



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA**

Efecto de Casiopeína<sup>®</sup> IIIia sobre *N-MYC* y *TP53* en células de Neuroblastoma.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Maestro en Ciencias en Biomedicina

Presenta

LBG. José Luis Hernández Benítez

Dirigido por

Dra. María del Carmen Mejía Vázquez

Querétaro, Qro. a 13 de Junio del 2022

L.B.G. José Luis  
Hernández

Efecto de Casiopeína<sup>®</sup> IIIia sobre *N-MYC* y *TP53* en células  
de Neuroblastoma 2022



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA**

Efecto de Casiopeína<sup>®</sup> IIIa sobre *N-MYC* y *TP53* en células de Neuroblastoma.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Maestro en Ciencias en Biomedicina

Presenta

LBG. José Luis Hernández Benítez

Dirigido por

Dra. María del Carmen Mejía Vázquez

Presidente

Dra. Santiago Marisela Ahumada Solórzano

Secretaria

Dr. José Guadalupe Gómez Soto

Vocal

Dr. Pablo García Solís

Vocal

Dra. Ana Alicia Sánchez Tusié

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro

06/2022

México

## **Dedicatorias**

Dedico este trabajo principalmente a mi familia que son mi motor de cada día, a mi madre que fue mi pilar cuando todo se me derrumbó y sobre todo a mi ángel, mi padre que es la persona que más admiro.

## Agradecimientos

Como primera instancia, quiero agradecer a mi madre por haberme llevado a este camino de la ciencia, ya que me motivó incansablemente para que realizara estudios de posgrado, todo lo que soy es debido a mis padres y a mi familia.

Por una parte, quiero agradecer con gran fervor a mi directora de tesis la Dra. Carmen Mejía, que me acogió cuando sentía que este camino de la ciencia no era para mí. Gracias a ella y al excelente equipo de trabajo del laboratorio al que llegué, tuve prueba que todo con dedicación es posible y que siempre hay amigos que te apoyan en tu trabajo. En verdad muchas gracias por esa unión de equipo y sobre todo al Dr. Luis Arturo Jaime Martínez y a la Dra. Mónica Leticia Martínez Pacheco, quienes me apoyaron para realizar mis experimentos de posgrado. Este proyecto es el resultado del trabajo de todo mi equipo de laboratorio, incluyendo a becarios y alumnos que en búsqueda de querer aprender esta rama de la ciencia logramos formar grandes lazos de amistad.

Por otra parte, quiero agradecer a todas las personas que me ayudaron en algún momento durante todo mi periodo de posgrado, la verdad es que me siento muy contento ya que siempre encontré personas de diferentes equipos que te extendían la mano para ayudarte de alguna o de otra forma como el equipo de la Dra. Marisela Ahumada (a la cual también me siento muy especialmente agradecido), el equipo del Maestro Josué López, el equipo de Dr. Aarón Kuri García, el equipo del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Naturales y el equipo del Dr. Pablo García en Campus Aeropuerto por mencionar algunos. Siempre era grato pedir apoyo y ellos me lo brindaron, este trabajo también fue posible por ustedes.

A mis compañeros de clases, la generación de la Maestría en Ciencias en Biomedicina del 2019-2021 por haber sido esos aliados de tareas y momentos difíciles al igual de nuevos compañeros de maestría que conocí a lo largo de mi estancia en la facultad.

Como último pero no menos importante, agradecer a CONACYT por el apoyo tanto económico como de desarrollo para ejercer esta hermosa profesión.

<b>Índice</b>	<b>Página</b>
Resumen	10
Blastomas en infantes	12
Neuroblastoma	12
Terapias usadas comúnmente en NB	15
Apoptosis	16
Moléculas asociadas en la proliferación y la apoptosis	17
¿Cómo se relacionan <i>TP53</i> y <i>N-MYC</i> ?	23
Justificación	24
Hipótesis	24
Objetivo General	24
Objetivos específicos	24
Materiales y Métodos	25
Discusión	31
Resultados	25
Conclusiones	39
Bibliografía	40

