

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DIRECTA
(MITOCONDRIAL) DEL YODO MOLECULAR Y SU EFECTO
SOBRE CÉLULAS TRONCALES DE NEUROBLASTOMA”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

JAZMIN LIZETH LEÓN PICHARDO

DIRIGIDA POR

Dra. ALICIA IRASEMA MENDIETA TREJO

Santiago de Querétaro, Querétaro, 2022.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de
Información



EVALUACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DIRECTA
(MITOCONDRIAL) DEL YODO MOLECULAR Y SU EFECTO
SOBRE CÉLULAS TRONCALES DE NEUROBLASTOMA

por

Jazmin Lizeth León Pichardo

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: FQLIN-272754-0223-745



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DIRECTA
(MITOCONDRIAL) DEL YODO MOLECULAR Y SU EFECTO
SOBRE CÉLULAS TRONCALES DE NEUROBLASTOMA”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

JAZMIN LIZETH LEÓN PICHARDO

DIRIGIDA POR

Dra. ALICIA IRASEMA MENDIETA TREJO

SINODALES

**Dra. ALICIA IRASEMA MENDIETA TREJO
DIRECTOR**

**Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA
SINODAL**

**Dra. CARMEN YOLANDA ACEVES VELASCO
SINODAL**

**Dra. ROSALIA REYNOSO CAMACHO
SINODAL**

RESUMEN

El neuroblastoma (NB) es una neoplasia infantil de tejido nervioso indiferenciado que ocupa el 15% de las muertes por oncología. Las células troncales cancerosas (CSC) del microambiente tumoral poseen capacidades de autorrenovación, tumorigenicidad, quimiorresistencia e invasividad y pueden estudiarse *in vitro* (neuroesferas). El yodo molecular (I_2) ejerce efectos antineoplásicos induciendo mecanismos antiproliferativos, proapoptóticos y de diferenciación en diversas células cancerosas. Sus mecanismos están asociados a su capacidad oxidante/antioxidante mediante la alteración del potencial de membrana mitocondrial ($Mmp\Psi$), la modulación de proteínas apoptóticas (Bax y Bcl-2) o la activación de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas tipo gamma (PPAR γ). El objetivo del trabajo fue analizar los mecanismos de la vía mitocondrial que promueven los efectos antitumorales de I_2 en CSC de NB. Se utilizaron células SK-N-BE(2) en monocapa (progenitoras) y neuroesferas (CSC) para analizar el efecto de 200 μ M de I_2 durante 48 h. Los resultados mostraron que, aunque en condiciones basales las células progenitoras exhiben un menor $Mmp\Psi$ (699.4 vs CSC 1789.1 RFU), el suplemento de I_2 disminuyó la proliferación en ambos modelos. La respuesta mitocondrial fue diferencial aumentando el $Mmp\Psi$ (MitoTracker red) de las células progenitoras y disminuyéndolo en las CSC (además de la producción de radicales $O_2^{\cdot-}$, MitoSOX), incrementando la apoptosis (índice BAX/BCL-2) y la activación de las vías antioxidantes y autofágicas (expresión de NRF2, PINK1 y LC3). Los niveles génicos del factor inductor de apoptosis (AIF) y SOD2 sólo aumentaron en el modelo progenitor. Esta investigación sugiere que el I_2 induce vías apoptóticas diferenciales dependiendo del estado metabólico de las células.

Este trabajo fue llevado a cabo bajo la dirección de la Dra. Alicia Irasema Mendieta Trejo y realizado en el Laboratorio de Metabolismo Energético perteneciente al Instituto de Neurobiología (UNAM, campus Juriquilla).

Financiado por el Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría 2021 (FOPER-FQU02406) de la Universidad Autónoma de Querétaro, así como del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-202322 y 205920) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las integrantes de mi sínodo, comenzando por la Dra. Laura Cristina Berumen Segura por su asistencia, paciencia y docencia dentro de la UAQ, a la Dra. Rosalía Reynoso Camacho por su enseñanza y revisión, a la Dra. Carmen Yolanda Aceves Velasco por sus sugerencias, comentarios y confianza, y principalmente a la Dra. Irasema Mendieta por creer en mí, por acompañarme durante todo el trayecto, por sus consejos y por hacer esta experiencia mucho más amena. También a la M.S.P. Juana Susana Flores Robles, por su ejemplo de vida y alegría que nos contagia a todos.

Asimismo, agradezco el apoyo de las Dras. Carmen Aceves y Brenda Anguiano Serrano por brindarme un espacio para realizar la presente investigación, a la Dra. Evangelina Delgado González y Laura Inés García del Laboratorio de Metabolismo Energético, a la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos de la Unidad de Microscopía (INB-UNAM) por su apoyo técnico, así como a todos los miembros del laboratorio por sus comentarios constructivos y sugerencias.

Del mismo modo, a mi Alma Máter, la Universidad Autónoma de Querétaro. Estoy agradecida con cada uno de los docentes y compañeros que contribuyeron a mi formación durante todo este camino, a mis profesores del programa de Biotecnología, a los de la preparatoria Plan Guanajuato (UG, San José Iturbide), especialmente a mi maestra de primaria Verónica Andrade Álvarez por sus inolvidables enseñanzas, su amor a la docencia y sus alentadoras palabras; por último, gracias a cada una de las personas que me impulsaron de una u otra manera.

DEDICATORIA

Con mucha alegría, orgullo y amor, dedico este trabajo a todas las personas que han estado conmigo a lo largo de mi crecimiento personal y profesional, principalmente a mis padres, Juan Manuel León Corona y Roseyra Pichardo Medina, gracias por creer en mí y brindarme la oportunidad de estudiar una carrera, mis logros son suyos y siempre voy a estar agradecida por todo su esfuerzo y cariño para convertirme en quien soy ahora. A mis hermanos, Miriam y Kevin León Pichardo, de una forma u otra han sido parte de mi motivación y siempre voy a recordar todas las cosas que han hecho por mí y conmigo, a mi princesa Fryda Zoé Rodríguez por llegar a alegrarnos la vida.

A Jorge Castañeda Sánchez, mi fiel compañero, le agradezco enormemente por siempre estar a mi lado en los momentos malos y buenos, por siempre preocuparse por mí y por formar parte de mi camino en convertirme en mejor persona, a sus papás Angélica Sánchez y Nicolás Castañeda, por ser como segundos padres para mí, por celebrar mis logros y brindarme su apoyo en todo momento.

A Jessica Montes Pérez, por enseñarme el valor de la amistad, por ser incondicional, por sus valiosos consejos y por acompañarme en los momentos importantes de mi vida ¡Lo logramos!

Y sin dejar atrás a toda mi familia Pichardo por creer en mí y por impulsarme a luchar por mis sueños. En especial a mi abuelita Hema Medina Barrera por sus bendiciones, amor inigualable y educación, a mi tía Amparo León Corona por sus apapachos y confianza en mí... y finalmente a mi Tío Javito León Corona que, aunque ya no esté presente, siempre permanecerá en mi corazón. Los amo a todos.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Cáncer	1
1.1.1. Características distintivas del cáncer	1
1.1.1.1. Mantenimiento de la señalización proliferativa	2
1.1.1.2. Evasión de los supresores del crecimiento	3
1.1.1.3. Resistencia a la muerte celular	4
1.1.1.4. Habilitación de la inmortalidad replicativa	4
1.1.1.5. Inducir o acceder a la vasculatura	5
1.1.1.6. Activación de la invasión y metástasis	5
1.1.1.7. Inestabilidad y mutación del genoma	7
1.1.1.8. Reprogramación del metabolismo celular	7
1.1.2. Células troncales cancerosas (CSC)	9
1.2. Neuroblastoma	10
1.2.1. Estadificación del neuroblastoma	11
1.2.1.1 Neuroblastoma de bajo riesgo	11
1.2.1.2 Neuroblastoma de alto riesgo	12
1.2.2 Origen del neuroblastoma	13
1.2.2.1 Neuroesferas	15
1.3. Respuesta antioxidante	15
1.4. Yodo molecular	18
1.4.1. Efectos del yodo molecular en cáncer	19
1.4.2. Mecanismos captación del yodo	20
1.4.2.1. Mediado por receptores PPAR γ (indirecto)	21

1.4.2.2. Mediado por mitocondrias (directo)	21
2. HIPÓTESIS	22
3. OBJETIVOS	23
3.4. General	23
3.5. Específicos	23
4. METODOLOGÍA	24
4.1. Materiales	24
4.1.1. Material biológico	24
4.1.2. Reactivos	24
4.2. Métodos	25
4.2.1. Cultivos celulares	25
4.2.2. Azul tripano	26
4.2.3. Inmunofluorescencia	26
4.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR)	27
4.2.5. Inmunocitoquímica	29
4.3. Manejo de residuos	30
4.4. Análisis estadístico	30
4.5. Diseño experimental	30
5. RESULTADOS	32
5.1. Efecto del I ₂ en la proliferación celular	32
5.2. Expresión de genes relacionados con muerte celular	33
5.3. Efecto del I ₂ en el potencial de membrana mitocondrial	35
5.4. Efecto del I ₂ en especies reactivas de oxígeno	36
5.5. Efecto del I ₂ en la expresión de Nrf2	37
5.6. Expresión de genes implicados en la respuesta antioxidante	40
5.7. Expresión de genes de control mitocondrial y autofagia	40
6. DISCUSIÓN	42
7. CONCLUSIONES	54
8. REFERENCIAS	55
9. ANEXO. Preparación de soluciones	65

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Secuencia y temperaturas de alineación de oligonucleótidos para qPCR	29
2	Agentes naturales como mitocanos	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página	
1	Características distintivas del cáncer	2
2	EMT/MET en la progresión y metástasis del cáncer	6
3	Las células del microambiente tumoral	9
4	Heterogeneidad en el neuroblastoma	11
5	Desarrollo de neuroblastoma a partir de la cresta neural	14
6	Producción de mtROS y activación de Nrf2	17
7	Mecanismo autofágico de mitocondrias mediado por PINK1	18
8	Diseño experimental para este trabajo	31
9	Modelos experimentales de cultivos celulares en monocapa (m) y neuroesferas (n). Micrografías representativas en a) condiciones control y b) al inicio y final del tratamiento (0-120 h) con I ₂ 200 µM. c) Análisis de la proliferación celular mediante conteo con azul tripano.	33
10	Efecto del I ₂ 200 µM en la expresión de transcritos (ARNm) relacionados con la muerte celular: AIF, BCL-2 y BAX en cultivos en monocapa (m) y neuroesferas (n) mediante q-PCR	34
11	Efecto del I ₂ 200 µM en el potencial de membrana mitocondrial (MmpΨ) en cultivos en monocapa (m) y neuroesferas (n) mediante la sonda MitoTracker	35
12	Efecto del I ₂ 200 µM en el contenido de ion superóxido (O ₂ ⁻) en cultivos en monocapa (m) y neuroesferas (n) mediante la sonda MitoSOX	36
13	Efecto del I ₂ 200 µM en la expresión génica y proteica de Nrf2 en cultivos en monocapa (m) y neuroesferas (n) empleando el Ab anti-Nrf2 (fluorescencia amarilla) y localización del núcleo (fluorescencia azul)	38
14	Efecto del I ₂ 200 µM en la traslocación de Nrf2 en cultivos en monocapa (m) y neuroesferas (n) empleando el Ab anti-Nrf2 (fluorescencia amarilla) y localización del núcleo (fluorescencia azul)	39

15	Efecto del I ₂ 200 μM en la expresión de transcritos (ARNm) relacionados con la respuesta antioxidante (SOD2 y CAT) en cultivos en monocapa (m) y neuroesferas (n), mediante q-PCR	40
16	Efecto del I ₂ 200 μM en la expresión de transcritos (ARNm) relacionados con control mitocondrial (PINK1) y autofagia (LC3) en cultivos en monocapa (m) y neuroesferas (n), mediante q-PCR	41
17	Vía de acción del I ₂ directa e indirecta	45
18	Resumen de los mecanismos de acción del I ₂ tratados en este trabajo.	53

ABREVIATURAS

CSC	- Célula troncal cancerosa (Cancer Stem Cell)
CC	- Célula cancerosa
NB	- Neuroblastoma
EMT	- Transición epitelial-mesenquimal
MET	- Transición mesenquimal-epitelial
SK-N-BE(2)	- Línea celular de NB humano con amplificación de MYCN
m-l ₂	- Grupo experimental de células progenitoras en monocapa con I ₂
m-CTRL	- Grupo experimental de células progenitoras en monocapa sin tratamiento
n-l ₂	- Grupo experimental de CSC en neuroesfera con I ₂
n-CTRL	- Grupo experimental de CSC en neuroesfera sin tratamiento
MammoCult	- Medio de cultivo basal para mamosferas y tumoresferas
TAE	- Tampón tris-acetato-EDTA
PBS	- Tampón fosfato salino
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DTT	- Ditiotreitól
DAPI	- Colorante diamidino-2-fenilindol
BSA	- Albúmina de suero bovino
PPAR γ	- Receptores activados por proliferadores de peroxisomas tipo gamma
NRF2	- Factor de transcripción 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2
BAX	- Proteína X asociada a Bcl-2
BCL-2	- Familia de proteínas, B-cell lymphoma 2
PINK1	- Quinasa 1 inducida por PTEN
AIF	- Factor inductor de apoptosis
LC3	- Familia de proteínas ATG8/cadena ligera 3
SOD2	- Superóxido dismutasa mitocondrial
CAT	- Catalasa
°C	- Grados Celsius
μ M	- Micromolar
μ L	- Microlitros
RFU	- Unidades Relativas de Fluorescencia

1. ANTECEDENTES

1.1. Cáncer

El proceso canceroso es el resultado de una función celular alterada debido a la acumulación tanto de múltiples cambios genéticos y epigenéticos, como de aberraciones cromosómicas o moleculares, que conducen a la inestabilidad genética dentro de la célula. Los factores ambientales, exógenos, endógenos, e individuales, como la predisposición genética, también contribuyen al desarrollo del cáncer. El cáncer es la segunda causa de muerte infantil en los países desarrollados (después de los accidentes) y la principal relacionada con enfermedades en niños de 1 a 14 años (Siegel y col., 2018). Los cánceres infantiles, que surgen en el contexto de tejidos en crecimiento activo, son enfermedades que surgen de anomalías en el desarrollo. Exhiben una carga mutacional más baja que los cánceres de adultos, estudios de secuenciación recientes mostraron cambios epigenéticos o translocaciones que generan oncoproteínas de fusión, como EWS-FLI y PAX3-FOXO1 (Filbin y Monje, 2019; Lewandowska y col., 2019).

Las principales características biológicas del cáncer son la proliferación exacerbada, la disminución de la apoptosis, la formación de nuevos vasos sanguíneos, el aumento de la capacidad invasiva y la capacidad de producir tumores secundarios (metástasis). Para ello, las células cancerosas deben sufrir cambios profundos e interconectados que modifican su morfología y función. Estos cambios también son conocidos como características distintivas del cáncer o "*Hallmarks*" (Hanahan y Weinberg, 2000; Wagner y Wagner, 2020).

1.1.1. Características distintivas del cáncer

Según Hanahan y Weinberg en el 2000, los sellos distintivos del cáncer (Figura 1) comprenden seis capacidades biológicas adquiridas durante la carcinogénesis (letras en negro), las cuales incluyen el mantenimiento de la señalización proliferativa, evasión de supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular, habilitación de la inmortalidad replicativa, inducir o acceder a la vasculatura y la activación de la invasión y metástasis. En 2011, se agregaron dos características

emergentes (letras en verde): la reprogramación del metabolismo celular y la evasión de destrucción inmunológica; así como dos características habilitadoras (letras en azul): inestabilidad y mutación del genoma e inflamación promotora de tumores (Hanahan y Weinberg, 2000 y 2011). Además, recientemente se propusieron sellos distintivos y características habilitadoras adicionales (letras en morado) que comprenden: desbloquear la plasticidad fenotípica, reprogramación epigenética no mutacional, microbiomas polimórficos y células senescentes (Hanahan, 2022).



Figura 1. Características distintivas del cáncer. Modificada de Hanahan y Weinberg, 2011; Hanahan, 2022.

1.1.1.1. Mantenimiento de la señalización proliferativa

Las células normales, para pasar de un estado inactivo a un estado proliferativo activo, requieren del suministro de factores que inicien cascadas de señalización mediante receptores transmembranales que se unen a distintas moléculas señalizadoras, como factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular

y moléculas de adhesión o interacción de célula a célula. En contraste, las células cancerosas (CC o tumorales) no necesitan estimulación de señales exógenas para multiplicarse, superando la necesidad de factores de crecimiento externos, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF/EGFR); esta autosuficiencia en la proliferación celular se impulsa a través de tres vías de señalización principales: Akt, MAPK/ERK y mTOR (Hanahan y Weinberg, 2011). Para ello, las CC producen una señalización autócrina ya sea encendiendo permanentemente las vías de señalización que responden a estas señales o interrumpiendo los mecanismos de retroalimentación negativa que atenúan la proliferación excesiva; por ejemplo, las mutaciones con pérdida de función en PTEN amplifican la señalización de PI3K y promueven la tumorigénesis; o las mutaciones oncogénicas que afectan a los genes Ras comprometen la actividad Ras GTPasa, que opera como un mecanismo intrínseco de retroalimentación negativa que asegura que la transmisión de la señal activa sea transitoria. Además, la división celular en células normales está estrictamente controlada, mientras que, en las CC, estos procesos están desregulados debido a que hay una señalización excesivamente elevada por oncoproteínas como RAS, MYC y RAF que puede provocar la senescencia y/o apoptosis celular (Hanahan y Weinberg, 2000; Senga y Grose, 2021).

1.1.1.2. Evasión de los supresores del crecimiento

Para superar la inhibición del crecimiento de las señales homeostáticas normales, las células cancerosas eluden programas que regulan negativamente la proliferación celular, orquestadas por genes supresores de tumores como P53 que regula la división celular, censa el daño o mutaciones del ADN y puede inducir apoptosis a través de la regulación transcripcional, así como el gen APC (Adenomatous polyposis coli) o el homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), que regulan la señalización de Wnt o PI3K-AKT-mTOR, por mencionar algunos. En el cáncer, estas proteínas supresoras de tumores se alteran de manera que no previenen eficazmente la división celular, aunado a que las células cancerosas no tienen inhibición por contacto, por lo que continúan creciendo y dividiéndose, independientemente de su entorno. Debido a esto, las células cancerosas son resistentes a las señales que

impiden el crecimiento, así como a la señalización proapoptótica o proautofágica (Hanahan y Weinberg, 2011; Fouad y Aanei, 2017).

1.1.1.3. Resistencia a la muerte celular

La apoptosis, una forma de muerte celular programada, puede ser activada a través de una vía extrínseca, que inicia con la activación de los receptores de muerte que conducen a la escisión de la caspasa 8 o 10, o una vía intrínseca, que se caracteriza por la despolarización mitocondrial, la liberación del citocromo c de las mitocondrias, la formación del apoptosoma con APAF1 y la caspasa iniciadora 9 seguida de la activación de la caspasa 3 (Carneiro y El-Deiry, 2020). Además, se han descrito otras proteínas apoptógenas que no requieren de caspasas, tal como el factor inductor de apoptosis (AIF), endonucleasa G y smac. AIF es una proteína mitocondrial que media la apoptosis independiente de caspasa después de su translocación al citosol o al núcleo en varias líneas celulares (MCF-7, HepG2, BJAB, Jurkat, entre otros). Cuando el AIF se libera de las mitocondrias en respuesta a estímulos apoptóticos, se convierte en un ejecutor activo de las células al provocar la condensación de cromatina en los núcleos y la fragmentación a gran escala del ADN (Yang y col., 2017).

Las células cancerosas son particularmente capaces de evitar este programa alterando los mecanismos que detectan el daño o las anomalías, generando estímulos intrínsecos, mayor expresión de proteínas antiapoptóticas (Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1, Bcl-2); mediante una regulación a la red de proteínas proapoptóticas (Bax y Bak), mutaciones en P53 y caspasa 8, y/o induciendo alteraciones en la vía de muerte inducida por ligandos extrínsecos (Ligando Fas, TNF α , TRAIL) (Hanahan y Weinberg, 2011).

