish Heal.* **268**, 176–183 (2011).
9. Jonas, E. A., Beutner, G., Mnatsakanyan, N., Alavian, K. N. & Haven, N. Cell death disguised: The mitochondrial permeability transition pore as the c-subunit of the F1 FO ATP synthase Elizabeth. *Pharmacol Res.* **99**, 382–392 (2016).
10. Kholodenko, I. V., Kalinovsky, D. V., Doronin, I. I., Deyev, S. M. & Kholodenko, R. V. Neuroblastoma Origin and Therapeutic Targets for Immunotherapy. *J. Immunol. Res.* **2018**, 1–25 (2018).
11. Shimada, H. *et al.* International Neuroblastoma Pathology Classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: A report from the Children's Cancer Group. *Cancer* **92**, 2451–2461 (2001).
12. Esiashvili, N. Neuroblastoma. *Radiat. Oncol.* **2**, 661–702 (2011).

13. Maris, J. M., Hogarty, M. D., Bagatell, R. & Cohn, S. L. Neuroblastoma. *Lancet* **369**, 2106–20 (2007).
14. Delloye-Bourgeois, C. & Castellani, V. Hijacking of Embryonic Programs by Neural Crest-Derived Neuroblastoma: From Physiological Migration to Metastatic Dissemination. *Front. Mol. Neurosci.* **12**, 1–14 (2019).
15. Vo, K. T. *et al.* Clinical, biologic, and prognostic differences on the basis of primary tumor site in neuroblastoma: A report from the International Neuroblastoma Risk Group project. *J. Clin. Oncol.* **32**, 3169–3176 (2014).
16. Hartl, M. & Schneider, R. A Unique Family of Neuronal Signaling Proteins Implicated in Oncogenesis and Tumor Suppression. *Front. Oncol.* **9**, 1–13 (2019).
17. Tanno, B. *et al.* Expression of slug is regulated by c-Myb and is required for invasion and bone marrow homing of cancer cells of different origin. *J. Biol. Chem.* **285**, 29434–29445 (2010).
18. Faisal, A., Vaughan, L., Bavetsias, V., Sun, C. & Atrash, B. The Aurora kinase inhibitor CCT137690 downregulates MYCN and sensitizes MYCN -amplified neuroblastoma in vivo. *Mol Cancer Ther* **10**, 2115–2123 (2011).
19. Valter, K., Zhivotovsky, B. & Gogvadze, V. Cell death-based treatment of neuroblastoma. *Cell Death Dis.* **9**, 113 (2018).
20. Carreón, M. Caracterización molecular y estructural del poror mitocondrial y su participacion en el tratamiento del neuroblastoma. (2012). doi:10.1109/ICSTW.2011.58
21. Gutierrez, A. G. *et al.* Copper (II) mixed chelate compounds induce apoptosis through reactive oxygen species in neuroblastoma cell line CHP-212. *J. Inorg. Biochem.* **126**, 17–25 (2013).
22. Marín Hernández, A. *et al.* Casiopeina II-gly and bromo-pyruvate inhibition of tumor hexokinase, glycolysis, and oxidative phosphorylation. *Arch. Toxicol.* **86**, 753–766 (2012).
23. Hernández Esquivel, L., Marín Hernández, A., Pavón, N., Carvajal, K. & Moreno Sánchez, R. Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs casiopeinas is related to inhibition of energy metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **212**, 79–88 (2006).
24. Silva-Platas, C. *et al.* Ex Vivo Cardiotoxicity of Antineoplastic Casiopeinas Is Mediated through Energetic Dysfunction and Triggered Mitochondrial-Dependent Apoptosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, 1–13 (2018).
25. Valencia Cruz, A. I. *et al.* Whole Genome Gene Expression Analysis Reveals

- Casiopeína-Induced Apoptosis Pathways. *PLoS One* **8**, (2013).
26. Valko, M., Morris, H. & Cronin, M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* **12**, 1161–208 (2005).
 27. Silva Platas, C. *et al.* Antineoplastic copper coordinated complexes (Casiopeinas) uncouple oxidative phosphorylation and induce mitochondrial permeability transition in cardiac mitochondria and cardiomyocytes. *J. Bioenerg. Biomembr.* **48**, 43–54 (2016).
 28. Espinal Enríquez, J., Hernández Lemus, E., Mejía, C. & Ruiz Azuara, L. Network analysis shows novel molecular mechanisms of action for copper-based chemotherapy. *Front. Physiol.* **6**, 1–13 (2016).
 29. Acikgoz, E., Güler, G., Camlar, M., Oktem, G. & Aktug, H. Glycogen synthase kinase-3 inhibition in glioblastoma multiforme cells induces apoptosis, cell cycle arrest and changing biomolecular structure. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **209**, 150–164 (2018).
 30. Vila, M. & Przedborski, S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 365–375 (2003).
 31. Green, D. R. & Kroemer, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science (80-.)*. **305**, 626–629 (2004).
 32. Azoulay Zohar, H., Iraelson, A., Abu Hamad, S. & Shoshan-Barmatz, V. In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochem. J.* **377**, 347–355 (2004).
 33. Otera, H., Ishihara, N. & Mihara, K. New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1833**, 1256–1268 (2013).
 34. Von Bernhardt, R. Mecanismos de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas: ¿apoptosis o necrosis? *Rev. Chil. Neuropsiquiatr.* **42**, 281–292 (2004).
 35. González, H., Silva, A. S. & Castillo, C. Modulación de la apoptosis por citomegalovirus en la perspectiva del sistema nervioso central. *Rev Chil. Infectol* **33**, 44–54 (2016).
 36. Lindsten, T. *et al.* NIH Public Access. *Mol. Med.* **6**, 1389–1399 (2011).
 37. Luna Ortiz, P., Flores Chávez, P. & Martínez Rosas, M. Las mitocondrias como blanco terapéutico. *Rev. Mex. Anestesiol.* **37**, 278–291 (2014).
 38. Nunnari, J. R. F. and J. Mitochondrial form and function Jonathan. *Nano* **6**,