## Página

### Índice de figuras

Regulación de la apoptosis por p53	20
Inhibición del ciclo celular por Rb	22

## Página

### Índice de Imágenes

Imágenes de microscopía invertida de líneas celulares.	26
Datos de ct crudos de primers utilizados en la experimentación	27
Expresión relativa diferencial de <i>N-MYC</i>	28
Expresión relativa diferencial de <i>TP53</i>	29
Expresión relativa diferencial de <i>GADDD45A</i>	30
Porcentaje de células de NB en fases del ciclo celular	32

<b>Índice de Tablas</b>	<b>Página</b>
Esquema de riesgo tumoral para Neuroblastoma (INGR)	14
Grupos experimentales con su respectiva concentración de tratamiento a las cuales fueron expuestas	26
Concentración de RNA y cDNA de muestras utilizadas	27
Primers utilizados para la PCR en las líneas celulares	28

## Índice de abreviaturas

<b>NB</b>	Neuroblastoma
<b>SCP</b>	Células precursoras de Schawnn
<b>SA-NCCS</b>	Células simpato-adrenales
<b>GN</b>	Ganglioneuroma
<b><i>N-MYC</i></b>	Oncogén con función de proliferación involucrado en la diferenciación y proliferación (Línea Neural)
<b><i>C-MYC</i></b>	Oncogén con función de proliferación involucrado en la diferenciación y proliferación (Línea Celular)
<b><i>L-MYC</i></b>	Oncogén con función de proliferación involucrado en la diferenciación y proliferación (Línea pulmonar “Lung” en inglés)
<b>Cas®</b>	Familia de Casiopeínas (Ruiz-Azuara, L. United States Paten 1992, vol. RE 35, 458; Ruiz-Azuara, L. United States Patent 1996, vol. 5, 576:326; Ruiz Azuara, L. Mark Tittle Casiopeínas, Reg. 407543 SECOFI, 1992, 2002)
<b>CHP-212</b>	Células de NB con amplificación de <i>N-MYC</i>
<b>SK-N-SH</b>	Células de NB sin amplificación de <i>N-MYC</i>
<b>TNRF</b>	Receptor del Factor de Necrosis Tumoral
<b>CARD</b>	Dominio reclutador de caspasas
<b>PTPm</b>	Poros de transición de la permeabilidad mitocondrial
<b>Cyt c</b>	Citocromo C
<b>AIF</b>	Factor de inducción de apoptosis
<b>SMAC</b>	Segundo activador de caspasas derivado de mitocondria
<b>Endo G</b>	Endonucleasa G
<b>Apaf 1</b>	Factor apoptótico activador de peptidasa 1
<b>TAD</b>	Dominio transactivador en región N-terminal de la proteína p53
<b>DBD</b>	Dominio de unión al DNA de la proteína p53
<b>CTD</b>	Dominio de tetramerización en la región C-Terminal de la proteína p53
<b>Cdk</b>	Ciclinas dependientes de kinasas
<b>Svv</b>	Proteína survivina



<b>TRAP</b>	Proteína asociada al dominio de transcripción
<b>HAT's</b>	Histona Acetil Transferasas
<b>Sp-1</b>	Proteína específica 1
<b>SKP2</b>	Kinasa asociada a la fase S

## RESUMEN

El Neuroblastoma (NB) es el tumor extra-craneal más frecuente en infantes correspondiente al 15% de muertes por cáncer infantil. La amplificación del oncogén *N-MYC* es el factor pronóstico independiente con más relevancia en el NB y junto con la metástasis se presentan en pacientes de alto riesgo. Solo el 30% de estos pacientes responden a un tratamiento multimodal el cual comúnmente es utilizado en este tipo de cáncer.

En la búsqueda de nuevos tratamientos contra el cáncer nacen las Casiopeínas®, una familia de más de 100 compuestos coordinados de cobre(II). Se sabe que estos compuestos presenta selectividad tumoral y lleva a las células a una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO), lo que genera una permeabilización de la membrana mitocondrial y como resultado final la muerte celular por apoptosis. No obstante, hasta el momento no se ha investigado el efecto que estos compuestos puedan tener sobre *N-MYC* y *TP53*, ambas moléculas están involucradas en la proliferación celular y en la señalización de la muerte celular. En este estudio se muestra que la Casiopeína IIIia genera una disminución de la presencia de moléculas involucradas en la proliferación celular y causa un aumento de moléculas involucradas en el arresto del ciclo celular en células de NB.