1.1.1.4. Habilidad de la inmortalidad replicativa

Fisiológicamente, las células tienen un número limitado de divisiones antes de que se vuelvan incapaces de dividirse (senescencia) o mueran (apoptosis). Esto se debe principalmente al ADN al final de los cromosomas, conocido como telómeros; este ADN telomérico se acorta con cada división celular, hasta que se vuelve tan corto

que activa la senescencia, y la célula deja de dividirse. Las células cancerosas eluden esta barrera sintetizando altos niveles de enzima telomerasa (para aumentar la longitud de los telómeros) o mediante un mecanismo basado en la recombinación, resultando en una división ilimitada (Hanahan y Weinberg, 2011). Aproximadamente el 85% de los cánceres regulan positivamente la telomerasa para extender sus telómeros y el 15% restante usa un método llamado alargamiento alternativo de los telómeros. Los objetivos clave incluyen la maquinaria de mantenimiento de telómeros junto con vías de señalización como Wnt e HIPPO (Fouad y Aanei, 2017).

1.1.1.5. Inducir o acceder a la vasculatura

Los tumores se vascularizan mediante la inducción de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) o accediendo a los vasos tisulares normales, con el fin de suministrar oxígeno y nutrientes a las células cancerosas; para ello, las células adquieren la capacidad de producir nueva vasculatura activando inductores angiogénicos. Se sabe que la señalización aberrante de elementos como el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A), factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) promueve la angiogénesis del tumor. Además, participan otras vías de señalización de células endoteliales (por ejemplo, Notch, Neuropilin, Robo y Eph-A/B). La pérdida de p53, que ocurre en la mayoría de los tumores, disminuye los niveles de trombospondina-1, un inhibidor de la angiogénesis (Hanahan y Weinberg, 2011; Hanahan, 2022).

1.1.1.6. Activación de la invasión y metástasis

Otra característica de las células cancerosas es su capacidad para invadir los tejidos cercanos. La metástasis es el proceso por el cual las células cancerosas migran desde el sitio del tumor primario hacia ubicaciones distantes y forman tumores secundarios, que es la principal causa de muerte relacionada con el cáncer. Por otro lado, la transición epitelial-mesenquimal (EMT), permite que las células epiteliales pierdan su capacidad adherente y adquieran un fenotipo mesenquimal ya que los marcadores epiteliales disminuyen (E-cadherina, claudinas, ocludinas) y los marcadores mesenquimatosos aumentan (N-cadherina, vimentina, fibronectina, MMP2/9), haciendo que las células adquirieran la capacidad de migrar. Diferentes

vías de señalización pueden estar involucradas, como Wnt/ β -catenina, factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y Notch (Hanahan y Weinberg, 2011; Babaei y col., 2021). La transición mesenquimal-epitelial (MET) es la reversión de EMT, ocurre de manera fisiológica durante el desarrollo favoreciendo la reprogramación de células madre pluripotentes y en procesos patológicos mediante la formación de nuevos nichos tumorales posterior a la metástasis tumoral (Bakir y col., 2020).

La metástasis (Figura 2), comienza con la invasión local de las células a los tejidos circundantes a través de la inducción de una EMT, bajo la influencia de factores de crecimiento producidos por células tumorales o estromales, seguida de la intravasación a los vasos sanguíneos. Luego de sobrevivir en el entorno hostil del sistema circulatorio, llegan a los órganos distantes, se someten a MET bajo la influencia de células estromales, se adaptan, e inician el crecimiento para formar nichos premetastásicos que posteriormente proliferarán hasta formar un nuevo tumor (Lu y Kang, 2019).

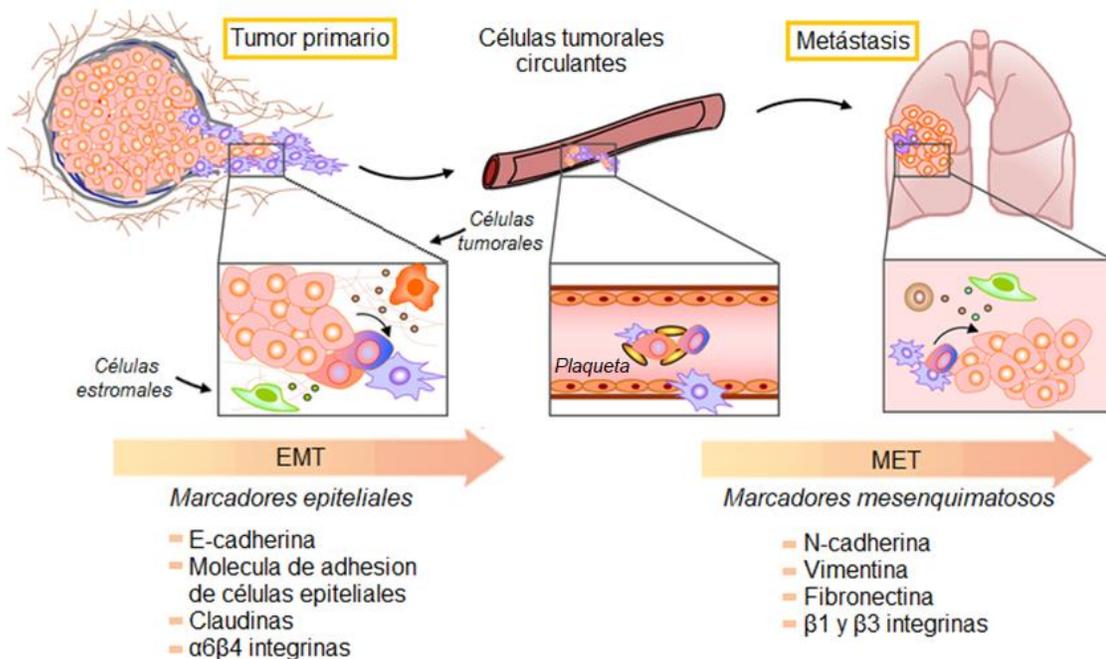


Figura 2. EMT/MET en la progresión y metástasis del cáncer. Modificada de Lu y Kang, 2019.

1.1.1.7. Inestabilidad y mutación del genoma

Las células cancerosas, al ser muy proliferativas, tienen una mayor tendencia a cambios genómicos y mutaciones que afectan la división celular y los genes de supresión de tumores. Los cambios pueden surgir a través de mutaciones directas del ADN o mediante modificaciones epigenéticas que pueden cambiar los niveles de expresión de proteínas y afectar la integridad genómica (Hanahan y Weinberg, 2011; Babaei y col., 2021). Las CC presentan anomalías cromosómicas que empeoran a medida que avanza la enfermedad, las cuales inician la tumorigénesis a partir de mutaciones, por pérdida o ganancia de cromosomas o, lo que parece ser más frecuente, por reorganizaciones a gran escala de los cromosomas, pero una vez que las células comienzan el ciclo de ruptura-fusión-puente (BFB), caracterizado por la aparición de fusiones en los extremos de los cromosomas y su posterior ruptura, pueden mutar a velocidades mucho más rápidas (Umbreit y col., 2020). Las terapias de precisión contra el cáncer se han dirigido a las quinasas de control del ciclo celular, como las proteínas Chk1 y Chk2, y las enzimas reparadoras de daños en el ADN, como BRCA y 53BP1 (Fouad y Aanei, 2017).

1.1.1.8. Reprogramación del metabolismo celular

Debido a su crecimiento excesivo, las células cancerosas tienen una gran demanda energética y de nutrientes por lo que utilizan vías metabólicas alternativas. Las CC poseen un metabolismo glucolítico alterado (glucólisis aeróbica o efecto Warburg), donde aumentan la captación de glucosa y la glucólisis para generar una mayor cantidad de metabolitos glucolíticos intermedios y piruvato. En lugar de oxidar completamente la glucosa para producir la mayor cantidad de ATP posible, el piruvato se desvía hacia la fermentación del ácido láctico en el citosol y evitan que las mitocondrias completen la respiración aeróbica normal (oxidación del piruvato, el del ácido tricarboxílico mitocondrial (TCA) y la Cadena Transportadora de Electrones (ETC). Como resultado del deterioro metabólico de la fosforilación oxidativa (OXPHOS), hay una disminución en la concentración de ATP y esto promueve la desactivación de las mitocondrias. Por otro lado, se disminuyen los niveles de dióxido

de carbono (CO₂) dentro y fuera de la célula y aumenta la alcalosis (Lu y col., 2015; Fang y col., 2019; Schwartz y col., 2017).

La glucólisis puede acentuarse aún más en condiciones hipóxicas para regular al alza los transportadores de glucosa y múltiples enzimas de la vía glucolítica. El aumento de la glucólisis permite la generación de nucleósidos y aminoácidos, que promueve la biosíntesis de las macromoléculas y orgánulos necesarios para el ensamblaje de nuevas células. Las CC dependen de la glucosa como combustible y secretan lactato como residuo ya que, aún en condiciones aeróbicas, el piruvato es desviado del ciclo de Krebs a la producción de lactato y se aumenta el metabolismo de la glutamina para promover la proliferación celular (Hanahan y Weinberg, 2011; Babaei y col., 2021).

Aunque las características distintivas agrupan elementos comunes, es importante tener presente que el cáncer no es una enfermedad única y que la dependencia y las consecuencias de utilizar las vías compartidas son variables entre los diferentes tipos de tumores (Fouad y Aanei, 2017). Además, recientemente Senga y Grose propusieron cuatro nuevas características distintivas del cáncer: desdiferenciación y transdiferenciación, que muestran la capacidad de las células para retroceder de un estado funcional especializado específico; desregulación epigenética que puede afectar la expresión génica; microbioma alterado que describe el papel de los microorganismos y, finalmente, la señalización neuronal alterada (Senga y Grose, 2021).

Anteriormente se creía que un tumor era nada más una colección de células cancerosas homogéneas, y que su biología podría comprenderse explicando sus propiedades autónomas. En 2011, Hanahan y Weinberg destacaron la extensa heterogeneidad celular de los tumores (Figura 3) llamado microambiente tumoral que posee un conjunto de distintos tipos de células reclutadas, que favorecen la adquisición de las características distintivas mediante la creación del microambiente tumoral complejo y contribuye a la progresión del cáncer (Moses y col., 2018). El estudio individual de los tipos de células especializadas participantes, así como del

microambiente que construyen durante el desarrollo de la tumorigénesis han cobrado relevancia desde hace una década (Hanahan y Weinberg, 2011).

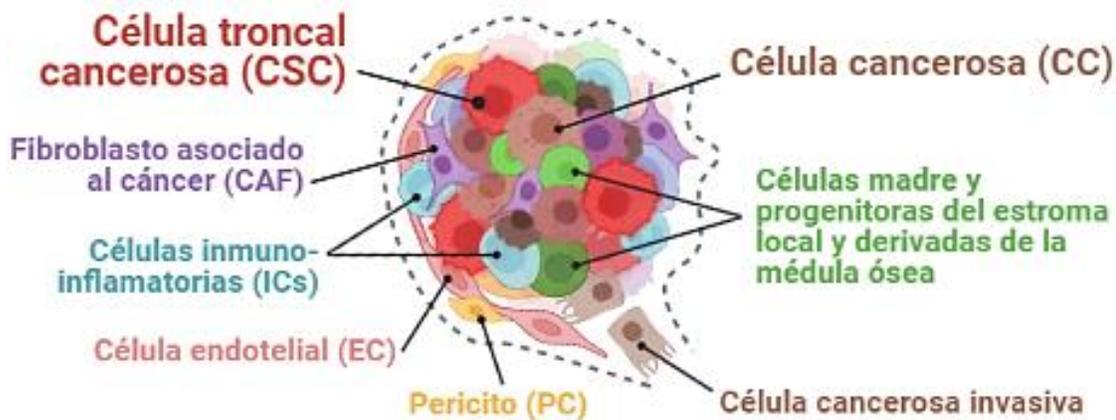


Figura 3. Las células del microambiente tumoral. Imagen modificada de Hanahan y Weinberg, 2011 y creada con BioRender.com.

1.1.2. Células troncales cancerosas (CSC)

Las células troncales cancerosas (CSC, por sus siglas en inglés) son una subpoblación de células cancerosas con capacidad de autorrenovación, tumorigenicidad, pluripotencia, quimiorresistencia, diferenciación, capacidad invasiva y plasticidad, residen en nichos tumorales especializados y son responsables del mantenimiento del tumor, metástasis, resistencia a la terapia y recaída del tumor (Sundar y col., 2014). Las CSC pueden evolucionar a partir de células madre normales (NSC), de tumores primarios, de metástasis con células tumorales diseminadas después de la EMT, de la fusión celular después de la selección posterior y/o de un proceso de retrodiferenciación, entre otros (Melzer y col., 2017).

Posen mecanismos reguladores similares a los de las células madre embrionarias (ESC), por ejemplo, sobreexpresan los factores de transcripción pluripotentes (TF), factor de transcripción de unión a octámero 4 (Oct4), NANOG y la región determinante del sexo Y-box 2 (Sox2), que mantienen la autorrenovación y la pluripotencia. Normalmente, estos TF previenen la división de las ESC en el tipo de célula incorrecto, sin embargo, en las CSC la sobreexpresión de OCT4, NANOG y SOX2 conduce a la inhibición de la apoptosis a través de la modulación de varias

vías de señalización, como la vía Oct4/Tcl1/Akt1 y la vía Sox2/ORAIL/Vía STIM1 (Kharkar, 2020). La expresión de marcadores relacionados con troncalidad por parte de las CSC, similar a las ESC y NSC, es fundamental para la regulación de su troncalidad, por ejemplo, entre los marcadores comunes se identificó la aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1), Bmi-1, CD44, CD133, entre otros (Zhao y col., 2017).

Por otro lado, existe evidencia de que el potencial de membrana mitocondrial (Mmp Ψ), que refleja el estado funcional de la mitocondria, está altamente relacionado con la malignidad del cáncer. Las especies reactivas de oxígeno (ROS), que se producen principalmente en las mitocondrias, también aumentan en muchos tipos de células cancerosas ya que son responsables del mantenimiento del fenotipo del cáncer. Aunque sus niveles en las CSC siguen en debate, ya está bien descrito que las células cancerosas se caracterizan por mayores cantidades de especies reactivas de oxígeno que las células sanas (Zhang y col., 2015).

1.2. Neuroblastoma

El neuroblastoma (NB) es un cáncer embrionario del Sistema Nervioso Periférico indiferenciado y uno de los tumores sólidos extracraneales más comunes en los niños; ocupa el 8% del número total de cánceres infantiles y representa el 15% de las muertes por oncología pediátrica (Pelizzo y col., 2018; CCLG, 2019). Se sabe que el NB exhibe una heterogeneidad significativa tanto en las características patológicas como clínicas (Figura 4), de manera que las tasas de supervivencia son excelentes para pacientes con NB de riesgo bajo e intermedio (75% y 98%) y presentan una tendencia hacia reducir el tratamiento. Por el contrario, esta tasa disminuye más del 50% en alrededor del 40% de los pacientes que presentan NB de alto riesgo, quienes exhiben enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico, por lo que se requieren mejores tratamientos (Vrenken y col., 2020; Zhang y col., 2020).

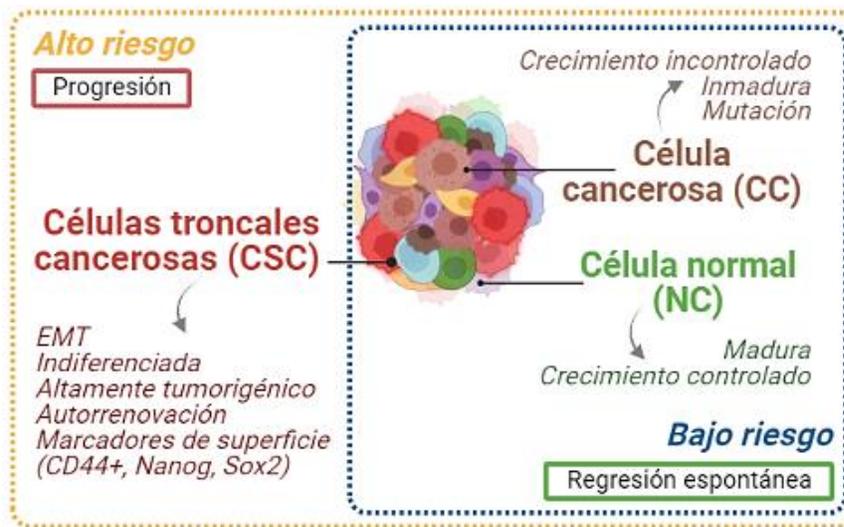


Figura 4. Heterogeneidad en el neuroblastoma. Imagen creada con BioRender.com.

1.2.1. Estadificación del neuroblastoma

La "etapa" de un cáncer formador de tumores, es un término que se utiliza para describir su tamaño y si se ha extendido más allá de su sitio original, y el conocer las etapas ayuda a decidir cuál es el mejor tratamiento para el infante (CCLG, 2019).

El Grupo Internacional de Riesgo de Neuroblastoma (INRG) desarrolló el Sistema Internacional de Estadificación del Grupo de Riesgo de Neuroblastoma (INGSS) para una estadificación antes del tratamiento, mediante análisis de árbol de regresión integral de 8800 pacientes con NB de varias regiones del mundo. Considerando factores como la edad, el grado de diferenciación tumoral, la aberración 11q, amplificación de MYCN, ploidía y clasificación histológica (ganglioneuroma y ganglioneuroblastoma), se propuso la asignación de los pacientes en cuatro grupos principales de pronóstico: riesgo muy bajo, bajo, intermedio y alto (Chung y col., 2021).

1.2.1.1 Neuroblastoma de bajo riesgo

Los niños menores de 18 meses con NB a menudo tienen tumores de "bajo riesgo" y en general su pronóstico es excelente, a menos que haya amplificación de MYCN. Es por ello que, la mayoría de los niños de este grupo de edad, así como quienes presentan la enfermedad en etapa 4S, se curan con tratamientos como resección

quirúrgica, observación, o ninguno. Estos tumores regresan espontáneamente o después de la quimioterapia, que solo se administra si el tumor presenta síntomas, por lo que desaparecen por completo o se convierten en un tumor no canceroso (benigno), llamado ganglioneuroma. Los ganglioneuromas generalmente son inofensivos, no causan problemas y no necesitan ningún tratamiento (CCLG, 2019).

1.2.1.2 Neuroblastoma de alto riesgo

Por otro lado, los pacientes con neuroblastoma de alto riesgo suelen presentar enfermedad metastásica en infantes mayores a 18 meses o un paciente de cualquier edad con enfermedad L2, M o MS. A pesar del tratamiento multimodal intensivo más agresivo que comprende quimioterapia de inducción, resección quirúrgica, quimioterapia de dosis alta con rescate de células madre autólogas (ASCR), radioterapia de haz externo (EBRT) e inmunoterapia o agentes diferenciadores, los pacientes a menudo desarrollan una enfermedad refractaria caracterizada por células resistentes a la terapia poco diferenciadas (Vrenken y col., 2020; Chung y col., 2021). Los tumores más agresivos muestran una amplificación del oncogén MYCN, mutaciones de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK), la inactivación del gen supresor de tumores ATRX, así como aberraciones cromosómicas estructurales (pérdida 1p36, ganancia 17q y pérdida 11q); además, la iniciación y progresión de los tumores malignos está impulsada por distintos conjuntos de células como células troncales cancerosas o iniciadoras de tumores que desarrollan resistencia a la terapia, capacidades de autorrenovación y tumorigénesis (Melzer y col., 2017).

En un esfuerzo por evitar que casi el 50% de los pacientes que recaerían lo hicieran, se agregó el agente diferenciador isotretinoína como una fase adicional de la terapia, asimismo, se ha evidenciado que el tratamiento con ácido todo-trans retinoico (ATRA) también ha sido empleado en esta fase y, recientemente, se ha demostrado el efecto de la ciclofosfamida (CFF), que produce acciones favorables sobre los cánceres quimiorresistentes (Smith y Foster, 2018; Álvarez-León y col., 2021).

1.2.2 Origen del neuroblastoma

El NB se deriva de células progenitoras simpatoadrenales que surgen de la cresta neural y se diferencian en células ganglionares simpáticas y células cromafines secretoras de catecolaminas suprarrenales (Otte y col., 2021). Siendo así, que el 90% de los tumores ocurre en la glándula suprarrenal y los ganglios paraespinales retroperitoneales, la región de la médula suprarrenal en desarrollo y los tejidos circundantes, así como a lo largo de los ganglios simpáticos (Lecca y col., 2018; Nakagawara y col., 2018).