2166–2171 (2008).

39. Tornero, D., Ceña, V., González-García, C. & Jordán, J. Papel del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial en los procesos neurodegenerativos. *Rev. Neurol.* **35**, 354–361 (2002).
40. Brini, M. & Carafoli, E. The Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase and the Plasma Membrane Sodium Calcium Exchanger Cooperate in the Regulation of Cell Calcium. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, 1–15 (2011).
41. Izzo, V., Bravo-San Pedro, J. M., Sica, V., Kroemer, G. & Galluzzi, L. Mitochondrial Permeability Transition: New Findings and Persisting Uncertainties. *Trends Cell Biol.* **26**, 655–667 (2016).
42. Kwong, J. Q. & Molkentin, J. D. Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart. *Mol. Cardiovasc. Biol.* **21**, 87–92 (2016).
43. Elrod, J. W. & Molkentin, J. D. Physiologic Functions of Cyclophilin D and the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Circ. J.* **77**, 1111–1122 (2013).
44. Bernardi, P., Rasola, A., Forte, M. & Lippe, G. The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology. *Physiol. Rev.* **95**, 1111–1155 (2015).
45. Zorov, D. B. *et al.* Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc. Res.* **83**, 213–225 (2009).
46. Bernardi, P. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? *Front. Physiol.* **4**, 1–12 (2013).
47. Sakurai, K., Stoyanovsky, D. A., Yukio, F. & Cederbaum, A. I. Mitochondrial permeability transition induced by 1-hydroxyethyl radical. *Free Radic Biol Med* **28**, 273–280 (2000).
48. Patron, M. *et al.* MICU1 and MICU2 finely tune the mitochondrial Ca²⁺-uniporter by exerting opposite effects on MCU activity. *Mol. Cell* **53**, 726–737 (2014).
49. Mammucari, C., Raffaello, A., Vecellio Reane, D. & Rizzuto, R. Molecular structure and pathophysiological roles of the Mitochondrial Calcium Uniporter. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1863**, 2457–2464 (2016).
50. Biasutto, L., Azzolini, M., Szabò, I. & Zoratti, M. The mitochondrial permeability transition pore in AD 2016: An update. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1863**, 2515–2530 (2016).

51. Peixoto, P. M. *et al.* MAC inhibitors antagonize the pro-apoptotic effects of tBid and disassemble Bax / Bak oligomers. *J. Bioenerg. Biomembr.* **49**, 65–74 (2017).
52. Hou, Y. *et al.* Permeability Transition Pore-Mediated Mitochondrial Superoxide Flashes Mediate an Early Inhibitory Effect of A β 1–42 on Neural Progenitor Cell Proliferation. *Neurobiol Aging* **17**, 148–159 (2014).
53. Rivero-Müller, A., De Vizcaya-Ruiz, A., Plant, N., Ruiz, L. & Dobrota, M. Mixed chelate copper complex, Casiopeina Ilgly®, binds and degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity. *Chem. Biol. Interact.* **165**, 189–199 (2007).
54. Rinero, R., Reyna, M., Rodriguez, F. & Novak, I. Mitochondrial dynamic, beta-tubulin and extracellular traps in autologous cultures of human leukocytes stimulated with LPS. *J. Immunol. Res.* **86**, 86–99 (2018).
55. Valencia-Cruz, A. I. *et al.* Whole Genome Gene Expression Analysis Reveals Casiopeína-Induced Apoptosis Pathways. *PLoS One* **8**, (2013).
56. Valencia, J. A. UN NUEVO MECANISMO IN VITRO PARA RESTAURAR APOPTOSIS EN CÁNCER DE MAMA RESISTENTE A CISPLATINO. *Av. y Prspectiva* **4**, 10–12 (2019).
57. Yamauchi, W. & Sokic, A. Tubulin: Structure, functions and roles in disease. *Tubulin Struct. Funct. Roles Dis.* **55**, 110–121 (2012).