**Palabras clave: Casiopeína IIIia; Neuroblastoma; *N-MYC*; *TP53*; Muerte Celular**

## ABSTRACT

The Neuroblastoma (NB) is the most frequent extra-cranial tumor in childhood and it corresponds to 15% of child cancer deaths. *N-MYC* amplification is the most relevant independent prognostic marker of high-risk NB also as metastasis behavior. Only the 30% of these high-risk tumors respond to a multimodal treatment usually used in cancer.

In the search for new cancer drug therapy, the Casiopeínas<sup>®</sup> has arisen, a family of more than 00 compounds coordinated with active copper (II) center. It is well known that these compounds exhibit a tumor selectivity along the treatment and it take the cells to an over production of reactive oxygen species (ROS), which generates a mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis as final result.

To our known, there is not had been a paper or report in which the role of *N-MYC* and *TP53* has been explored after Cas IIIa treatment in NB cell lines. In this study we show that after Cas IIIa treatment, the molecules involved in cell death regulation has an over expression and the molecule involved in cell proliferation showed a repression after the treatment in NB cell line SK-N-SH

## ANTECEDENTES

### **Blastomas en infantes**

El número de pacientes pediátricos con tratamiento exitoso contra el cáncer ha incrementado a un 80% en las últimas décadas; sin embargo, continúa liderando la primera causa de muerte infantil en niños mayores de un año (Gröbner *et al.*, 2018). Los blastomas son un grupo heterogéneo de neoplasias primitivas en las cuales los tumores están compuestos de células inmaduras e indiferenciadas. Estos tumores se localizan predominantemente en tejidos en desarrollo de niños menores a los cuatro años, y se ha propuesto que provienen de células embrionarias que no se desarrollaron normalmente (Oh *et al.*, 2019).

La transformación de las células normales a malignas se debe a una acumulación de alteraciones genéticas (Colegio *et al.*, 2012). En las neoplasias malignas que se presentan en niños se presentan en promedio 14 veces menos alteraciones genéticas que en los tumores de adultos. Algunos ejemplos de blastomas en niños incluyen al nefroblastoma o tumor de Wilms, retinoblastoma, hepatoblastoma y neuroblastoma (NB) (Oh *et al.*, 2019).

### **Neuroblastoma**

El NB

es el tumor sólido extracraneal más común de la infancia y deriva de las células de la cresta neural durante el desarrollo embrionario (Tonini and Capasso, 2020), siendo las células precursoras de Schwann (SCP) y las simpato-adrenales (SA-NCCs) sus potenciales células de origen (Delloye-Bourgeois and Castellani, 2019). Su incidencia clínica es aproximadamente de 1 en 7,500 casos (Rich and La Quaglia, 2012).

El NB se diagnostica generalmente antes de los 5 años (Ferrucci *et al.*, 2018), representa aproximadamente el 8% de todos los tumores malignos de la infancia y es responsable de hasta el 15% de las muertes por cáncer en niños (Irwin and Park, 2015). Una vez que se

presenta el NB puede seguir varias rutas: una regresión espontánea, diferenciación por maduración del NB a ganglioneuroma (GN) benigno, o una rápida progresión hacia un tumor maligno a menudo resistente a tratamientos (Rich and La Quaglia, 2012).

El diagnóstico del NB se realiza a través de estudios isotópicos y de imagen, análisis de suero y orina y una evaluación histológica y genética del tejido tumoral. Es importante aclarar que ningún valor en suero es factor determinante como biomarcador para establecer un tratamiento o diagnóstico sino que se debe realizar una examinación histológica concluyente (Rich and La Quaglia, 2012).

Entre las características del NB, surge la amplificación de más de 10 copias del oncogén *N-MYC* como el factor pronóstico independiente más importante y que comúnmente está asociado a un mal pronóstico especialmente en niños mayores a un año (Ferrucci *et al.*, 2018).