El desarrollo del NB es similar al desarrollo normal del sistema neuroendocrino; durante el desarrollo embrionario, las células de la cresta neural (NCC) se desarrollan, se deslaminan, migran a través de la EMT a ubicaciones más distantes y se diferencian en una variedad de tipos celulares que incluyen neuronas melanocíticas, sensoriales, entéricas y simpáticas; las células precursoras simpatoadrenales o las células progenitoras maduran en diferentes tipos de células del linaje de células neurales autónomas, como las células ganglionares simpáticas, las células cromafines de la médula suprarrenal o las células del sistema nervioso periférico (Figura 5). La maduración, migración y diferenciación de las NCC son procesos sumamente controlados y la evidencia sugiere que muchos factores de transcripción están involucrados en la regulación para decidir el destino del linaje simpático, tales como HIF, MYCN, ALK y PHOX2B, entre otros (Nakagawara y col., 2018; Otte y col., 2021). Los mecanismos que controlan la migración y diferenciación de las NCC se encuentran desregulados durante el desarrollo y la progresión del NB, y frecuentemente los genes que mantienen el equilibrio entre la proliferación y diferenciación, como MYCN, ALK y PHOX2B, se encuentran mutados o sobreexpresados en NB de alto riesgo (Middelbeek y col., 2015).

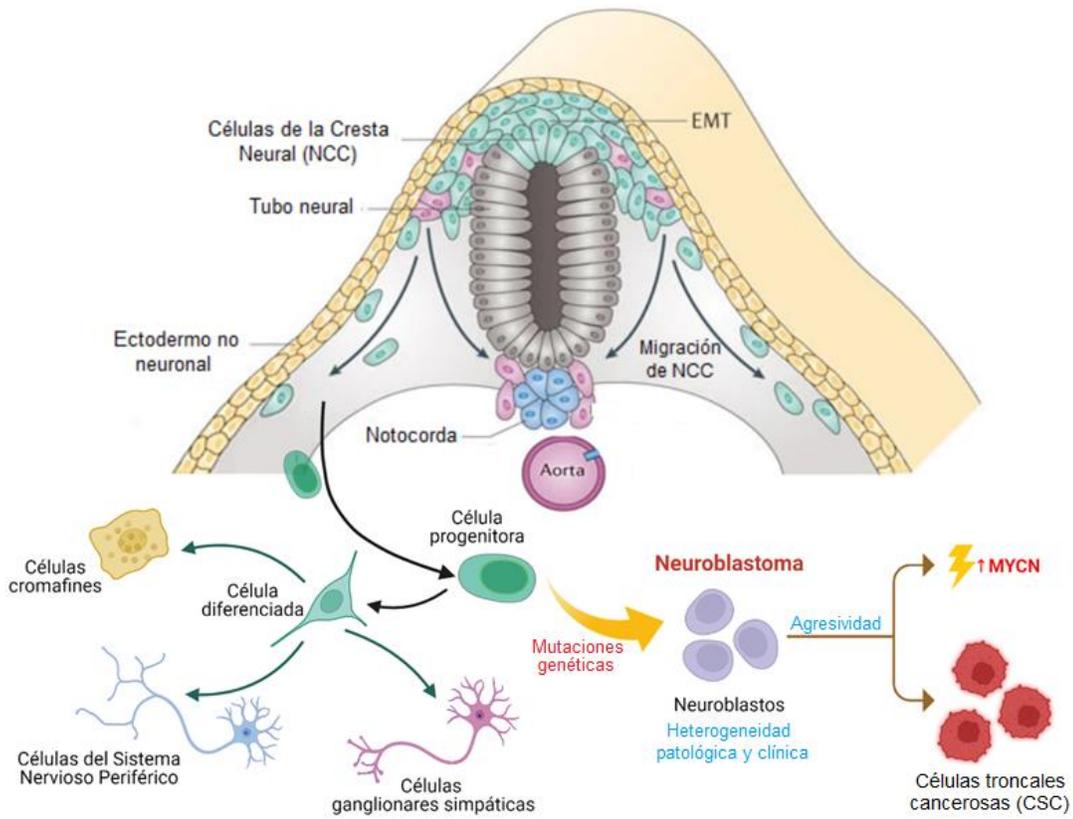


Figura 5. Desarrollo de neuroblastoma a partir de la cresta neural. Modificada de Cheung y Dyer, 2013; Otte y col., 2021.

MYCN tiene un papel muy importante en la progresión del NB (Figura 5), donde actúa como un factor de CSC en la cresta neural en desarrollo y promueve la tumorigénesis. MYC-C, es el principal regulador en células pluripotentes del desarrollo embrionario temprano, mientras que MYCN se expresa mayormente en las células multipotentes de la cresta neural migratoria y posmigratoria. Durante la etapa de diferenciación, la expresión de MYCN se regula negativamente, y de este modo, las células precursoras simpatoadrenales o las progenitoras maduran en diferentes tipos de células, sin embargo, cuando se produce una expresión aberrante de MYCN, se induce un fenotipo único similar a las CSC porque permite su autorrenovación infinita, resistencia a la apoptosis y la reprogramación metabólica (Otte y col., 2021). Estudios recientes demostraron que las líneas celulares de NB son heterogéneas y contienen subpoblaciones similares a las células mesenquimales que migran desde el tubo neural y aquellas que adoptan un destino simpatoadrenal

recuerdan a las que han llegado al ganglio de la raíz dorsal para diferenciarse (Lecca y col., 2018).

1.2.2.1 Neuroesferas

Las células madre neurales se estudian rutinariamente *in vitro* utilizando un sistema de cultivo de neuroesferas, desarrollado por primera vez por Reynolds y Weiss. Las neuroesferas son entidades celulares intrínsecamente heterogéneas que contienen células en varias etapas de diferenciación, incluidas las células madre, células progenitoras neurales en proliferación, entre otras. Esta heterogeneidad aumenta con el tamaño de la esfera porque surgen tipos de células más diferenciadas después de un tiempo más largo en cultivo, no obstante, solo una pequeña fracción (1 a 5%) son células madre neurales de división lenta con la capacidad para formar neuroesferas (Reynolds y Weiss, 1992). Este sistema permite la expansión tridimensional (3D) dentro de un microambiente más similar a uno fisiológico y ha demostrado ser una herramienta extremadamente útil para analizar la proliferación, la capacidad de autorrenovación, migración y la multipotencia de células madre y progenitoras neurales (Sherman y col., 2015).

1.3. Respuesta antioxidante

Las mitocondrias son una fuente importante de producción de ROS, por ejemplo, la OXPHOS convierte el O_2 en H_2O , pero un pequeño porcentaje de O_2 se convierte en radicales aniónicos superóxido ($O_2^{\cdot-}$), una de las ROS más potentes. Para su eliminación, primero las superóxido dismutasas (SOD) lo descomponen en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual también es una amenaza, por lo que es eliminado por la catalasa (CAT) que forma agua y oxígeno (Figura 6). Las SOD son de diferentes tipos según su ubicación subcelular y el tipo de cofactor necesario: SOD1 codifica Cu/Zn-SOD citoplásmico y del espacio intermembrana de las mitocondrias, SOD2 codifica Mn-SOD que está presente en la matriz mitocondrial y SOD3 codifica Cu/Zn-SOD extracelular (Kasai y col., 2020; Shaw y Chattopadhyay, 2020). La elevación de H_2O_2 incrementa el nivel de ROS, lo cual inhibe los niveles de expresión de SOD2 y CAT, y este decremento en la expresión de la SOD2, a su

vez, permite la acumulación de superóxido y, en consecuencia, incrementa el daño celular encontrado en la mayoría de los cánceres (Jelic y col., 2021).

Las ROS actúan como moléculas efectoras antimicrobianas y de señalización que regulan procesos como la actividad transcripcional de NF- κ B, que desempeña un papel en la regulación de la apoptosis, autofagia y la activación de genes diana que incluyen principalmente enzimas implicadas en la respuesta antioxidante, como la ferritina de cadena pesada y la SOD2. Una señal de ROS transitoria genera una respuesta endógena que permite la desintoxicación de ROS al inducir enzimas de defensa como SOD y CAT, sin embargo, los niveles elevados mantenidos de ROS pueden causar daño intracelular. Cuando se rebasa la capacidad antioxidante, los niveles elevados de ROS participan en la señalización apoptótica e inducen la despolarización de la membrana mitocondrial que finalmente produce un aumento de otras moléculas proapoptóticas, como se mencionó anteriormente (Espinosa-Diez y col., 2015; Laforge y col., 2016).

Uno de los mecanismos de protección contra ROS es la vía de respuesta antioxidante centrada en el factor de transcripción 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), una proteína que al activarse juega un papel central en la transcripción de un conjunto de genes de defensa antioxidante e implicados en la biogénesis mitocondrial y el control de calidad, como NRF-1, PINK1, SOD2 y CAT, la regulación negativa de la transcripción de citocinas proinflamatorias, participa en la biosíntesis de antioxidantes, entre otros procesos que mantienen la homeostasis redox en las células, además, existe evidencia de que las ROS mitocondriales (mtROS) activan Nrf2 (Renaud y col., 2019; Kasai y col., 2020; Shaw y Chattopadhyay, 2020). En condiciones basales, Nrf2 es inhibido por un complejo citoplasmático formado por la proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch (Keap1) y Cullin 3 (Cul3), que produce su degradación mediante el proteosoma. Por otro lado, en condiciones de estrés oxidativo (Figura 6), las cisteínas reactivas redox de Keap1 se oxidan permitiendo la liberación de Nrf2 y su translocación al núcleo donde se heterodimeriza con pequeñas proteínas Maf y se une a las secuencias de ADN denominadas Elemento de Respuesta Antioxidante (ARE). Se ha sugerido que la yodación de Keap1 induce

este mismo mecanismo liberador de Nrf2 (Renaud y col., 2019, Aceves y col., 2021). Dado que Nrf2 aumenta la capacidad antioxidante, niveles elevados y mantenidos en las células cancerosas mejoran la resistencia terapéutica y muestran fenotipos malignos que conducen a un mal pronóstico en pacientes con cáncer (Kitamura y Motohashi, 2018).

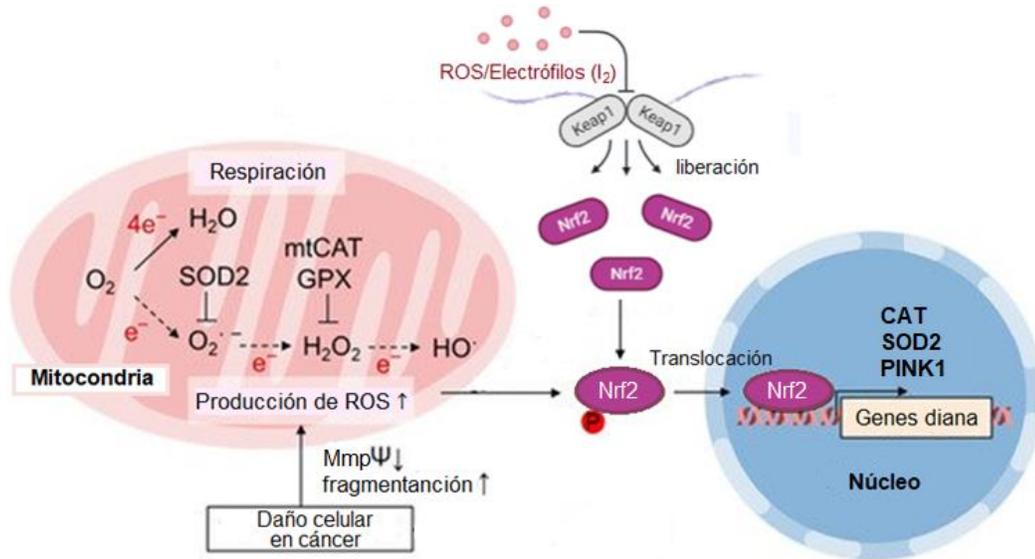


Figura 6. Producción de mtROS y activación de Nrf2 (Modificada de Kasai y col., 2020).

Otra estrategia para reducir la generación nociva de ROS es la eliminación de las mitocondrias dañadas o disfuncionales a través de la autofagia (mitofagia), un proceso que participa en la homeostasis de las células normales eliminando orgánulos, patógenos y agregados de proteínas para reciclar los subproductos (aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos), y es regulado positivamente mediante diversos mecanismos moleculares (Espinosa-Diez y col., 2015; Mowers y col., 2018). En la mitofagia, las mitocondrias a degradar son ubiquitinadas y envueltas por vesículas de doble membrana (autofagosoma), luego éstas se fusionan con lisosomas (autolisosoma) donde las hidrolasas lisosomales degradan el contenido (Figura 7), haciendo que sea un proceso de eliminación específico. En las células madre normales, este proceso es importante para la supervivencia en condiciones deficientes de nutrientes, además de que la función e integridad mitocondrial tiene efectos en su viabilidad, proliferación y diferenciación (Lin y col., 2021). A pesar de

que se ha demostrado que la mitofagia contribuye a la carcinogénesis, migración e invasión, evasión de la destrucción inmunológica y mantenimiento de la troncalidad en células cancerosas, numerosas investigaciones también muestran que, para causar su muerte celular, se puede inducir mitofagia de forma fisiológica o farmacológica para mantener un metabolismo celular normal y suprimir el desarrollo tumoral (Qiu y col., 2021). Los estudios han demostrado que la proteína quinasa putativa 1 (PINK1) y la Parkin inducidas por PTEN desempeñan un papel central en el desencadenamiento de la mitofagia; sin embargo, se sabe poco sobre el mecanismo por el cual PINK1 modula esta vía en respuesta al estrés inducido por ROS (Park y col., 2017).

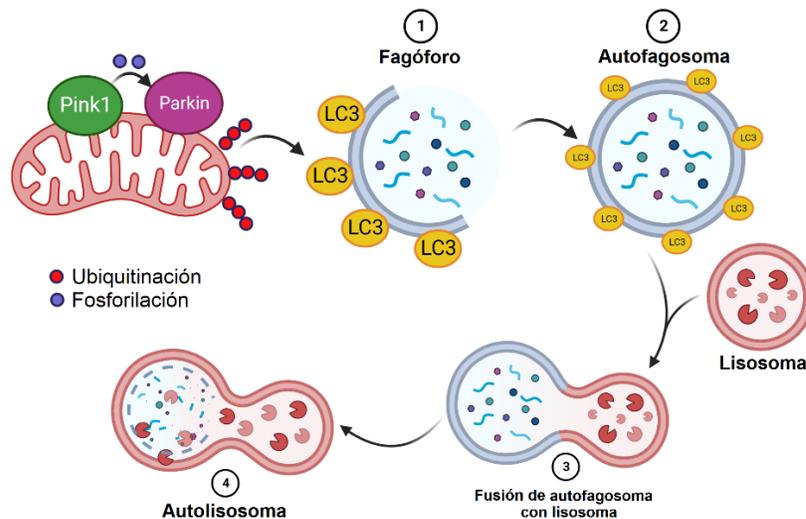


Figura 7. Mecanismo autofágico de mitocondrias mediado por PINK1.
Imagen creada con BioRender.com.

Diferentes investigaciones se han centrado en compuestos naturales que disminuyen la quimiorresistencia y reducen los efectos secundarios de las terapias convencionales, uno de ellos es el yodo, que ayuda a combatir los radicales libres ya que estimula y mejora la actividad de los antioxidantes en el cuerpo (Gersey y col., 2017; Aceves y col., 2021).

1.4. Yodo molecular

El yodo (I) es un halógeno de número atómico 53 y masa atómica de 126.9, se encuentra en la naturaleza principalmente en los océanos como yoduro, está presente en trazas (0,05 partes por millón) y las algas pueden captarlo y acumularlo

hasta 30,000 veces más que cualquier otro ser vivo. Además de las algas, existen otras fuentes de yodo, tales como los minerales de yodato, depósitos de salmuera natural y aguas saladas de pozos de petróleo y sal (RSC, 2021). En vertebrados, este elemento es un componente de las hormonas tiroideas que es vital para crecimiento normal y el metabolismo, aproximadamente el 60% del yodo presente en el cuerpo humano se almacena en la glándula tiroides (como yoduro; I⁻), sin embargo, existe evidencia de que muchos otros órganos lo captan en sus diferentes formas químicas, incluyendo las glándulas salivales, mucosa gástrica, glándula mamaria lactante, sistema nervioso, ovario, útero, próstata, páncreas, entre otros (Aceves y col., 2021; Blikra y col., 2022).

Diversos estudios han postulado que el yodo puede tener propiedad antioxidante en aquellas células que lo concentran, donde el yodo oxidado puede neutralizar las especies reactivas de oxígeno (ROS) actuando como donante de electrones o uniéndose a algunos ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares, haciéndolas menos reactivos a las ROS (Aceves y col., 2021). De esta manera, el yodo se considera una defensa contra diversas enfermedades y el cáncer, o como preventivo contra efectos secundarios producidos por algunos quimioterapéuticos.

1.4.1. Efectos del yodo molecular en cáncer

Se han evaluado compuestos naturales que disminuyen la quimiorresistencia y reducen los efectos tóxicos de las terapias convencionales, incluyendo al yodo molecular (I₂), que ha demostrado tener acciones antineoplásicas en diversos tejidos. Varios grupos han estudiado dichos efectos en diversas líneas celulares cancerosas, fungiendo como inductor de vías apoptóticas y de diferenciación. Por ejemplo, se observó que la suplementación de I₂ en cáncer de próstata disminuyó la progresión tumoral e indujo apoptosis en líneas tumorales (DU-145) [Aceves y col., 2021]; en cáncer cervicouterino disminuyó la capacidad tumorigénica y la viabilidad en las líneas celulares HeLa y SiHa tanto en monocapa como en esferoides (CSC), además de inducir una mayor expresión y activación de los receptores PPAR γ (Bigoni-Ordóñez y col., 2018). Finalmente, en neuroblastoma ejerció un efecto inhibitor

dependiente de la dosis sobre la viabilidad de todas las líneas celulares estudiadas y, en sinergia con el ácido todo-trans retinoico (ATRA), aumentó el efecto apoptótico (Mendieta y col., 2020).

Además, el I₂ inhibe la expresión de marcadores de células madre putativos CD49f y CK17, así como de factores de transcripción de troncalidad tales como OCT-4, SOX2, KLF4 y NANOG e induce la regulación a la baja de los marcadores de quimiorresistencia (p21, Bcl-2 y MDR-1) en células MCF-7 quimiorresistentes, haciendo que las células cancerosas sean menos tumorigénicas (Bigoni-Ordóñez y col., 2018). En xenoinjertos de ratón tratados con I₂ también se observó una disminución en la expresión de marcadores de invasión como CD44, vimentina, activador del plasminógeno uroquinasa (uPA) y su receptor, y VEGF (Mendieta y col., 2019). Estos efectos son mediados por la activación de los receptores PPAR γ que a su vez promueve una mayor expresión de su gen diana, PTEN, lo cual disminuye la capacidad de autorrenovación, la proliferación celular y la tumorigenicidad en CSC (Bigoni-Ordóñez y col., 2018).

En un estudio muy reciente, en un modelo de NB quimiorresistente SK-N-BE(2) *in vitro* e *in vivo*, se demostró que el I₂ en sinergia con Ciclofosfamida (CFF) inducen efectos antiproliferativos, y que el I₂ aumenta la sensibilidad de las células de NB a CFF, desencadenando la expresión de PPAR γ y actuando como un mitocondio en el metabolismo mitocondrial (Álvarez-León y col., 2021). Diversos grupos de investigación sugieren que estos efectos antineoplásicos pueden involucrar mecanismos directos o indirectos.

1.4.2. Mecanismos captación del yodo

La captación del yodo en sus diferentes formas químicas requiere de distintos mecanismos de señalización. La forma química I⁻, es internalizada mediante el simporter Na⁺/I⁻ (NIS), el intercambiador de aniones Pendrina (PDS) y otros transportadores presentes en glándula tiroides, glándula mamaria, entre otros; mientras que, el I₂ es captado por varios tejidos por difusión facilitada por un

transportador altamente conservado desde las algas hasta los vertebrados, pero no identificado en su estructura (Venturi, 2011; Aceves y col., 2021).