El NB es clasificado por el Sistema Internacional de Estadios para Neuroblastoma (SIEN) (Tabla 1).

**Tabla1: Esquema de riesgo tumoral para Neuroblastoma.** (Sokol and V. Desai, 2019).

Estadio INRG	Edad (meses)	Categoría Histológica	Grado de diferenciación del tumor	N-MYC	Aberraciones en 11q	Ploidía	Grupo de riesgo pre tratamiento	
L1/L2		GN madurando; GNB intermezclado					A muy bajo	
L1		Cualquiera excepto GN madurando; GNB intermezclado		NA			B muy bajo	
				Amp			K Alto	
L2	<18	Cualquiera excepto GN madurando; GNB intermezclado		NA	No		D bajo	
					SI		G intermedio	
	≥ 18		GNB nodular; Neuroblastoma	Diferenciado	NA	No		E bajo
				Poco diferenciado indiferenciado	Amp	Si		H intermedio
M	<18			NA		Hiperdiploidía	F bajo	
	<12			NA		Diploidía	I intermedio	
	12 a <18			NA		Diploidía	J intermedio	
	<18			Amp			H alto	
	≥18						P alto	
MS	<18			NA	No		C muy bajo	
					Si		Q alto	
				Amp			R alto	

GN = Ganglioneuroma; GNB = Ganglioneuroblastoma; NA = No amplificado; Amp = Amplificado

## **Terapias comúnmente usadas en NB**

El tratamiento del NB está en función de su grupo de riesgo (Tabla 2) e incluye una terapia multimodal con quimioterapia intensa de citoreducción, cirugía, radioterapia y tratamientos subsecuentes para la enfermedad mínima residual; sin embargo, en la mayoría de los casos resulta ineficiente (Berlanga, Cañete and Castel, 2017).

Para pacientes clasificados con factor de bajo riesgo, la escisión quirúrgica del tumor es usualmente curativa y se evita el riesgo de daños secundarios provocados por el uso de terapias químicas. Los pacientes con riesgo intermedio son usualmente tratados con cirugía y quimioterapia. Para un mal pronóstico, es decir NB de alto riesgo, es justificable un tratamiento de régimen intenso que incluye la combinación de quimioterapéuticos, seguido cuando sea posible de una escisión quirúrgica, posteriormente radioterapia para lograr el control local del tumor y un tratamiento mieloablatoivo con rescate de médula ósea además de terapia biológica (Rich and La Quaglia, 2012).

Entre los quimioterapéuticos comúnmente administrados se encuentran agentes alquilantes como ciclofosfamida, melfalán, carboplatino o el cisplatino (Vo *et al.*, 2014). Este último compuesto es uno de los quimioterapéuticos más utilizados, sin embargo, debido a su alta citotoxicidad causa lesiones en el DNA por su interacción con los pares de purinas, principalmente con el nitrógeno 7 de la guanina (Geurten *et al.*, 2019). Es así que el cisplatino interfiere con la replicación del DNA induciendo apoptosis debido a la incapacidad reparadora de las enzimas de reparación del DNA, sin embargo, altos niveles de p53 en el citoplasma pueden incrementar la resistencia de células cancerosas al tratamiento con cisplatino (Cao *et al.*, 2020).

Aunque los tratamientos no mejoran la tasa de recuperación de los pacientes en riesgo alto, sí reducen el tamaño del tumor primario y a menudo liberan a la médula ósea de células tumorales. El 40% de los NB de riesgo alto muestran una respuesta completa a quimioterapias, el 30% de forma parcial y el otro 30% no responde (Rich and La Quaglia,

2012). Cabe mencionar que los pacientes que se encuentran dentro de esta clasificación continúan teniendo un pobre pronóstico con una supervivencia a largo plazo menor al 50% (Pinto *et al.*, 2015).