1.4.2.1. Mediado por receptores PPAR γ (indirecto)

En células cancerosas, el suplemento de I₂ ingresa a las células y se asocia con las moléculas de ácido araquidónico (AA) presentes en la membrana celular produciendo la yodación éste y generando la 6-yodolactona (6-IL). Este yodolípido que es un ligando de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas tipo gamma (PPAR γ). Su activación induce señales apoptóticas dependientes de caspasas mediante P53 y/o la inhibición de marcadores relacionados con el mantenimiento de las células madre (Sox2, Nanog y CD44), quimiorresistencia (proteína de resistencia a multifármacos 1; MDR1) y supervivencia (Survivina; SVV). (Mendieta y col., 2020; Aceves y col., 2021).

1.4.2.2. Mediado por mitocondrias (directo)

La vía directa es la referente a la vía mediada por las mitocondrias, en la investigación de Shrivastava y col. en 2006 mostró que el yodo disipó el Mmp Ψ , incrementando la actividad antioxidante y generando el agotamiento del contenido total de tioles celulares. También indujo la perforación de la membrana externa mitocondrial producida por la oligomerización de Bax-Bak previo a la liberación citosólica de AIF y endonucleasa G, ejecutándose un programa de muerte independiente de caspasas (Shrivastava y col., 2006). Además de muerte celular, el I₂ induce la respuesta autofágica (Singh y col., 2011).

En la última década, diversos estudios en distintos tipos de cánceres, así como en modelos de neuroblastoma quimiorresistente, han elucidado que los efectos antineoplásicos del I₂ involucran una acción directa, donde el yodo oxidado disipa el Mmp Ψ desencadenando la apoptosis mediada por mitocondrias a través del factor inductor de apoptosis (AIF) [Mendieta y col., 2020]. Sin embargo, hace falta más información sobre el mecanismo mitocondrial que promueve los efectos antitumorales del I₂ en células de neuroblastoma humano con alta expresión de N-MYC [SK-N-BE(2)], tanto en monocapa como en neuroesferas.

2. HIPÓTESIS

El suplemento de yodo molecular (I_2) promueve apoptosis e inhibición de la proliferación en células troncales cancerosas de neuroblastoma humano, a través de la vía mitocondrial y la translocación nuclear de Nrf2.

3. OBJETIVOS

3.4. General

Estudiar los mecanismos de la vía mitocondrial del yodo molecular (I_2) en células troncales de neuroblastoma humano.

3.5. Específicos

- Evaluar el efecto de I_2 sobre la proliferación de células de neuroblastoma humanas, tanto en monocapa como en neuroesferas (CSC), usando el método de azul tripano.
- Examinar el efecto de I_2 sobre el potencial de la membrana mitocondrial ($Mmp\Psi$) y el contenido del ion superóxido de células de neuroblastoma humano (en monocapa y neuroesferas) mediante inmunofluorescencia de sondas MitoTracker y MitoSOX, respectivamente.
- Determinar el efecto de I_2 en la expresión de factores de transcripción relacionados con la respuesta antioxidante (NRF2, CAT y SOD2), control mitocondrial (PINK1) y muerte celular (AIF y BAX/BCL-2), mediante qPCR.
- Analizar el efecto de I_2 sobre la traslocación de Nrf2 en células de neuroblastoma humano, tanto en monocapa como en neuroesferas (CSC), empleando Inmunocitoquímica (ICC).

4. METODOLOGÍA

4.1. Materiales

Para los diferentes protocolos, se emplearon tubos eppendorf de 1.5 mL (Merck), placa de cultivo celular de 96 pocillos (Nest), placa de cultivo (Merck), pipetas de vidrio de 10 y 25 mL (Corning), portaobjetos de cultivo celular con cámara Falcon de 8 compartimentos (ThermoFisher), tubos para PCR de 0.2 mL (Merck), microtubos para qPCR (Qiagen), cubre y portaobjetos (Globe Scientific), Hemocitómetro Bright-Line (Sigma), micropipetas de 2.5 (Brandtech), 10, 20, 200 y 1000 μ L (Gilson).

4.1.1. Material biológico

La línea celular SK-N-BE(2) se obtuvo de la *American Type Culture Collection* (ATCC CRL-2271).

4.1.2. Reactivos

Para la determinación de la viabilidad celular se utilizó el método de azul tripano (Sigma-Aldrich).

Posterior a los tratamientos, para la extracción de ARN se empleó el reactivo TRIzol (Invitrogen), cloroformo (Sigma-Aldrich), isopropanol (Sigma-Aldrich), etanol (Merck) y agua libre de nucleasas (Thermo Scientific); la síntesis de ADNc se realizó empleando el kit M-MLV Transcriptasa Reversa, que contiene DTT 0.1 M, tampón para RT 5X y enzima Retrotranscriptasa M-MLV (Invitrogen); así como RNaseOUT Inhibidor recombinante de la ribonucleasa (Invitrogen), Oligo(dT)12-18 (Invitrogen) y dNTPs 10 mM. La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) se realizó empleando el Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific). Para la electroforesis se utilizó Agarosa (Invitrogen) y tampón de carga con SYBR Green (Invitrogen).

Para el ensayo de inmunofluorescencia se ocuparon las sondas MitoTracker Red CM-H2Xros (Invitrogen) e indicador de superóxido mitocondrial MitoSOX Red (Invitrogen), colorante DAPI (ThermoFisher) y metanol (Merck).

Para Inmunocitoquímica se usó etanol frío, agua oxigenada comercial (H₂O₂) 880 mM, BSA (Merck), anticuerpo primario anti-Nrf2 (Santa Cruz Biotechnology), anticuerpo secundario Alexa Fluor 546 (ThermoFisher) y DAPI.

4.2. Métodos

4.2.1. Cultivos celulares

La línea celular de NB humano, SK-N-BE(2) creció en placa de cultivo con medio DMEM (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Merck) y 2% de antibiótico (penicilina/estreptomicina; Gibco) a 37 °C y 5% de CO₂. Al alcanzar el 80% de confluencia, las células se tripsinizaron con 1 mL de 0.05% tripsina-EDTA 1X (Gibco), se incubaron durante 5 min a 37 °C y 5% de CO₂, posteriormente se añadió 1 mL de medio DMEM completo para inactivar la tripsina y, luego de homogenizar por pipeteo, se transfirió el contenido de la caja a un tubo Falcon con 8 mL de DMEM completo para formar la solución madre (10 mL totales). En seguida se tomaron 200 µL de esta solución y se colocaron en un tubo eppendorf con 800 µL de tampón fosfato salino (PBS 1X, Anexo punto 1). Se contaron las células en una cámara de Neubauer con colorante azul tripano (Sigma-Aldrich) como se describe más adelante. Después, para generar neuroesferas, se sembraron 2 x 10⁵ células de la solución madre y se cultivaron durante 120 horas en cajas no adherentes (Thermo Scientific) con medio MammoCult (StemCell Technologies) adicionado con 1% de suplemento de proliferación para MammoCult (StemCell Technologies), 4 µg/mL de heparina de sodio (StemCell Technologies), 0.48 µg/mL hidrocortisona (StemCell Technologies) y 2% de antibiótico (pen/strep).

4.2.1.1. Tratamiento

Para analizar el efecto del I₂ *in vitro*, las células SK-N-BE(2) se dividieron en cuatro grupos, dos para cultivo en monocapa (Control e I₂) y dos para cultivo de neuroesferas (Control e I₂); para los grupos de I₂, se suplementó el medio de cultivo con solución de yodo molecular 200 µM (Anexo punto 2) durante 48 h, previo al establecimiento de los cultivos celulares.

4.2.2. Azul tripano

Se evaluó la proliferación de las células (1.25×10^5) durante el tratamiento (0-120 h) en cajas de 24 pozos. A las células en monocapa se les aspiró el medio de cultivo, se agregaron 200 μL de tripsina a cada pozo (c/p) y se incubaron a 37°C por 5 minutos. Se agregaron 300 μL a c/p y una vez mezcladas por pipeteo, se transfirieron los 500 μL totales (solución madre) a tubos eppendorf de 1.5 mL; luego se tomaron 10 μL de la solución madre y se mezclaron con 10 μL de colorante de exclusión azul de tripano (0.04%). Al final se colocaron 10 μL de la mezcla anterior en cada lado de un Hemocitómetro (Cámara de Neubauer) y se contaron 5 campos. El contenido de las células en neuroesfera (500 μL) se disgregó por pipeteo, se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 mL y se continuó con el mismo procedimiento que con las monocapa.

El número total de células (#TdC) viables se obtuvo utilizando la Ecuación 1, donde se contaron únicamente las células no teñidas de azul (muertas) y luego se analizaron los datos (mostrados como la media).

$$\#TdC = (\text{Concentración celular}) (\text{Vol. de SM})$$

$$\text{Concentración celular} = \left(\frac{\bar{x} \text{ de células contadas}}{\# \text{ de campos}} \right) (\text{Factor de dilución})(FN)$$

Ecuación 1. Conteo del #TdC. \bar{x} , promedio; # de campos = 5; dilución = 1/5; FN, Factor de Neubauer = 10,000; Vol. de SM, Volumen de solución madre.

Se tomaron micrográficas de ambos modelos al inicio y al final del tratamiento mediante un microscopio invertido (Leica Microsystems) en objetivo 10X y se procesaron empleando el software AmScope.

4.2.3. Inmunofluorescencia

Los cultivos celulares (1.25×10^5 células/pozo) se hicieron en portaobjetos de cultivo celular con cámara Falcon de 8 compartimentos, después de los tratamientos se realizó un lavado con PBS 1X y, en oscuridad, se añadieron 500 μL de la solución de trabajo correspondiente (con sonda MitoTracker Red CM-H2Xros o MitoSOX Red, Anexo punto 3) y se incubaron durante 45 min a 37°C y 5% de CO_2 . En seguida se

realizó un lavado con PBS 1X y las células se fijaron con metanol frío durante 10 minutos. Luego de un lavado con PBS 1X, se montaron con anti-FADE/DAPI (Anexo punto 4). Se tomaron micrografías con un microscopio de epifluorescencia (Axio Imager, Carl Zeiss) con objetivo 40X, se consideraron 20 células por micrografía a las cuales se les cuantificaron las Unidades de Fluorescencia Relativa (RFU) y, empleando el software Image J 1.8 (NIH), se determinó el estado funcional mitocondrial.

4.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR)

4.2.4.1. Extracción de ARN

Se utilizaron cajas de 24 pozos con células SK-N-BE(2) con y sin tratamiento, se les aspiró el medio y con 200 μ L de PBS 1X en cada pozo se realizó 1 lavado para posteriormente agregar 200 μ L de TRIzol a c/p. En seguida, se colocó la caja por 5 min en hielo y, pasado este tiempo, se homogenizó el contenido por pipeteo y se transfirió en tubos eppendorf de 1.5 mL previamente etiquetados a los que después se les agregaron 80 μ L de cloroformo y, tras 20 mezclados por inversión, se incubaron durante 3 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron a 12000 rpm a 4 °C por 20 min y en seguida se recuperó la fase acuosa para añadirle isopropanol en relación 1:1 (aprox. 400 μ L). Se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000 rpm a 4 °C por 15 min; al terminar, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado (pellet de ARN) con 1 mL de etanol 70% frío. Al final se centrifugaron a 7500 rpm a 4 °C por 5 min, hasta evaporar el etanol y se resuspendió en 40 μ L de agua inyectable estéril. Después se cuantificó la concentración de ARN (1 μ L de muestra) en el espectrofotómetro UV-Vis (NanoDrop™ 2000, Thermo Scientific) a 260 nm. Para visualizar la integridad de los ácidos nucleicos, se corrió un gel en agarosa al 2% con tampón Tris-acetato-EDTA (TAE 1X, Anexo punto 5) a 80 V por 60 min, colocando 1 μ L de muestra ARN y 2 μ L de tampón de carga con SYBR Green por pocillo. Esto se realizó en tres ensayos (n) independientes y por triplicado (12 muestras totales: 3 m/n-control, 3 m/n-I₂).

4.2.4.2. Retrotranscripción (RT-PCR)

Para la obtención de ADN complementario (ADNc), a un tubo de 600 μL se le colocó el volumen equivalente a 2 μg de ARN, 1 μL de Oligo(dT) y se aforó a 15 μL con agua inyectable estéril; después de mezclarse con un vortex, se incubó a 65 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min y se situó en hielo durante 5 min. Esto se hizo para cada muestra.

Por muestra de ARN, se preparó una mezcla con 2 μL de dNTPs 10 mM, 4 μL de tampón para RT 5X, 0.5 μL de RNaseOUT y 2 μL de DTT y se agitó mediante un vortex. Se colocaron 9 μL de esta solución en cada tubo de muestra y se mezcló, luego se situaron los tubos en el termociclador Perkin Elmer con el programa de incubación a 42 $^{\circ}\text{C}$ por 60 min y 55 $^{\circ}\text{C}$ por 20 min. Finalmente, se añadió 1 μL de enzima Retrotranscriptasa M-MLV a cada muestra y una vez concluido el programa se almacenaron los tubos a -20 $^{\circ}\text{C}$.

Estas muestras de ADNc fueron proporcionadas por el laboratorio de Metabolismo Energético del Instituto de Neurobiología para realizar los experimentos posteriores.

4.2.4.3. Protocolo qPCR

Se realizó el análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa (qPCR) en tiempo real. La reacción se realizó con el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) empleando, por muestra, 1 μL de plantilla de ADNc, 5 μL del Master Mix, 3.6 μL de agua libre de nucleasas y 1 μL de cebador (5' y 3'). Los oligonucleótidos específicos de los genes, las temperaturas de alineación (T_a $^{\circ}\text{C}$) y los pares de bases (pb) se enumeran en el Cuadro 1. Se utilizó el sistema detector de secuencias Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia) utilizando 40 ciclos de amplificación en tres pasos (94 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 s, T_a $^{\circ}\text{C}$ durante 30 s y 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 s). Los niveles relativos de ARNm se normalizaron al nivel de ARNm de β -actina.

Cuadro 1. Secuencia y temperaturas de alineación de oligonucleótidos para qPCR.

Gen	RefSeq	Secuencia (S-sentido, AS-antisentido)	pb	Ta (°C)
NRF2	NM_006164.5	S: CAGTCAGCGACGGAAAGAGT AS: AGTGACTGAAACGTAGCCGA	312	62
CAT	NM_001752.4	S: TCCGGGATCTTTTTAACGCCATTG AS: TCGAGCACGGTAGGGACAGTTCAC	362	62
SOD2	NM_000636.4	S: GGCCTACGTGAACAACCTGA AS: CACGTTTGATGGCTTCCAGC	203	62
PINK1	NM_032409.3	S: GGACACGAGACGCTTGCA AS: TTACCAATGGACTGCCCTATCA	63	62
AIF	NM_004208.4	S: GTCGTGCGTGAGAGGAAAG AS: GCACCAGCTTCTGCTTCAA	104	60
BAX	NM_138764.5	S: AAGCTGAGCGAGTGTCTCAAGCGC AS: TCCCGCCACAAAGATGGTCACG	327	60
BCL-2	NM_000633.3	S: CTCGTCGCTACCGTCGTGACTTCG AS: CAGATGCCGGTTCAGGTACTCAGTC	242	60
β-ACTINA	NM_001101.5	S: CCATCATGAAGTGTGACGTTG AS: ACAGAGTACTTGCGCTCAGGA	175	60

4.2.5. Inmunocitoquímica

Se sembraron 1.5×10^5 células en portaobjetos de cultivo celular con cámara Falcon de 8 compartimentos, después de los tratamientos, se realizó un lavado con PBS 1X y se agregaron 100 μ L de metanol frío durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de un lavado con PBS 1X, se adicionaron 100 μ L de H₂O₂ y se incubó en oscuridad por 10 min. Se repitió un lavado con PBS 1X, se adicionaron 100 μ L de BSA por 15 min y se realizó otro lavado con PBS 1X. Posteriormente, se agregaron 100 μ L de anticuerpo primario anti-Nrf2 1:100 (Antihumano hecho en ratón) y se hizo una incubación durante 60 minutos a temperatura ambiente; luego de un lavado con PBS 1X, se agregaron 100 μ L de anticuerpo secundario Alexa Fluor 546 1:1000 (Anticonejo hecho en cabra) y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Al final, se hizo un lavado con PBS 1X y se montaron los portaobjetos con anti-FADE/DAPI. Se tomaron micrografías con un microscopio de epifluorescencia (Axio Imager, Carl Zeiss) con objetivo 40X y, empleando el software Image J 1.8 (NIH), se

cuantificaron las Unidades de Fluorescencia Relativa (RFU) para determinar la expresión de Nrf2. Posteriormente, se realizó un análisis de colocalización en Image J 1.8 donde se consideraron 20 núcleos celulares (por micrografía) a las cuales se les cuantificaron las RFU para determinar la traslocación nuclear de Nrf2.

4.3. Manejo de residuos

Una vez realizados los ensayos, los Residuos Peligrosos Biológicos-Infeciosos (RPBI) fueron manejados de acuerdo a las disposiciones contenidas en la norma NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 y en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 sobre el manejo de RPBI y se desecharon en el Laboratorio Universitario de Bioterio del Instituto de Neurobiología, UNAM. El resto de los desechos se separaron de acuerdo a su naturaleza y se colocaron en los contenedores adecuados (ácidos, bases, etc.) del Laboratorio de Metabolismo Energético (INB-UNAM).

4.4. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, reportando los resultados como la media \pm la desviación estándar (DE) y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías seguido por la prueba de Dunnett o Tukey (para los qPCR y conteos de viabilidad, respectivamente). En todos los casos, las diferencias con valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Todos los análisis de datos se realizaron empleando el software GraphPad Prism.

4.5. Diseño experimental

Para este trabajo *in vitro*, a) se utilizó la línea celular de neuroblastoma humano SK-N-BE(2) y cultivó con medio DMEM hasta llegar al 80% de confluencia; posteriormente se despegaron las células con tripsina y se realizó una selección y enriquecimiento por 120 h en medio MammoCult (StemCell Technologies) suplementado con hidrocortisona y 0.4% heparina para obtener células troncales (CSC) de neuroblastoma organizadas en neuroesferas. b) Para los grupos control de células en monocapa (progenitoras) y neuroesferas (troncales) únicamente se añadió medio (DMEM o MammoCult, respectivamente) mientras que, en los grupos experimentales, se suplementó el medio de cultivo con yodo molecular 200 μ M. c)

Los cuatro grupos fueron empleados para los análisis descritos en la sección 5.2. Métodos, como se especifica en la Figura 8.

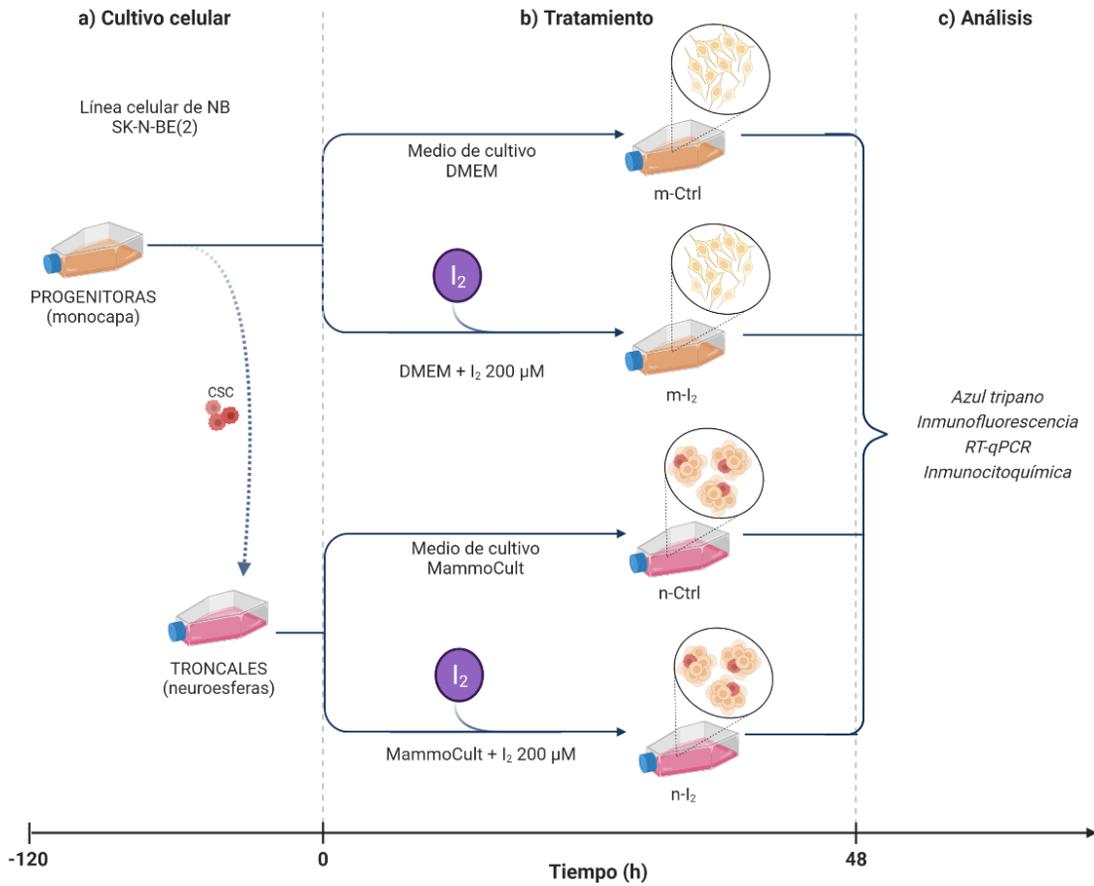


Figura 8. Diseño experimental para este trabajo. Imagen creada con BioRender.com.