Es así que en la búsqueda de nuevas alternativas quimioterapéuticas surgen las Casiopeínas® (Cas) (Ruiz-Azuara, L. United States Paten 1992, vol. RE 35, 458; Ruiz-Azuara, L. United States Patent 1996, vol. 5, 576:326; Ruiz Azuara, L. Mark Tittle Casiopeínas, Reg. 407543 SECOFI, 1992, 2002), una familia de compuestos coordinados de cobre(II) que han mostrado una gran actividad antineoplásica tanto *in vitro* como *in vivo* (Carvallo-Chaigneau *et al.*, 2008; Mejia and Ruiz-Azuara, 2008; García-Ramos *et al.*, 2017; Vázquez-Aguirre *et al.*, 2019) y que han sido ampliamente estudiadas por nuestro grupo como una alternativa emergente en el tratamiento del NB. Estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que en células CHP-212 (células de Neuroblastoma con amplificación del oncogén *N-MYC*) y SK-N-SH (células de Neuroblastoma sin amplificación *N-MYC*) luego del tratamiento con Cas IIgly, IIIa y IIIEa, ocurre apoptosis mitocondrial a las 2h y 4h respectivamente (Gutiérrez *et al.*, 2013; García-Ramos *et al.*, 2017).

## **Apoptosis**

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que puede ser iniciada por dos rutas: la intrínseca y la extrínseca. La vía extrínseca requiere de receptores de membrana denominados “receptores de muerte” como el receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) y el receptor Fas. Estos receptores de la familia TNF cuentan con un “dominio de muerte” que le permite al receptor unirse a los adaptadores de proteínas intracelulares que también contienen el dominio de muerte, por ejemplo: Proteína inactivadora de ribosomas (RIP), la proteína receptora de factores de necrosis de tumoral tipo 1 asociada a dominio de muerte (TRADD) y la proteína con domino de muerte asociada al receptor FAS (FADD).



Además de sus propios dominios, las proteínas adaptadoras tienen un dominio de muerte efector que le permite a la proteína adaptadora, unirse al dominio reclutador de caspasas (CARD) para activar caspasas iniciadoras como la caspasa-8 y desencadenar la señalización de apoptosis hasta la caspasa-3 que tiene como resultado final la muerte celular (Gonzalzo and Meeker, 2012).

Por su parte, la ruta intrínseca se encarga de monitorear al interior de la célula las señales que desencadenan la apoptosis debido a la incorrecta reparación del DNA o por falta de las condiciones de supervivencia (Gonzalzo and Meeker, 2012). Esta ruta reside en la mitocondria, específicamente en el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm), el cual lleva a la liberación de proteínas pro-apoptóticas hacia el citosol incluyendo citocromo c (Cyt c), factor de inducción de apoptosis (AIF), segundo activador de caspasas derivado de mitocondria (SMAC) y endonucleasa G (Endo G). El Cyt c junto con desoxi-ATP, el factor apoptótico activador de peptidasas 1 (Apaf1) y caspasa-9, forman un complejo llamado apoptosoma lo que lleva a la activación río-abajo de la caspasa-3. Para que haya activación del PTPm es necesario que ocurra el intercambio de proteínas apoptóticas como Bax, Bak1 y proteínas anti-apoptóticas como la propia Bcl-2 (Thornton and Hagberg, 2017)-

### **Moléculas involucradas en la proliferación y apoptosis**

Un incremento o una pérdida en la función de un gen (oncogén o genes supresores de tumores, respectivamente), afectará la proliferación y regulación de la muerte celular y puede guiar a un crecimiento descontrolado de las células. Estas dos categorías de genes y sus productos de proteínas, representan las características funcionales que trasladan la carcinogénesis a un nivel molecular (Colegio *et al.*, 2012).

Por una parte, el gen *TP53* está localizado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q) y codifica la fosfoproteína nuclear p53 de 553 KDa y 393 residuos de aminoácidos (Colegio *et al.*, 2012). La proteína p53 por su parte, contiene un dominio de activación en la región

N-terminal (TAD) que comprende los aminoácidos 1 al 101; un dominio de unión a DNA (DBD) en la región central (aminoácidos 102 a 292); así como un dominio de tetramerización en la región C-terminal (CTD) en los aminoácidos 323 a 356 y un dominio en el extremo CTD regulador (aminoácidos 360 a 393) (Stiewe and Haran, 2018).