5. RESULTADOS

5.1. Efecto del I₂ en la proliferación celular

Para estudiar el mecanismo mitocondrial por el que actúa el yodo molecular (I₂) en células tumorales de NB, se utilizó un modelo tridimensional en esferoides que permite el enriquecimiento de CSC, así como un modelo 2D en monocapa (m) de células progenitoras (como control), con la línea celular de neuroblastoma SK-N-BE(2). Se analizaron los grupos experimentales en condiciones basales y con el suplemento de I₂ 200 µM durante un periodo de 0 a 120 h. Los resultados se reportan como porcentaje de la media del número de células, respecto al grupo control en el tiempo 0.

En la Figura 9a, se observa (microscopio invertido) un crecimiento típico del grupo progenitor en la superficie adherente y su replicación conforme al tiempo de duplicación reportado para esta línea celular (30 h aproximadamente, ATCC); el agrupamiento celular del grupo troncal para la formación de neuroesferas fue notorio desde 72 h y se percibió un decremento en la tasa de crecimiento (n-CTRL, recuadro con línea continua amarilla) con respecto al modelo progenitor (m-CTRL, recuadro con línea continua azul). Esta disminución es significativa hasta las 120 h (588.2 m-CTRL vs 466.0 n-CTRL, % de células), como se indica en la Figura 9c.

El tratamiento con I₂ produjo una disminución de la densidad celular (Figura 9b) y de la proliferación (Figura 9c) de manera significativa desde las 72 h, tanto en el modelo en monocapa (recuadro con línea punteada azul) como en neuroesfera (recuadro con línea punteada amarilla), en comparación con los grupos no tratados (265.4 m-I₂ vs 428.7 m-CTRL; 286.7 n-I₂ vs 407.3 n-CTRL). Este resultado se conserva a las 96 y 120 h en el modelo progenitor (96 h, 374.4 m-I₂ vs 481.3 m-CTRL; 120 h, 440.0 m-I₂ vs 588.2 m-CTRL); mientras que en el modelo con CSC la disminución vuelve a ser significativa solo a las 120 h (392.9 n-I₂ vs 466.0 n-CTRL).

Además, se observa (Figura 9b) que la suplementación con I₂ inhibe la formación de neuroesferas, dando origen a cuerpos semiesféricos y de menor tamaño.

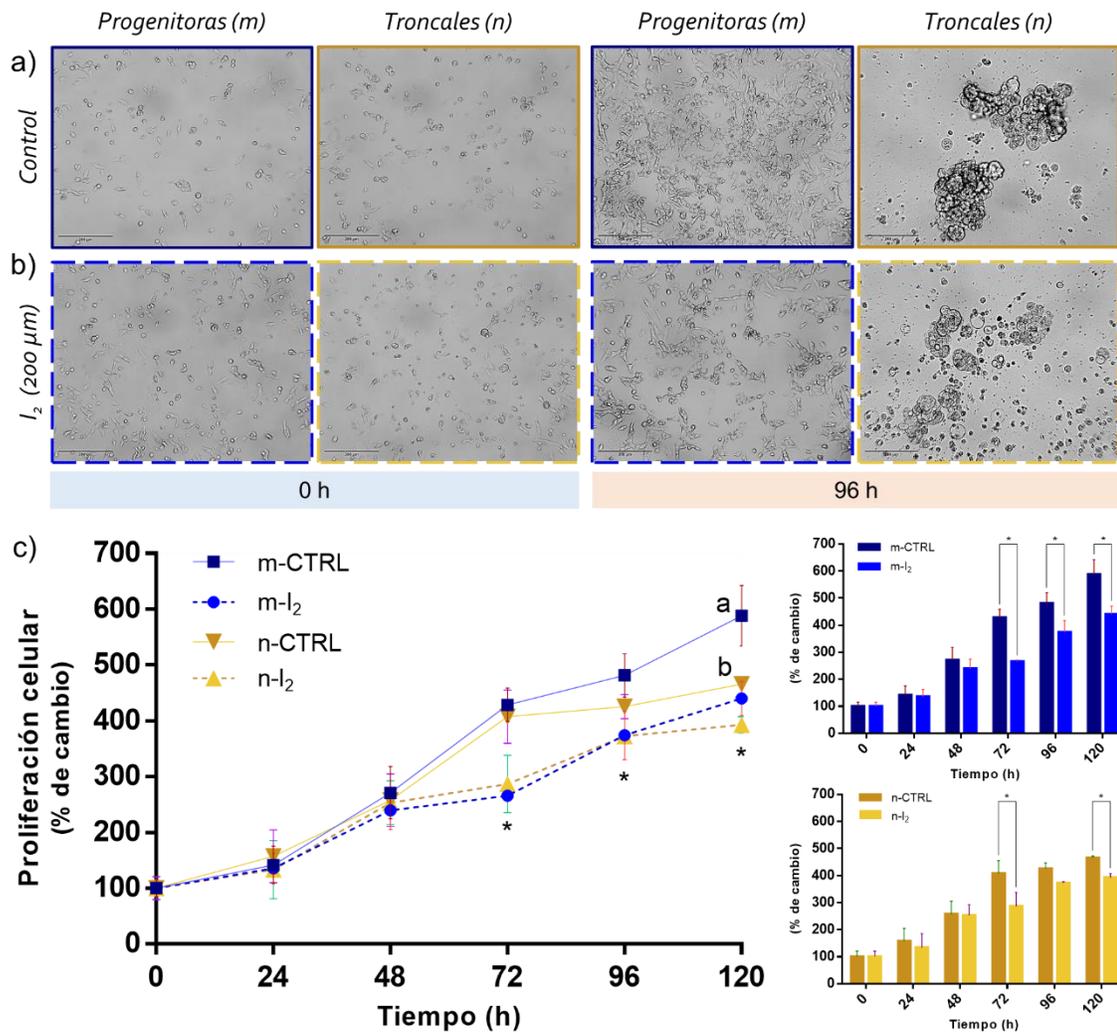


Figura 9. Modelos experimentales de cultivos celulares en monocapa (m) y neuroesferas (n). Micrografías representativas tomadas en microscopio invertido (objetivo 10X) en a) condiciones control y b) al inicio y final del tratamiento (0-120 h) con I₂ 200 μM. La barra de escala corresponde a 200 μm. c) Análisis de la proliferación celular mediante conteo con azul tripano. Los datos se expresan como media ± DE (n=6 ensayos independientes por triplicado). El asterisco indica diferencia estadística significativa comparado con su respectivo control y letras distintas son significativamente diferentes entre modelos sin tratamiento (p<0.05, prueba de Dunnett).

5.2. Expresión de genes relacionados con muerte celular

Para determinar si la disminución de la proliferación está relacionada a la inducción de señalización de muerte celular, se analizaron los transcritos/ARN mensajeros

(ARNm) de moléculas proapoptóticas (AIF, P53 y el índice BAX/BCL-2) en los cultivos celulares de todos los grupos experimentales.

Como se observa en la Figura 10, en condiciones basales, los niveles de ARNm de AIF son superiores en las células troncales con respecto a las progenitoras (0.62 n-CTRL vs 0.27 m-CTRL, copias/ μ L) y la suplementación con I₂ 200 μ M duplicó su sobreexpresión únicamente en el modelo progenitor (0.58 m-I₂ vs 0.27 m-CTRL, copias/ μ L). La expresión del gen antiapoptótico BCL-2 disminuye en las células en neuroesfera en comparación con las monocapa (0.09 n-CTRL vs 0.13 m-CTRL, copias/ μ L); en cambio, el gen apoptótico BAX mostró niveles similares en ambos modelos. El análisis estadístico de las medias indicó diferencias significativas luego del tratamiento con I₂, disminuyendo la expresión génica de BCL-2 (0.047 m-I₂ vs 0.130 m-CTRL; 0.039 n-I₂ vs 0.088 n-CTRL, copias/ μ L) y promoviendo un aumento de BAX (1.77 m-I₂ vs 0.72 m-CTRL; 1.19 n-I₂ vs 0.57 n-CTRL, copias/ μ L) en ambos modelos. Esto resultó en el incremento del índice proapoptótico BAX/BCL2 de 6.5 y 4 veces, en células progenitoras y troncales, respectivamente (36.23 m-I₂ vs 5.56 m-CTRL; 27.86 n-I₂ vs 6.92 n-CTRL, copias/ μ L).

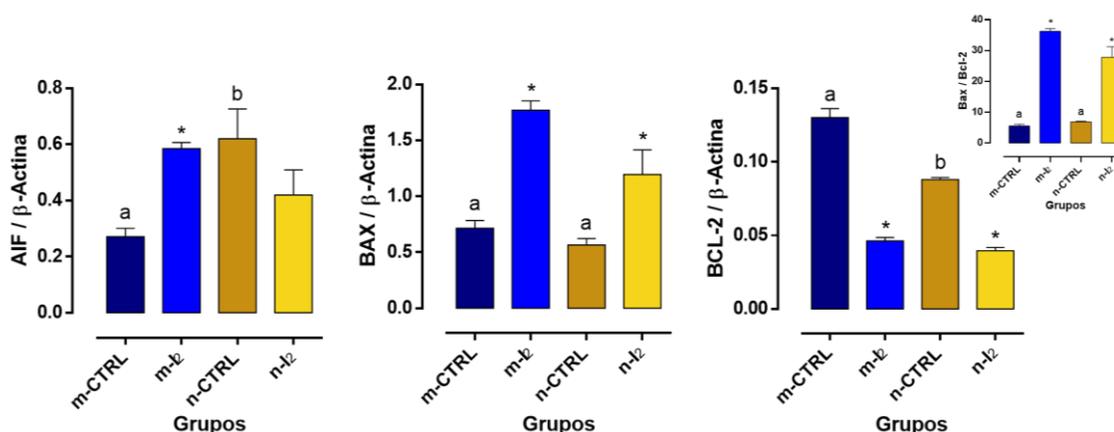


Figura 10. Efecto del I₂ 200 μ M en la expresión de transcritos (ARNm) relacionados con la muerte celular: AIF, BCL-2 y BAX en cultivos en monocapa (m) y neuroesferas (n) mediante q-PCR. Los datos se expresan como media \pm DE (n=3 ensayos independientes por triplicado). El asterisco indica diferencia estadística significativa comparado con su respectivo control y letras distintas son significativamente diferentes entre modelos sin tratamiento ($p < 0.05$, prueba de Tukey).

5.3. Efecto del I₂ en el potencial de membrana mitocondrial

Para analizar el efecto del tratamiento sobre las mitocondrias, se utilizó la sonda MitoTracker Red (longitud de onda de excitación de 579-599 nm) que tiñe las mitocondrias de las células vivas mediante su acumulación que es dependiente del potencial de la membrana mitocondrial (Mmp Ψ). En la Figura 11 se observa que el modelo progenitor posee un Mmp Ψ basal (grupo control) de 699.4 RFU (Unidades Relativas de Fluorescencia), mientras que en las CSC fue significativamente mayor (n-CTRL 1789.1 vs m-CTRL 699.4 RFU). Luego del tratamiento de 48 h con I₂, las células en monocapa emitieron una mayor acumulación de MitoTracker Red con respecto al grupo control (m-I₂ 934.5 vs m-CTRL 699.4 RFU) indicando aumentos significativos del Mmp Ψ , mientras que en las neuroesferas se disminuye dicha señal (n-I₂ 1409.2 vs n-CTRL 1789.1 RFU).

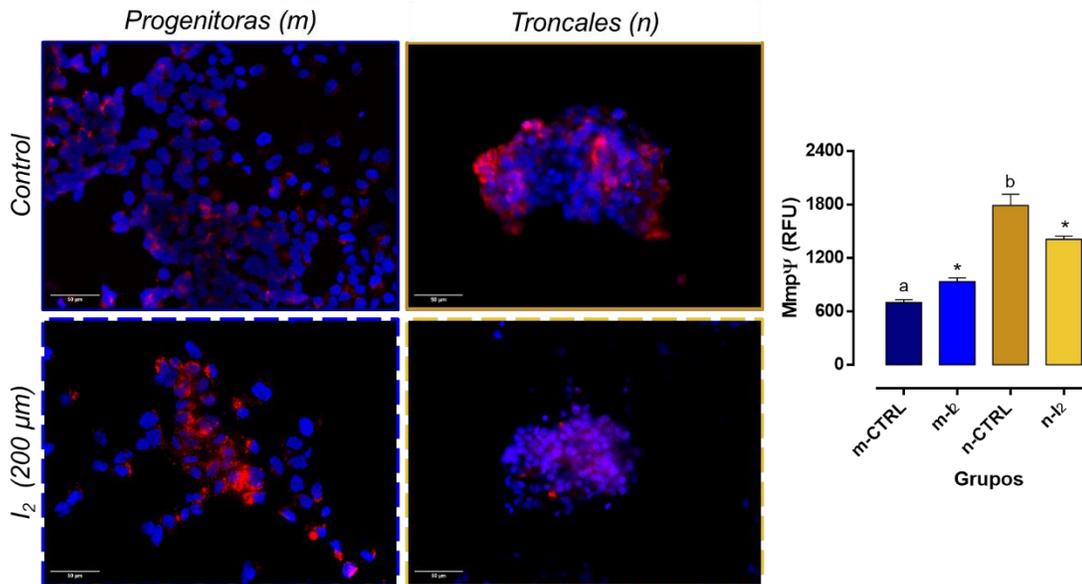


Figura 11. Efecto del I₂ 200 μ M en el potencial de membrana mitocondrial (Mmp Ψ) en cultivos en monocapa (m) y neuroesferas (n) mediante la sonda MitoTracker, cuantificado en Unidades de Fluorescencia Relativa (RFU) y micrografías (objetivo 40X) tomadas en microscopio de epifluorescencia. La barra de escala corresponde a 50 μ m. Los datos se expresan como media \pm DE (n=3 ensayos independientes por triplicado). El asterisco indica diferencia estadística significativa comparado con su respectivo control y letras distintas son significativamente diferentes entre modelos sin tratamiento (p<0.05, prueba de Tukey).

5.4. Efecto del I₂ en especies reactivas de oxígeno

De manera más específica, se empleó una sonda de detección de especies reactivas de oxígeno en las mitocondrias, a través de la oxidación de la sonda MitoSOX Red (longitud de onda de excitación de 510-580 nm) por iones superóxidos (O₂⁻) de las mitocondrias en células vivas. La Figura 12 exhibe que el modelo progenitor posee una concentración similar de O₂⁻ antes y después del tratamiento (CTRL 323.3 vs I₂ 385.8 RFU). Por otro lado, las CSC mostraron niveles basales de O₂⁻ significativamente mayores al del grupo progenitor (1517.7 RFU); al suplementar el medio de cultivo con I₂, se produjo una reducción significativa (I₂ 962.0 RFU) observada por la menor oxidación de la sonda.

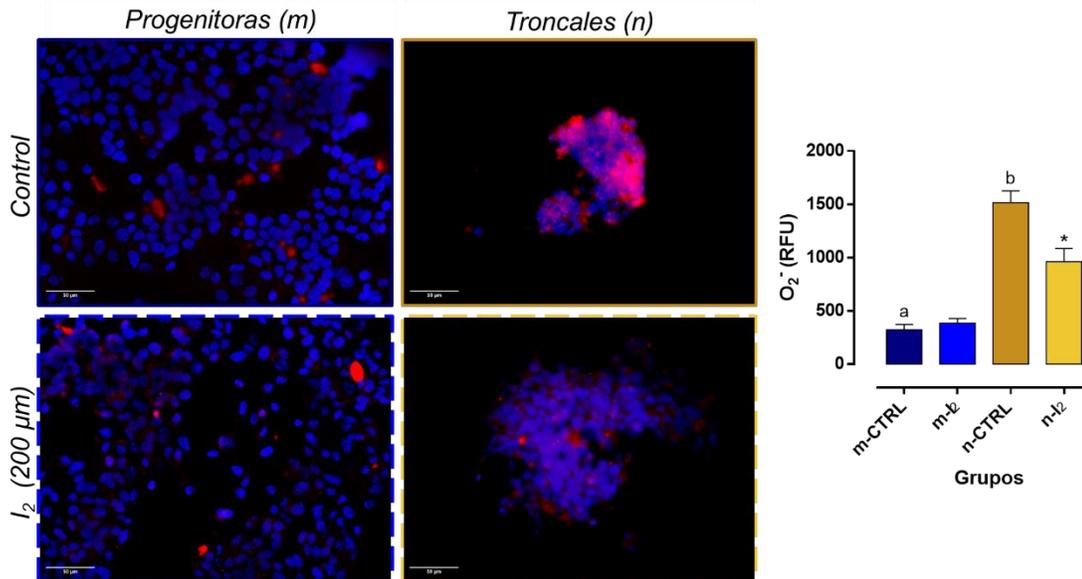


Figura 12. Efecto del I₂ 200 μM en el contenido de ion superóxido (O₂⁻) en cultivos en monocapa (m) y neuroesferas (n) mediante la sonda MitoSOX, cuantificado en Unidades de Fluorescencia Relativa (RFU) y micrografías (objetivo 40X) tomadas en microscopio de epifluorescencia. La barra de escala corresponde a 50 μm. Los datos se expresan como media ± DE (n=3 ensayos independientes por triplicado). El asterisco indica diferencia estadística significativa comparado con su respectivo control y letras distintas son significativamente diferentes entre modelos sin tratamiento (p<0.05, prueba de Tukey).

5.5. Efecto del I₂ en la expresión de Nrf2

Para analizar el efecto del tratamiento con I₂ sobre la activación de una vía de señalización antioxidante, se cuantificó la expresión génica de NRF2 (Figura 13, gráfica izquierda). El análisis de ARNm de NRF2 mostró que, en condiciones basales, las neuroesferas presentan niveles 4.6 veces menores en comparación con las progenitoras, pero que el suplemento de I₂ incrementa su expresión en ambos tipos celulares (46.34 m-I₂ vs 31.17 m-CTRL; 18.24 n-I₂ vs 6.77 n-CTRL, copias/μL).

Posteriormente, se verificaron los niveles de expresión proteicos de Nrf2 (Figura 13, gráfica derecha y micrografías). Los resultados indican que la proteína Nrf2 se encuentra 5 veces menos expresada en CSC con respecto a las células progenitoras (137.2 n-CTRL vs 704.7 m-CTRL, RFU), aunado a ello, el tratamiento con I₂ induce un aumento no significativo en la expresión de Nrf2 (indicada por fluorescencia amarilla, anticuerpo 1° anti-Nrf2, 2° Alexa Fluor 546) tanto en células progenitoras (1026.0 m-I₂ vs 704.7 m-CTRL, RFU) como en troncales (163.1 n-I₂ vs 137.2 n-CTRL, RFU).

La Figura 14a, muestra la mezcla de los canales DAPI/Nrf2 que origina una coloración lila cuando están superpuestos. En ambos modelos sin tratamiento, algunos núcleos celulares presentan superposición de ambos canales, así como el conjunto de capas en las neuroesferas, indicado por la flecha roja. El número de células con núcleos lila (canales superpuestos) aumentó en ambos grupos experimentales luego de la suplementación con I₂.

Para analizar detalladamente la localización Nrf2, se hizo un análisis de colocalización mediante la delimitación de los núcleos con DAPI, de esta manera, se cuantificó la cantidad de RFU amarilla presente en los núcleos delimitados. Los resultados mostrados (Figura 14b) indicaron que, en concordancia con el resultado anterior, en condiciones control la localización nuclear de Nrf2 fue casi 3.5 veces menor en las neuroesferas. Por otro lado, el tratamiento con I₂ aumentó de manera significativa la localización de la proteína Nrf2 en el núcleo en ambos modelos (1051.0 m-I₂ vs 711.5 m-CTRL; 478.5 n-I₂ vs 204.8 n-CTRL, RFU).

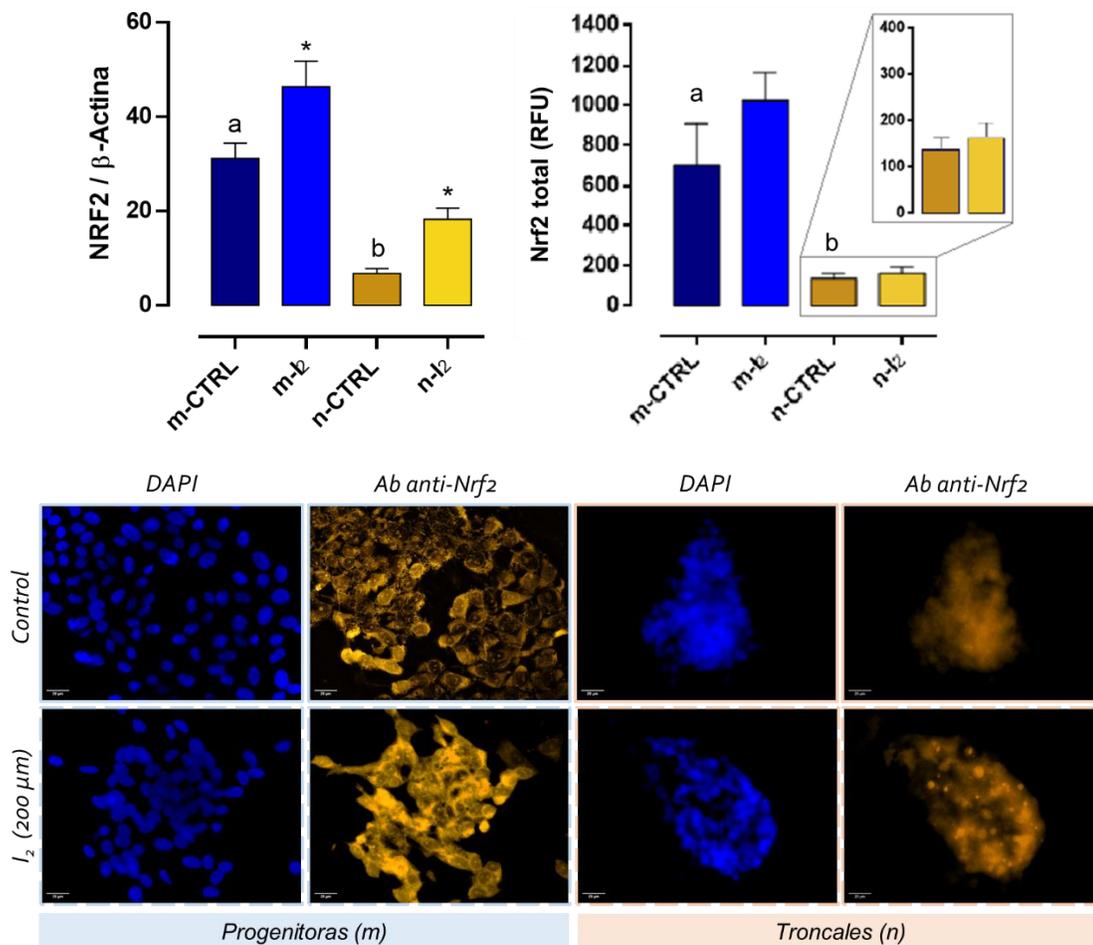


Figura 13. Efecto del I₂ 200 μ m en la expresión génica y proteica de Nrf2 en cultivos en monocapa (m) y neuroesferas (n) empleando el Ab anti-Nrf2 (fluorescencia amarilla) y localización del núcleo (fluorescencia azul). La cuantificación se presenta en Unidades de Fluorescencia Relativa (RFU) y microfotografías (objetivo 40X) tomadas en microscopio de epifluorescencia. La barra de escala corresponde a 20 μ m. Los datos se expresan como media \pm DE (n=3 ensayos independientes por triplicado). El asterisco indica diferencia estadística significativa comparado con su respectivo control y letras distintas son significativamente diferentes entre modelos sin tratamiento (p<0.05, prueba de Tukey).

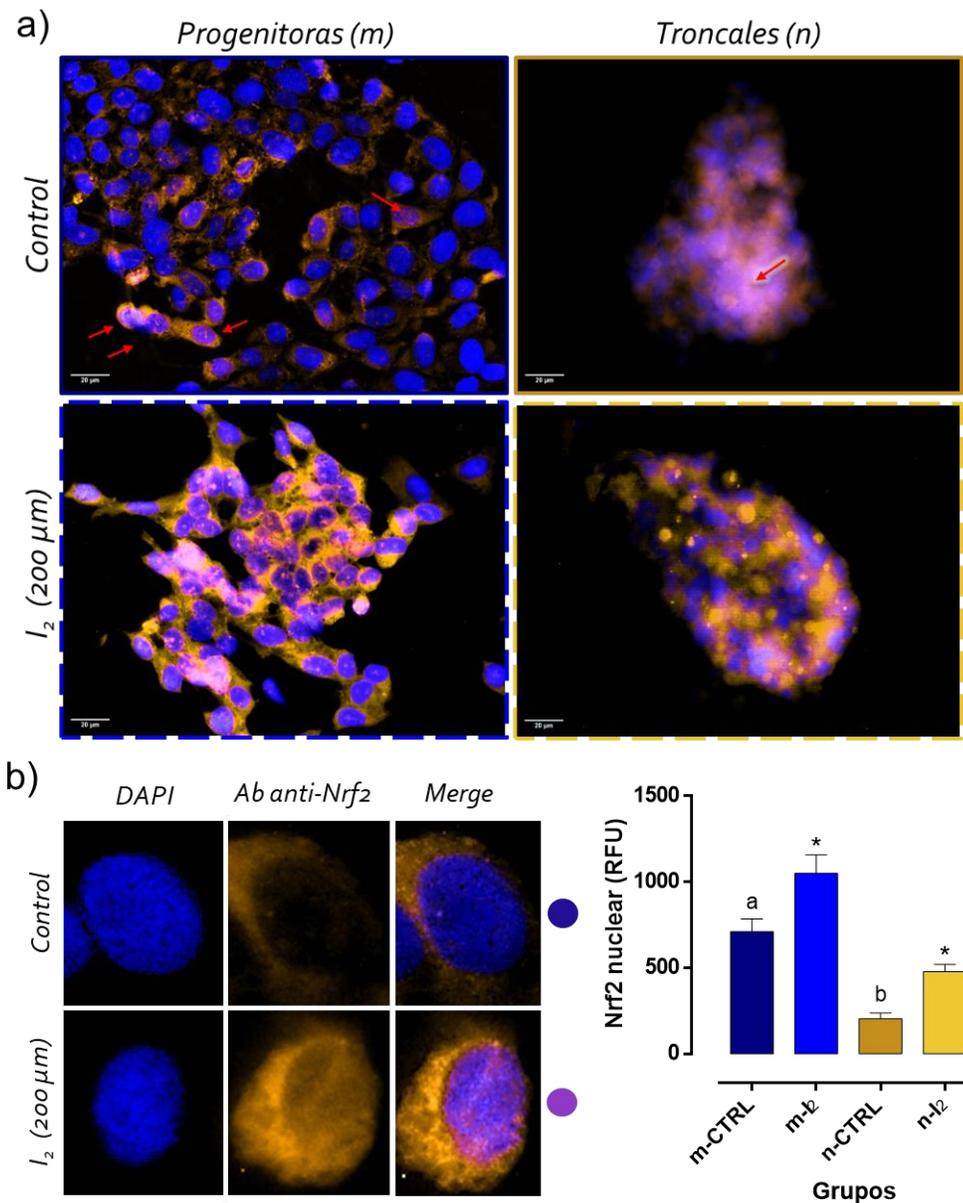


Figura 14. Efecto del I₂ 200 μm en la traslocación de Nrf2 en cultivos en monocapa (m) y neuroesferas (n) empleando el Ab anti-Nrf2 (fluorescencia amarilla) y localización del núcleo (fluorescencia azul). a) micrografías representativas (objetivo 40X) tomadas en microscopio de epifluorescencia. b) Localización nuclear detallada y cuantificación de Unidades de Fluorescencia Relativa (RFU). La barra de escala corresponde a 20 μm. Los datos se expresan como media ± DE (n=3 ensayos independientes por triplicado). El asterisco indica diferencia estadística significativa comparado con su respectivo control y letras distintas son significativamente diferentes entre modelos sin tratamiento (p<0.05, prueba de Tukey).

5.6. Expresión de genes implicados en la respuesta antioxidante

Para determinar si la localización nuclear de Nrf2 promovió la transcripción de sus genes blanco relacionados con respuesta antioxidante, se analizaron los ARNm de SOD2 y CAT en todos los grupos experimentales (Figura 15). La expresión de ambos genes es considerablemente mayor en las células progenitoras (m) respecto a las CSC y, tras exponerse a 200 μ M de I₂, solo se promovió un aumento significativo de SOD2 (18.47 m-I₂ vs 9.27 m-CTRL, copias/ μ L) en el modelo monocapa, sin mostrar cambios en CAT.

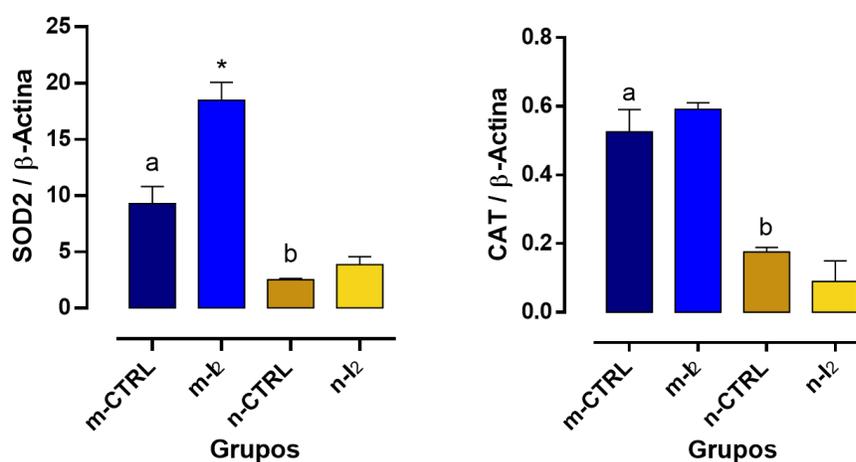


Figura 15. Efecto del I₂ 200 μ M en la expresión de transcritos (ARNm) relacionados con la respuesta antioxidante (SOD2 y CAT) en cultivos en monocapa (m) y neuroesferas (n), mediante q-PCR. Los datos se expresan como media \pm DE (n=3 ensayos independientes por triplicado). El asterisco indica diferencia estadística significativa comparado con su respectivo control y letras distintas son significativamente diferentes entre modelos sin tratamiento ($p < 0.05$, prueba de Tukey).

5.7. Expresión de genes de control mitocondrial y autofagia

Para determinar si la localización nuclear de Nrf2 promovió la transcripción de sus genes blanco relacionados con control mitocondrial se cuantificó PINK1 y LC3 (implicados en el proceso de autofagia).

En la Figura 16, se muestra que PINK1 se expresó 5 veces más en las células en monocapa que en neuroesfera (2.22 m-CTRL vs 0.44 n-CTRL, copias/ μ L), sin

embargo, tras administrarse el tratamiento de I₂ se duplicó significativamente con respecto a su condición basal en ambos modelos (3.85 m-I₂, 1.59 n-I₂, copias/μL). Por otro lado, el nivel basal de ARNm de LC3 es similar en las poblaciones celulares y el suplemento de I₂ induce su sobreexpresión en ambos modelos (0.021 m-CTRL vs 0.044 m-I₂; 0.016 n-CTRL vs 0.071 n-I₂, copias/μL) siendo más evidente en las células troncales.

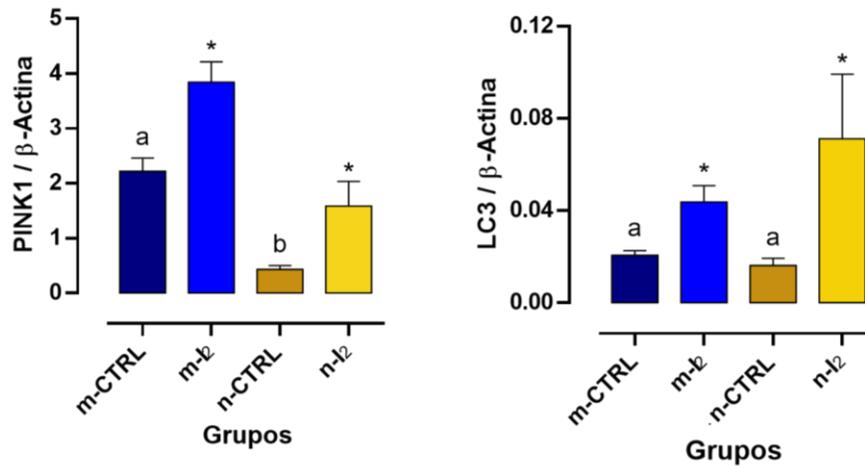


Figura 16. Efecto del I₂ 200 μM en la expresión de transcritos (ARNm) relacionados con control mitocondrial (PINK1) y autofagia (LC3) en cultivos en monocapa (m) y neuroesferas (n), mediante q-PCR. Los datos se expresan como media ± DE (n=3 ensayos independientes por triplicado). El asterisco indica diferencia estadística significativa comparado con su respectivo control y letras distintas son significativamente diferentes entre modelos sin tratamiento (p<0.05, prueba de Tukey).

6. DISCUSIÓN

Diversos estudios se han centrado en el análisis de las poblaciones que forman la diversidad celular presente en un tumor y, en particular, de células troncales cancerosas (CSC), que tienen capacidades tumorigénicas, invasivas y de quimiorresistencia (Melzer y col., 2017). La proporción de CSC es variable según el tipo de tumor y el estadio, y aunque componen menos del 10% del total, su estudio se ha enfocado en comprender los mecanismos que les confieren su capacidad de sobrevivencia y la manera de disminuirlas o erradicarlas. Se ha demostrado que los cultivos esferoidales se enriquecen de células similares a CSC y son un buen sistema para evaluar las características relacionadas con CSC de tumores sólidos *in vitro* (Lombardo y col., 2015; Bigoni-Ordóñez y col., 2018).

El estudio del metabolismo mitocondrial se ha vuelto un blanco terapéutico contra el cáncer por lo que apuntar a las vías de señalización redox y apoptóticas, así como la homeostasis de ROS es de gran relevancia (Dong y col., 2020). Diferentes investigaciones se han enfocado en proponer compuestos naturales que disminuyan la quimiorresistencia (generalmente debida a CSC) y reduzcan los efectos tóxicos de las terapias convencionales. El I₂ ejerce efectos antineoplásicos significativos en varios modelos de cáncer y se ha demostrado que múltiples mecanismos podrían mediar sus acciones (Aceves y col., 2021). El objetivo de esta investigación se centró en estudiar los mecanismos de la vía mitocondrial en células troncales cancerosas de NB humano.

Se ha estudiado el efecto del I₂ sobre genes relacionados con la EMT, quimiorresistencia y troncalidad de las CSC. En la glándula mamaria, las células madre derivadas de EMT, que son fenotípicamente similares a las CSC, expresan altos niveles de CD44 y forman mamosferas (Huang y col., 2022). Asimismo, en un modelo de cáncer de mama *in vitro*, se reportó una regulación negativa de las subpoblaciones CD44⁺/CD24⁺ y de E-cadherina⁺/vimentina⁺ en células MCF-7 resistentes a Doxorubicina, un potente agente anticancerígeno (perfiles correlacionados con quimiorresistencia), después del tratamiento con I₂ 200 µM por 72 h (Bontempo y col., 2017). Mendieta y col., utilizando la línea celular MDA-MB231

(triple negativo y con un potencial invasivo elevado), evaluaron la expresión de los genes CD44 y Vimentina, mientras que *in vivo*, analizaron las proteínas CD24, CD44 y VEGF en xenoinjertos de ratones desnudos (Foxn1 nu/un). Por otro lado, en CC de cuello uterino en cervoesfera (HeLa y SiHa), se analizaron los genes de troncalidad OCT-4, NANOG y SOX2. Todos los marcadores disminuyeron significativamente en presencia de I₂ (Mendieta y col., 2019; Bigoni-Ordóñez y col., 2018).

Se ha descrito que únicamente aquellas células con propiedades troncales son capaces de perdurar en condiciones de baja adherencia y carente en factores de diferenciación, formando cuerpos esféricos en suspensión, a diferencia del resto de las células que bajo este ambiente mueren por anoikis, una muerte celular programada inducida por el desprendimiento celular de la matriz extracelular que evita la readhesión a una matriz inapropiada y la colonización de órganos distantes (Paoli y col., 2013). Los modelos en esferoides 3D se pueden considerar como pequeñas matrices extracelulares suspendidas que posibilitan que varios subtipos celulares con características no troncales (con menor tiempo de duplicación) se adhieran y persistan, haciendo que, a medida que transcurre el tiempo, se reduzca la proporción de CSC presentes. Un claro ejemplo de lo anterior fue reportado por Rodríguez-Gómez, donde se observó que en las mamosferas se disminuye significativamente la tasa de replicación alrededor del 50% en contraste con el modelo progenitor en monocapa y se sugirió que podría deberse a que las CSC pueden posicionarse en la Fase G₀ del ciclo celular (estado quiescente o arresto celular) (Rodríguez-Gómez, 2017). Nuestros resultados muestran una disminución del ~20% en la tasa de proliferación con respecto al grupo en monocapa después de 120 h, lo cual fue evaluado empleando el colorante de exclusión azul tripano, donde las células viables no absorben colorantes impermeables, a diferencia de las células muertas que si son permeables y absorben este colorante (Tennant, 1964).

La dosis utilizada de I₂ fue de 200 µM, esta había sido reportada previamente para ejercer efectos significativos (inducción de vías apoptóticas, disminución de la viabilidad y disrupción del MmpΨ) en la línea celular SK-N-BE(2) a partir de las 72 h (Álvarez-León y col., 2021; Mendieta y col., 2020). Estos datos correlacionan con los

resultados mostrados en esta misma línea celular por los autores mencionados, donde sin importar la agresividad del modelo de neuroblastoma [SK-N-BE(2) > SK-N-AS > SH-SY5Y] se observó el mismo efecto. Igualmente, los cultivos en monocapa de las líneas celulares HeLa y SiHa, mostraron que la suplementación con una dosis 200 μ M de I₂ (24 h) inhibe su proliferación (Bigoni-Ordóñez y col., 2018).

Por otro lado, en este estudio, la suplementación con I₂ además de disminuir la formación de neuroesferas a partir de las 96 h produce una reducción significativa de la viabilidad desde las 72 h. Los estudios en esferoides enriquecidos con CSC, describen que el tratamiento disminuyó únicamente la formación de cervoesferas HeLa y, aunque se observaron células muertas, no hubo efectos importantes sobre la viabilidad en este modelo (Bigoni-Ordóñez y col., 2018). La disminución de la proliferación observada en células progenitoras y CSC empleadas en este trabajo pueden asociarse al efecto indirecto del I₂ (Figura 17a) que implica la activación de PPAR γ y la posterior inducción de señales de muerte celular. En una investigación realizada en un modelo de cáncer de mama (células MCF-7) se reportó que las células tratadas con yodo se redondearon y se separaron del sustrato, indicando que el yodo no solo inhibe el crecimiento, sino que también induce la muerte celular.

En los resultados aquí expuestos se observó una disminución de los niveles de Bcl-2 y una regulación positiva de Bax de manera consistente con otros trabajos, el índice proapoptótico Bax/Bcl-2 (qPCR), que apunta a la activación de la vía de las caspasas, aumentó significativamente tras 48 h de suplementación con I₂ (Álvarez-León y col., 2021). Durante la apoptosis, el equilibrio intracitosólico de los miembros de la familia Bcl-2 es esencial para conservar la integridad de la membrana mitocondrial (Shrivastava y col., 2006). Apuntar hacia las proteínas de la familia Bcl-2 ha sido empleado como una estrategia anticancerígena (disminución de BCL-2 y aumento de BAX).

Previo a este estudio, se confirmó que PPAR γ reduce la viabilidad de las células SK-N-BE(2) ya que el suplemento con el agonista rosiglitazona (RGZ) 1 μ M disminuyó su proliferación. No obstante, el antagonista de PPAR γ GW-9962 inhibió

completamente los efectos de la RGZ y de manera parcial los del I₂, sugiriendo la participación de otras vías mediadoras de los efectos de este halógeno (Mendieta y col., 2020).

En este sentido, Shrivastava y colaboradores reportaron la inducción de apoptosis por I₂ de manera independiente a la activación de caspasas, explicada por la translocación del factor inductor de apoptosis (AIF) de la mitocondria al núcleo y la posterior fragmentación de ácidos nucleicos (Figura 17b), así como el agotamiento del contenido de tiol celular; nuestros resultados sugieren que dicha vía participa sólo en las células progenitoras, ya que AIF aumenta significativamente en el grupo tratado con I₂ (qPCR). Además, el análisis de MmpΨ con la sonda MitoTracker mostró que se elevó un 33.6% en aquellas células con metabolismo basal moderado (progenitoras) tratadas con I₂. La liberación de las moléculas inductoras de la apoptosis (AIF y citocromo c) por las mitocondrias requiere de la desregulación sostenida del potencial de membrana mitocondrial (MmpΨ), este cambio, así como un estado redox celular alterado, son los primeros cambios en la apoptosis mediada por mitocondrias. Además, el MmpΨ es necesario para diversas funciones mitocondriales como la importación de proteínas, la producción de ATP y la regulación del transporte de metabolitos (Shrivastava y col., 2006; Aceves y col., 2021).

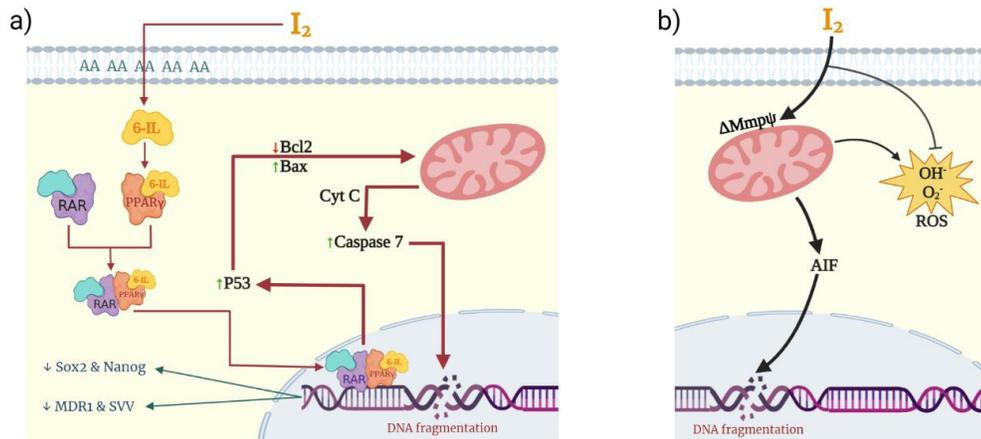


Figura 17. Vía de acción del I₂, a) Indirecta: inducen señales apoptóticas dependiente de caspasas (flechas en rojo), de diferenciación y disminución de quimiorresistencia. b) Directa: ruptura del MmpΨ y activación de muerte independiente de caspasas mediante AIF. Modificada de Aceves y col., 2021.

Como se expresó previamente, las células cancerosas (CC) poseen mitocondrias distintas respecto a las células normales, tanto en estructura como en función y varios estudios describieron que las células derivadas de carcinoma (como cáncer de mama, cáncer de próstata, melanomas, etc.) presentan un Mmp Ψ más elevado que las células epiteliales normales (>60 mV). Aunque aún hay discrepancias en la determinación del fenotipo mitocondrial en las CSC, diversas investigaciones han indicado que las CSC poseen diferencias respecto a ambas poblaciones celulares (normales y cancerosas), incluido el Mmp Ψ y especies reactivas de oxígeno (ROS). Por ejemplo, Zhang y col. determinaron que las CSC tienen un Mmp Ψ más alto que otras poblaciones celulares (Zhang y col., 2015). Esos datos coinciden con lo obtenido en el análisis con sondas MitoTracker, donde las células troncales cancerosas exhibieron un Mmp Ψ 2.5 veces más elevado que células progenitoras.

Adicionalmente, el I₂ actúa directamente sobre las mitocondrias de ambas poblaciones desestabilizando el Mmp Ψ ; elevándolo aquellas células con metabolismo basal moderado (progenitoras) y disminuyéndolo en un 21.2% en las de metabolismo basal aumentado (CSC). En concordancia, un estudio de nuestro laboratorio en 2021 arrojó hallazgos importantes sobre la vía mitocondrial directa del I₂ en la línea celular SK-N-BE(2) en monocapa, donde el tratamiento produjo un rápido y significativo incremento en la permeabilidad mitocondrial desde 12-48 h (Álvarez-León y col., 2021).

De manera similar, otros modelos progenitores de NB humano (SK-N-AS y SH-SY5Y) exhibieron una actividad mitocondrial basal similar y 200 μ M de I₂ generó una activación significativa (doble) de la señal de MitoTracker solo en SK-N-AS, lo que indica una sensibilidad mitocondrial diferencial en cada línea celular (Mendieta y col., 2020). También en modelos de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231) se observó que la suplementación con I₂ va acompañada de la disipación del Mmp Ψ en donde podría estar implicada la oxidación de los grupos tioles, un desencadenante de la liberación de factores mitocondriales relacionados con apoptosis (Aceves y col., 2021).

Se ha descrito que las mitocondrias son la principal fuente de ROS debido a la Cadena Transportadora de Electrones (ETC) de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) llevada a cabo en la membrana mitocondrial interna, donde el 0.1 al 1% de todo el oxígeno consumido pierde un electrón dando origen al radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y generalmente se produce en los complejos I y III de la ETC; éste se convierte en H_2O_2 (peróxido) por la enzima superóxido dismutasa (SOD) o dismutación espontánea y, de manera posterior, la enzima catalasa (Cat) dismuta el peróxido producido por SOD y otros enzimas, produciendo agua y O_2 . Otra importante fuente celular de ROS es la familia de las NADPH oxidasas (NOX) activadas, que resultan en un mayor consumo de oxígeno.

En las CC, las ROS se generan también en el retículo endoplásmico y las membranas celulares; asimismo obtienen energía principalmente de la glucólisis en condiciones aeróbicas (efecto Warburg), produciendo un aumento de los niveles de ROS, los cuales son contrarrestados por mecanismos de defensa antioxidantes elevados; a pesar de esto, siguen siendo más altos que en las células normales. Cuando las concentraciones de ROS son apropiadas promueven la tumorigénesis y la progresión, pero en cantidades más altas inducen muerte celular; estas alteraciones en el estado redox celular pueden deberse ya sea a un aumento en la producción de ROS o a la disminución de su eliminación (Ding y col., 2015; Yilmazer, 2017; Lendeckel y Wolke, 2022).

Por otro lado, los tumores son altamente heterogéneos y contienen un diverso microambiente donde se incluye a las CSC que, a diferencia de las CC diferenciadas que dependen de la glucólisis, muestran un fenotipo metabólico distinto (glucolítico o de OXPHOS) según el tipo de cáncer; y generalmente exhiben una gran regulación (neutralización) de las concentraciones de ROS, que son importantes para la señalización celular, quimiorresistencia y la recurrencia del tumor (Sancho y col., 2016; Lendeckel y Wolke, 2022). Aunque la mayoría de las investigaciones describen que las CSC mantienen bajos los niveles de ROS, ya sea por mitocondrias menos maduras relativamente inactivas (quiescentes) o por las defensas antioxidantes mejoradas, que participan en el mantenimiento de la troncalidad, muchas otras

apuntan a que su metabolismo altamente plástico les permite sobrevivir en condiciones de estrés metabólico cambiando fácilmente entre OXPHOS y glucólisis. De hecho, Raggi y col. reportaron que la maquinaria para la glucólisis estaba más desarrollada en las células de colangiocarcinoma en monocapa que en esferoides, donde el intercambio metabólico a OXPHOS hace que las CSC sean resistentes a la inhibición de la glucólisis, proporcionando a las células una mayor independencia de los nutrientes del microambiente.

Además, el coactivador 1-alfa de PPAR γ (PGC-1 α), un regulador clave de biogénesis mitocondrial, mejora la OXPHOS en muchas células cancerosas altamente invasivas y malignas (Raggi y col., 2021). A pesar de que los resultados de MitoSOX no mostraron cambios en las concentraciones de O $_2^{\cdot-}$ en células progenitoras (antes y después del tratamiento), fue notorio que las CSC poseían 4.7 veces más elevadas este tipo de ROS, sugiriendo que en esta población celular poseen una OXPHOS potenciada. En concordancia, células de glioblastoma (tumor cerebral del Sistema Nervioso Central) en proliferación exhiben una mayor glucólisis citoplasmática en comparación con las CSC, demostrando que utilizan tanto OXPHOS como la glucólisis, ya que cambian entre "estados" inactivos y de proliferación, respectivamente; donde se sugiere que las CSC inactivas dependen en gran medida de OXPHOS para mantener la troncalidad (Iranmanesh y col., 2021). Smith y col. describieron que las células BE(2)-C, un clon de las células SK-N-BE(2) con amplificación de MYCN, satisfacen sus necesidades energéticas a través de la OXPHOS, aumentaron los niveles de ROS y disminuyeron en un 85% la producción de ATP, sustentando la discusión de este resultado (Smith y col., 2008).

Nrf2 es un factor inductor de la respuesta antioxidante ante factores endógenos y exógenos que causan estrés y desencadenan la expresión de enzimas antioxidantes protectoras de fase II, como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (Cat) mediante su unión a los elementos de respuesta antioxidante, ARE (Kitamura y Motohashi, 2018). Se ha informado que Nrf2 juega un papel importante en el mantenimiento de CSC y la consecuente quimiorresistencia, sin embargo, los resultados en este trabajo son consistentes y sugieren un papel contrario,

dependiendo el modelo y contexto celular; es decir, se observó que en los grupos tratados con I₂ se disminuye la viabilidad, se aumenta el índice proapoptótico y se exhibe un aumento en la expresión génica y en la translocación nuclear de la proteína Nrf2.

Recientemente se propuso un mecanismo de acción novedoso por el cual el yodo brinda protección a la piel, basado en su naturaleza electrofílica, donde se demuestra que tanto el yodo como el yoduro son capaces de activar la vía Nrf2 a través de la yodación de la proteína rica en cisteína Keap1, que libera y promueve la translocación nuclear de este factor (Ben-Yehuda y col., 2017; Aceves y col., 2021). Las defensas antioxidantes se encontraron casi 3 veces más expresadas en el modelo en monocapa a nivel basal (ARNm de SOD2 y Cat) y es evidente el papel protector del I₂ en el modelo de células progenitoras ya que duplicó la expresión génica de SOD2. Si bien es cierto que no se observaron cambios significativos en CAT, se aprecia una ligera reducción en CSC luego de la suplementación con I₂ y se ha informado que la eliminación selectiva de esta enzima, durante una muerte celular autofágica, provoca un daño celular irreversible (Maiuri y col., 2007). La disminución del superóxido en las neuroesferas tras la suplementación podría asociarse a la neutralización directa del yodo molecular, aunque también se ha descrito que las ROS pueden ser disminuidas por una regulación al alza de otros sistemas de captación de radicales libres, como el glutatión o GSH (Ding y col., 2015; Aceves y col., 2021).

La quinasa 1 inducida por PTEN (PINK1), otro de los genes blanco de Nrf2 regulado en condiciones de estrés oxidativo, es un factor esencial para el control de calidad mitocondrial debido a que, cuando las mitocondrias se dañan y pierden el Mmp Ψ , Pink1 se acumula en la membrana externa de las mitocondrias despolarizadas, luego recluta a Parkin (una ubiquitina ligasa E3 citosólica) y ésta puede mediar su eliminación autofágica (Park y col., 2017). Esto coincide con los resultados presentados, donde la desregulación del Mmp Ψ coincide con el aumento en la expresión de Pink1. Los resultados en un modelo de NB (células SH-SY5Y) indican que la expresión de PINK1 está regulada positivamente por NRF2 y que el eje de

señalización NRF2-PINK1 está involucrado en la supervivencia celular (Murata y col., 2015). La autofagia es un mecanismo de degradación celular mediante el cual las células, en condiciones estresantes, reciclan macromoléculas y orgánulos para generar energía, y puede actuar como un proceso tanto para supervivencia como para muerte (dependiendo del tejido y microambiente); de igual manera, se sabe que la mitofagia es importante en la homeostasis y función mitocondrial adecuada al eliminar las mitocondrias dañadas, sin embargo, cuando se activa de manera persistente y/o excesiva es una causa importante de disfunción mitocondrial y puede conducir a la autodestrucción de una CC, jugando un arma de doble filo (Yin y col., 2018; Bata y Cosford, 2021).

Los autofagosomas, vesículas multimembrana, modulan la actividad de la autofagia; dichas vesículas están reguladas por la proteína LC3 asociada a microtúbulos, por lo que se considera un marcador autofagosómico (Wei y col., 2018). Los hallazgos encontrados en este estudio sugieren que, dependiendo el estado metabólico de las células tratadas, la activación de Nrf2 por el yodo molecular desencadena señales diferenciales, ya sea de respuesta antioxidante (progenitor) y/o de autofagia (ARNm de PINK1 y LC3) en células progenitoras y CSC. Desde 2011 se exploró el papel del I₂ en la autofagia, donde se emplearon células MDA-MB-231 y 3 µM de I₂ produjo muerte celular no apoptótica además de que mejoró las características de la autofagia, a su vez, en conjunto con un inhibidor de esta vía (cloroquina a 20 µM) se observaron aumentos en la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Singh y col., 2011). Si bien en este trabajo no se evaluaron los niveles de Pink1 y LC3 (ARNm) a través del tiempo para corroborar una autofagia extensa, los resultados son consistentes con la inducción de muerte celular.

No se conoce con certeza el mecanismo por el que el I₂ induce la translocación de Nrf2, no obstante, se ha propuesto que los grupos tioles pueden ser oxidados por reactivos como el bromo o yodo, por lo que una ruta podría ser que la yodación de los grupos tiol de las cisteínas de Keap1, produzcan la liberación de Nrf2 que, en condiciones basales, se encuentra arrestada por Keap1 en el citosol (Kasai y col., 2020). En este trabajo creemos que los resultados observados podrían asociarse a

este mecanismo debido a que, por rapidez, sería de los primeros procesos en ocurrir, aun así, se requieren más estudios que analicen esta hipótesis. Es bien conocido que una condición de estrés celular por sí misma promueve la translocación nuclear de Nrf2. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la expresión nuclear de Nrf2 en nuestro modelo es independiente de la concentración de ROS, ya que se observaron menores niveles basales de ROS en las células progenitoras con respecto a las células troncales cancerosas, sumado a que el tratamiento con I₂ produce una reducción de las ROS en esta población.

Por otro lado, se ha informado que PPAR γ mantiene una retroalimentación positiva mutua con Nrf2 (Vella y col., 2016). Se sabe que la 6-IL promueve la sobreexpresión de los PPAR γ en las células de neuroblastoma, esto podría inducir la sobreexpresión génica de Nrf2 en nuestros modelos; sin embargo, otros experimentos con antagonistas específicos de PPAR γ (como rosiglitazona) podrían dar información sobre su porcentaje de participación en esta sobreexpresión. También se ha encontrado que la glucógeno sintasa quinasa-3 β (GSK-3 β) es un elemento modulador de la respuesta al estrés oxidativo de Nrf2, GSK-3 β funciona como inhibidor, tanto directamente en la activación como indirectamente en la postinducción de Nrf2, por lo que esta podría ser otra vía modulada por el I₂ (Culbreth y Aschner, 2018; Wu y col., 2020).

En los últimos años, con el objetivo de proponer mejores agentes terapéuticos, se han identificado a los “mitocanos” de diferentes clases, diseñados para dirigirse exclusivamente a mitocondrias de CC en varias maneras. Éstos se han enfocado a elevar el estrés oxidativo, desestabilizar la membrana mitocondrial y finalmente inducir apoptosis mediada por mitocondrias. Se ha observado que la hiperpolarización del Mmp Ψ puede potenciar la captación selectiva de los fármacos y ésta podría asociarse al aumento de los niveles intracelulares de calcio (Ca²⁺) y la regulación positiva de Bcl-2; en contraste, una pérdida del Mmp Ψ permeabiliza la liberación de factores proapoptóticos (Mani y col., 2020). De este modo, se sugirió al I₂ como un mitocano ya que en CC promueve la desestabilización del Mmp Ψ y modula las proteínas Bax/Bcl-2, desencadenando apoptosis (Álvarez-León y col.,

2021). De forma similar, la curcumina, entre otros componentes naturales (Cuadro 2), posee efectos antioxidantes que participan en la prevención del cáncer, disminuye la autorrenovación y la supervivencia de las células progenitoras y CSC (Gersey y col., 2017). Asimismo, la Doxorrubicina indujo mitofagia (aumento de los marcadores de autofagosomas, LC3) por la vía PINK1/Parkin (Ying y col., 2018). En nuestro modelo, el I₂ actúa como mitocano promoviendo la desestabilización del Mmp Ψ independientemente del metabolismo celular, aumentando el índice Bax/Bcl-2 y sobreexpresando marcadores de autofagia (PINK1 y LC3).

Cuadro 2. Agentes naturales como mitocanos. Modificado de Mani y col., 2020.

Agente natural (fuente)	Modo de acción	CdM	Status (2020)
Curcumina (Cúrcuma <i>longa</i>)	↑ Bax, ↓ Bcl-2 y pérdida del Mmp Ψ	1 y 2	Estudio <i>in vitro</i>
Berberina (<i>Coptidis rizoma</i>)	↓ el nivel de expresión de Bcl-2, ↑ producción de ROS y Ca ²⁺ , pérdida de la permeabilidad de la membrana mitocondrial	2	Estudio <i>in vitro</i>
Flavokawain A (<i>Piper methysticum</i>)	Induce la apoptosis dependiente de mitocondrias al aumentar la expresión de Bax	2	Estudio <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>
Isotiocianatos de fenetilo (verduras crucíferas)	Inducción de estrés oxidativo y flujo de Ca ²⁺ (mecanismos de muerte celular mitocondrial)	3	Ensayo clínico fase I
Isotiocianato de bencilo (brassicas)	Apoptosis intrínseca mediada por la producción de ROS y la disfunción mitocondrial	3	Estudio <i>in vitro</i>
Bezielle (<i>Scutellaria barbata</i>)	Inhibe la glucólisis y OXPHOS al ↑ el nivel de ROS	3	Estudio <i>in vitro</i>
CdM: Clase de mitocano. Clase 1: inhibidores de hexoquinasa; Clase 2: miméticos de BH3 y agentes relacionados que alteran la función de las proteínas de la familia Bcl-2 antiapoptóticas; Clase 3: Inhibidores redox de tiol			

El metabolismo de las CSC es importante no solo para el mantenimiento de la troncalidad, sino que también participa en la heterogeneidad tumoral, lo que finalmente contribuye al fracaso de los tratamientos contra el cáncer (Raggi y col., 2021). Las controversias en este campo de investigación emergente pueden

7. CONCLUSIONES

- La suplementación con I₂ (200 µM por 48 h) disminuye la proliferación celular de células progenitoras y CSC.
- El I₂ reduce la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y aumenta la expresión de la proteína proapoptótica Bax, en células progenitoras y troncales induciendo apoptosis.
- El mecanismo directo del I₂ parece ser específico para cada modelo; en células progenitoras promueve un aumento de MmpΨ, AIF, NRF2 y SOD2, en células troncales hay una disminución de O₂⁻ y aumento de NRF2.
- El I₂ promueve autofagia celular (desregulación de MmpΨ, PINK1, LC3) mediada por la vía de Nrf2.

Estos datos sugieren que el I₂ induce vías antioxidantes, apoptóticas y/o autofágicas, dependiendo del estado metabólico de las células de neuroblastoma. Es necesario realizar más ensayos que permitan comprender el papel del I₂ como mitocano antineoplásico y comprender sus mecanismos directos por los que promueve sus efectos.

8. REFERENCIAS

- Aceves** C, Mendieta I, Anguiano B, Delgado-González E. Molecular Iodine Has Extrathyroidal Effects as an Antioxidant, Differentiator, and Immunomodulator. *International journal of molecular sciences*. **2021**;22(3):1228.
- Álvarez-León** W, Mendieta I, Delgado-González E, Anguiano B, Aceves C. Molecular Iodine/Cyclophosphamide Synergism on Chemoresistant Neuroblastoma Models. *International journal of molecular sciences*. **2021**;22(16):8936.
- Babaei** G, Aziz SG, Jaghi NZZ. EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. *Biomedicine & pharmacotherapy*. **2021**;133:110909.
- Bakir** B, Chiarella AM, Pitarresi JR, Rustgi AK. EMT, MET, Plasticity, and Tumor Metastasis. *Trends in cell biology*. **2020**;30(10):764-776.
- Bata** N, Cosford N. Cell Survival and Cell Death at the Intersection of Autophagy and Apoptosis: Implications for Current and Future Cancer Therapeutics. *ACS pharmacology & translational science*. **2021**;4(6),1728-1746.
- Ben-Yehuda** GM, Frušić-Zlotkin M, Soroka Y, Ben-Sasson S, Bianco-Peled H, Kohen R. A novel role of topical iodine in skin: Activation of the Nrf2 pathway. *Free radical biology & medicine*. **2017**;104,238-248.
- Bigoni-Ordóñez** GD, Ortiz-Sánchez E, Rosendo-Chalma P, Valencia-González HA, Aceves C, García-Carrancá A. Molecular iodine inhibits the expression of stemness markers on cancer stem-like cells of established cell lines derived from cervical cancer. *BMC Cancer*. **2018**;18(1):928.
- Blikra** MJ, Henjum S, Aakre I. Iodine from brown algae in human nutrition, with an emphasis on bioaccessibility, bioavailability, chemistry, and effects of processing: A systematic review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. **2022**;21(2),1517-1536.
- Bontempo** A., Ugalde-Villanueva B, Delgado-González E, Rodríguez ÁL, Aceves C. Molecular iodine impairs chemoresistance mechanisms, enhances

doxorubicin retention and induces downregulation of the CD44+/CD24+ and E-cadherin+/vimentin+ subpopulations in MCF-7 cells resistant to low doses of doxorubicin. *Oncology reports*. **2017**;38(5):2867–2876.

Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature reviews. Clinical oncology*. **2020**;17(7):395-417.

CCLG. Types of childhood cancer. How common is my child's cancer?. In: *Inglaterra (UK): Children's Cancer and Leukaemia Group*, **2019**.

Cheung NK, Dyer MA. Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nature reviews. Cancer*. **2013**;13(6):397-411.

Chung C, Boterberg T, Lucas J, Panoff J, Valteau-Couanet D, Hero B, Bagatell R, Hill-Kayser CE. Neuroblastoma. *Pediatric blood & cancer*. **2021**;68Suppl 2:e28473.

Culbreth M, Aschner M. GSK-3 β , a double-edged sword in Nrf2 regulation: Implications for neurological dysfunction and disease. *F1000Research*. **2018**;7,1043.

Ding S, Li C, Cheng N, Cui X, Xu X, Zhou G. Redox Regulation in Cancer Stem Cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*. **2015**;750798.

Dong L, Gopalan V, Holland O y Neuzil J. Mitocans Revisited: Mitochondrial Targeting as Efficient Anti-Cancer Therapy. *International journal of molecular sciences*. **2020**;21(21)7941.

Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sánchez-Pérez P, Cadenas S, Lamas S. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology*. **2015**;6:183-197.

Fang E, Wang J, Hong M, Zheng L, Tong Q. Valproic acid suppresses Warburg effect and tumor progression in neuroblastoma. *Biochemical and biophysical research communications*. **2019**;508(1):9-16.

- Filbin M, Monje M.** Developmental origins and emerging therapeutic opportunities for childhood cancer. *Nature medicine.* **2019**;25(3):367-376.
- Fouad YA, Aanei C.** Revisiting the hallmarks of cancer. *American journal of cancer research.* **2017**;7(5):1016-1036.
- Gersey ZC, Rodriguez GA, Barbarite E, Sanchez A, Walters WM, Ohaeto KC, Komotar RJ, Graham RM.** Curcumin decreases malignant characteristics of glioblastoma stem cells via induction of reactive oxygen species. *BMC cancer.* **2017**;17(1),99.
- Hanahan D, Weinberg RA.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* **2011**;144(5):646-674.
- Hanahan D, Weinberg RA.** The hallmarks of cancer. *Cell.* **2000**;100(1):57-70.
- Hanahan D.** Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer discovery.* **2022**;12(1),31-46.
- Huang Y, Hong W, Wei X.** The molecular mechanisms and therapeutic strategies of EMT in tumor progression and metastasis. *Journal of hematology & oncology.* **2022**;15(1),129.
- Iranmanesh Y, Jiang B, Favour OC, Dou Z, Wu J, Li J, Sun C.** Mitochondria's Role in the Maintenance of Cancer Stem Cells in Glioblastoma. *Frontiers in oncology.* **2021**;11,582694.
- Jelic MD, Mandic AD, Maricic SM, Srdjenovic BU.** Oxidative stress and its role in cancer. *Journal of cancer research and therapeutics.* **2021**;17(1)22-28.
- Kasai S, Shimizu S, Tatara Y, Mimura J, Itoh K.** Regulation of Nrf2 by Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Physiology and Pathology. *Biomolecules.* **2020**;10(2):320.

- Kharkar PS.** Cancer Stem Cell (CSC) Inhibitors in Oncology-A Promise for a Better Therapeutic Outcome: State of the Art and Future Perspectives. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2020**;63(24):15279-15307.
- Kitamura H, Motohashi H.** NRF2 addiction in cancer cells. *Cancer Science*. **2018**;109(4):900-911.
- Laforge M, Rodrigues V, Silvestre R, Gautier C, Weil R, Corti O, Estaquier J.** NF- κ B pathway controls mitochondrial dynamics. Cell death and differentiation. **2016**;23(1):89-98.
- Lecca MC, Jonker MA, Abdul UK, Küçükosmanoglu A, van Wieringen W, Westerman BA.** Adrenergic to mesenchymal fate switching of neuroblastoma occurs spontaneously in vivo resulting in differential tumorigenic potential. *Journal of Molecular and Clinical Medicine*. **2018**;1(4), 219-226.
- Lendeckel U, Wolke C.** Redox-Regulation in Cancer Stem Cells. *Biomedicines*. **2022**;10(10),2413.
- Lewandowska AM, Rudzki M, Rudzki S, Lewandowski T, Laskowska B.** Environmental risk factors for cancer - review paper. *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM*. **2019**;26(1):1-7.
- Lin Q, Chen J, Gu L, Dan X, Zhang C, Yang Y.** New insights into mitophagy and stem cells. *Stem cell research & therapy*. **2021**;12(1),452.
- Lombardo Y, de Giorgio A, Coombes CR, Stebbing J, Castellano L.** Mammosphere formation assay from human breast cancer tissues and cell lines. *Journal of visualized experiments*. **2015**;JoVE(97)52671.
- Lu J, Tan M, Cai Q.** The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer letters*. **2015**;356(2Pt A):156-164.
- Lu W, Kang Y.** Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis. *Developmental Cell*. **2019**;49(3):361-374.

- Maiuri** MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature reviews. Molecular cell biology*. **2007**;8(9),741-752.
- Mani** S, Swargiary G, Singh KK. Natural Agents Targeting Mitochondria in Cancer. *International journal of molecular sciences*. **2020**;21(19),6992.
- Melzer** C, von der Ohe J, Lehnert H, Ungefroren H, Hass R. Cancer stem cell niche models and contribution by mesenchymal stroma/stem cells. *Molecular Cancer*. **2017**;16(1):28.
- Mendieta** I, Nuñez-Anita RE, Nava-Villalba M, Zambrano-Estrada X, Delgado-González E, Anguiano B, Aceves C. Molecular iodine exerts antineoplastic effects by diminishing proliferation and invasive potential and activating the immune response in mammary cancer xenografts. *BMC Cancer*. **2019**;19(1):261.
- Mendieta** I, Rodríguez-Gómez G, Rueda-Zarazúa B, Rodríguez-Castelán J, Álvarez-León W, Delgado-González E, Anguiano B, Vázquez-Martínez O, Díaz-Muñoz M, Aceves C. Molecular iodine synergized and sensitized neuroblastoma cells to the antineoplastic effect of ATRA. *Endocrine Related Cancer*. **2020**;27(12):699-710.
- Middelbeek** J, Visser D, Henneman L, et al. TRPM7 maintains progenitor-like features of neuroblastoma cells: implications for metastasis formation. *Oncotarget*. **2015**;6(11):8760-8776.
- Moses** C, Garcia-Bloj B, Harvey AR, Blancafort P. Hallmarks of cancer: The CRISPR generation. *European journal of cancer*. **2018**; 93: 10-18.
- Mowers** EE, Sharifi MN, Macleod KF. (2018). Functions of autophagy in the tumor microenvironment and cancer metastasis. *The FEBS journal*. **2018**;285(10),1751-1766.

- Murata** H, Takamatsu H, Liu S, Kataoka K, Huh NH, Sakaguchi M. NRF2 Regulates PINK1 Expression under Oxidative Stress Conditions. *PloS one*, **2015**;10(11),e0142438.
- Nakagawara** A, Li Y, Izumi H, Muramori K, Inada H, Nishi M. Neuroblastoma. *Japanese journal of clinical oncology*. **2018**;48(3):214-241.
- Oh** JM, Ahn BC. Molecular mechanisms of radioactive iodine refractoriness in differentiated thyroid cancer: Impaired sodium iodide symporter (NIS) expression owing to altered signaling pathway activity and intracellular localization of NIS. *Theranostics*. **2021**;11(13):6251-6277.
- Otte** J, Dyberg C, Pepich A, Johnsen JI. MYCN Function in Neuroblastoma Development. *Frontiers in oncology*. **2021**;10:624079.
- Paoli** P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochimica et biophysica acta*. **2013**;1833(12):3481–3498.
- Park** JH, Ko J, Park YS, Park J, Hwang J, Koh HC. Clearance of Damaged Mitochondria Through PINK1 Stabilization by JNK and ERK MAPK Signaling in Chlorpyrifos-Treated Neuroblastoma Cells. *Molecular neurobiology*. **2017**;54(3):1844-1857.
- Pelizzo** G, Veschi V, Mantelli M, Croce S, Di Benedetto V, D'Angelo P, Maltese A, Catenacci L, Apuzzo T, Scavo E, Moretta A, Todaro M, Stassi G, Avanzini MA, Calcaterra V. Microenvironment in neuroblastoma: isolation and characterization of tumor-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Cancer*. **2018**;18(1):1176.
- Qiu** YH, Zhang TS, Wang XW, Wang MY, Zhao WX, Zhou HM, Zhang CH, Cai ML, Chen XF, Zhao WL, Shao RG. Mitochondria autophagy: a potential target for cancer therapy. *Journal of drug targeting*. **2021**;29(6),576-591.
- Raggi** C, Taddei ML, Sacco E, Navari N, Correnti M, Piombanti B, Pastore M, Campani C, Pranzini E, Iorio J, Lori G, Lottini T, Peano C, Cibella J, Lewinska

- M, Andersen JB, di Tommaso L, Viganò L, Di Maira G, Madiari S, Marra F. Mitochondrial oxidative metabolism contributes to a cancer stem cell phenotype in cholangiocarcinoma. *Journal of hepatology*. **2021**;74(6),1373-1385
- Ravera S**, Reyna-Neyra A, Ferrandino G, Amzel LM, Carrasco N. The Sodium/Iodide Symporter (NIS): Molecular Physiology and Preclinical and Clinical Applications. *Annual review of physiology*. **2017**;79:261-289.
- Renaud CO**, Ziros PG, Chartoumpakis DV, Bongiovanni M, Sykiotis GP. Keap1/Nrf2 Signaling: A New Player in Thyroid Pathophysiology and Thyroid Cancer. *Frontiers in endocrinology (Lausanne)*. **2019**;10:510.
- Reynolds BA**, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. **1992**;255(5052):1707-1710.
- Rodríguez-Gómez GM**. Efecto del yodo molecular en células cancerosas mamarias parentales y troncales [Tesis de maestría, Instituto de Neurobiología, UNAM]. Repositorio institucional de la Universidad Nacional Autónoma de México. **2017**;(web) repositorio.unam.mx/contenidos/123660
- RSC**. Royal Society of Chemistry. Iodine [monografía en internet]. Washington, DC2021 [consultado 2020 noviembre 10]. Disponible en: <https://www.rsc.org/periodic-table/element/53/iodine>
- Sancho P**, Barneda D, Heeschen C. Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *British journal of cancer*. **2011**;114(12),1305-1312.
- Schwartz L**, Supuran CT, Alfarouk KO. The Warburg Effect and the Hallmarks of Cancer. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. **2017**;17(2):164-170.
- Senga SS**, Grose RP. Hallmarks of cancer-the new testament. *Open biology* **2021**;11(1), 200358

- Shaw P**, Chattopadhyay A. Nrf2-ARE signaling in cellular protection: Mechanism of action and the regulatory mechanisms. *Journal of cellular physiology.* **2020**;235(4):3119-3130.
- Sherman H**, Larson B, Gitschier H, Randle D. Neurosphere Formation, Migration, and Differentiation of Human Neural Stem Cells Cultured in Corning Spheroid Microplates. *CORNING.* **2015**;1:2.
- Shrivastava A**, Tiwari M, Sinha RA, Kumar A, Balapure AK, Bajpai VK, Sharma R, Mitra K, Tandon A, Godbole MM. Molecular iodine induces caspase-independent apoptosis in human breast carcinoma cells involving the mitochondria-mediated pathway. *Journal of Biological Chemistry.* **2006**;281(28):19762-19771.
- Siegel RL**, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians.* **2018**;68(1), 7–30.
- Singh P**, Godbole M, Rao G, Annarao S, Mitra K, Roy R, Ingle A, Agarwal G, Tiwari S. Inhibition of autophagy stimulate molecular iodine-induced apoptosis in hormone independent breast tumors. *Biochemical and biophysical research communications.* **2011**;415(1),181-186.
- Smith DJ**, Cossins LR, Hatzinisiriou I, Haber M, Nagley P. Lack of correlation between MYCN expression and the Warburg effect in neuroblastoma cell lines. *BMC cancer.* **2008**;8,259.
- Smith V**, Foster J. High-Risk Neuroblastoma Treatment Review. *Children (Basel, Switzerland).* **2018**;5(9):114.
- Sundar SJ**, Hsieh JK, Manjila S, Lathia JD, Sloan A. The role of cancer stem cells in glioblastoma. *Neurosurgical focus.* **2014**;37(6):E6.
- Tennant JR.** Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation.* **1964**;2:685–694.

- Umbreit** NT, Zhang CZ, Lynch LD, Blaine LJ, Cheng AM, Tourdot R, Sun L, AlmuBarak HF, Juez K, Mitchell TJ, Spektor A, Pellman D. Mechanisms generating cancer genome complexity from a single cell division error. *Science*. **2020**;368(6488):eaba0712.
- Vella** S, Conaldi PG, Florio T, Pagano A. PPAR Gamma in Neuroblastoma: The Translational Perspectives of Hypoglycemic Drugs. *PPAR research*. **2016**;3038164.
- Venturi** S. Evolutionary significance of iodine. *Current Chemical Biology*. **2011**;5(3), 155-162.
- Vrenken** KS, Vervoort BMT, van Ingen Schenau DS, Derks Y, van Emst L, Grytsenko PG, Middelbeek J, van Leeuwen FN. The transcriptional repressor SNAI2 impairs neuroblastoma differentiation and inhibits response to retinoic acid therapy. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*. **2020**;1866(3):165644.
- Wagner** N, Wagner KD. PPAR Beta/Delta and the Hallmarks of Cancer. *Cells*. **2020**;9(5):1133.
- Wei** Y, Liu M, Li X, Liu J, Li H. Origin of the Autophagosome Membrane in Mammals. *BioMed research international*. **2018**;1012789.
- Wu** X, Liu C, Li Z, Gai C, Ding D, Chen W, Hao F, Li W. Regulation of GSK3 β /Nrf2 signaling pathway modulated erastin-induced ferroptosis in breast cancer. *Molecular and cellular biochemistry*. **2020**;473(1-2),217-228.
- Yang** S, Huang J, Liu P, Li J, Zhao S. Apoptosis-inducing factor (AIF) nuclear translocation mediated caspase-independent mechanism involves in X-ray-induced MCF-7 cell death. *International journal of radiation biology*. **2017**;93(3):270-278.

- Yilmazer** A. Cancer cell lines involving cancer stem cell populations respond to oxidative stress. *Biotechnology reports* (Amsterdam, Netherlands). **2017**;17,24-30.
- Yin** J, Guo J, Zhang Q, Cui L, Zhang L, Zhang T, Zhao J, Li J, Middleton A, Carmichael PL, Peng S. Doxorubicin-induced mitophagy and mitochondrial damage is associated with dysregulation of the PINK1/parkin pathway. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*. **2018**;51,1-10.
- Zhang** BB, Wang DG, Guo FF, Xuan C. Mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in cancer stem cells. *Familial cancer*. **2015**;14(1):19-23.
- Zhang** J, Zhao Y, Wang J, Sneh T, Yu Q, Zhou X, Gong C. NBPF1 independently determine the risk stratification and prognosis of patients with neuroblastoma. *Genomics*. **2020**;112(6):3951-3957.
- Zhao** W, Li Y, Zhang X. Stemness-Related Markers in Cancer. *Cancer translational medicine*. **2017**;3(3):87-95.

9. ANEXO. Preparación de soluciones

1. Tampón fosfato salino (PBS 1X, pH 7.4)

Se preparó 1 L de una solución de PBS 10X, disolviendo 80.6 g de cloruro de sodio (Merck 116224), 2.2 g de cloruro de potasio (Merck 104936), 2 g de fosfato de potasio (Sigma-Aldrich P9791) y 11.5 g fosfato de sodio (Merck S3139) en agua destilada y se mezcló sobre un plato agitador con barra magnética hasta que se disolvieron las sales. El pH de la solución se ajustó utilizando hidróxido de sodio 10 M o ácido clorhídrico 1 M hasta quedar en 7.4 y se esterilizó en una autoclave. Posteriormente, la solución de trabajo se obtuvo diluyendo la solución previamente preparada, a 1X.

2. Tratamiento

La solución de yodo molecular 200 μM se preparó a partir de una solución madre de I_2 a 43.125 mM diluido en medio DMEM o MammoCult, para cultivo en monocapa o neuroesfera, respectivamente, y se hicieron los cálculos necesarios para llegar al volumen requerido (Ecuación 2), considerando el volumen de los pocillos o cajas de cultivo. Para las cajas de 24 pocillos, se empleó un volumen de 300 μL por cada uno.

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Ecuación 2. Fórmula de dilución. C_1 , concentración inicial = 43,125 μM ; V_1 , volumen inicial = volúmen de solución madre de I_2 a tomar; C_2 , concentración final = 200 μM ; V_2 , volumen final/requerido (de medio de cultivo).

3. Solución de trabajo (MitoTracker/MitoSOX)

Se tomó 1 μL de la solución madre previamente preparada (reactivo liofilizado en 100 μL de DMSO) y se colocó en 15 mL de medio DMEM, para el MitoTracker, y en 10 mL para el caso de MitoSOX.

4. Anti-FADE

Para 1 mL, se agregó PBS 10X:glicerol en relación 1:10, así como 40 μL de DMSO y, si la técnica lo indica, 40 μL de DAPI (Anti-FADE/DAPI).

5. Tampón Tris-acetato-EDTA (TAE 1X, pH 8.5)

Se preparó una solución madre de tampón TAE 50X disolviendo 242 g de base Tris (Merck 648310) en agua destilada, agregando 57.1 mL de ácido acético glacial (Merck 101830), 100 mL de solución de ácido etildiaminotetraacético (EDTA, Merck 34103) 500 mM (pH 8) y llevando el volumen final hasta 1 L con agua destilada. El pH de la solución se ajustó utilizando hidróxido de sodio 10 M o ácido clorhídrico 1 M hasta quedar en 8.5. La solución de trabajo se obtuvo diluyendo la solución madre previamente preparada, a 1X.