La proteína p53 está estrictamente regulada por modificaciones post-traduccionales como fosforilación y acetilación, entre otras. Una proteína p53 acetilada o fosforilada se encuentra estable y transcripcionalmente activa para su rol en la apoptosis (Cao *et al.*, 2020). Se han confirmado aproximadamente 300 sitios de unión a DNA para p53 (Stiewe and Haran, 2018).

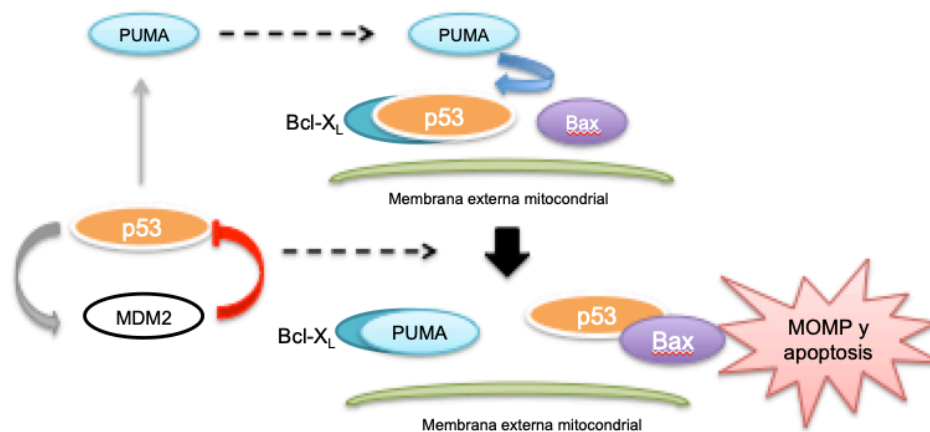
La ruta habitual que sigue p53 para regular el ciclo celular es mediante el aumento de la transcripción de p21, lo que inhibe las ciclinas dependientes de kinasas (cdk) y la subsecuente fosforilación de la proteína Rb (retinoblastoma). Una vez liberada Rb, se une al factor de transcripción E2F, previniendo que la célula entre a la fase S (síntesis) del ciclo celular y continúe con la replicación (Colegio *et al.*, 2012). Otro blanco importante de p53 en el ciclo celular es el gen encargado del arresto del ciclo celular por daño al ADN alfa (GADD45A, por sus siglas en inglés), el cual contiene motivos en su promotor que pueden reconocer a p53 para la activación de su expresión. La proteína Gadd45a interacciona con el complejo Cdc2/ciclina B1 disociándolo y provocando así el arresto del ciclo celular en el punto G2/M (Moskalev *et al.*, 2012).

La presencia de p53 en su forma activada está mediada por su regulador negativo Mdm2, la cual regula la degradación proteolítica de p53 mediada por ubiquitinación (Tan, Sobel and Ha, 2017). El gen *MDM2* es transcrito de forma regulada por dos promotores diferentes: P1 río-arriba del exón uno y P2 que se encuentra entre los exones 1 y 2. Mientras que el promotor P1 está activo de forma constitutiva a niveles bajos, el promotor P2 contiene sitios de unión para múltiples factores de transcripción al igual que una región potenciadora consenso conocida como E-Box (Chen *et al.*, 2010).

La interacción entre proteínas p53/Mdm2 oculta el dominio transactivador de p53 inhibiendo su efecto y regulación sobre genes que promueven el arresto del ciclo celular y la apoptosis (Tan, Sobel and Ha, 2017). Cuando se pierde la interacción entre las proteínas p53/Mdm2, los niveles de Mdm2 son regulados de forma negativa por p14<sup>ARF</sup> lo cual provoca la translocación de Mdm2 al nucléolo, evitando así la formación del complejo proteico p53/Mdm2 (Colegio *et al.*, 2012).

La proteína p53 no solo puede promover el arresto del ciclo celular, sino que también puede inducir la apoptosis y este proceso consta de un balance entre las proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2. La proteína p53 activa la transcripción de *BAX* e inhibe transcripcionalmente a *BCL2* rompiendo dicho balance y dando como resultado la apoptosis (Colegio *et al.*, 2012; Gonzalgo and Meeker, 2012). La proteína p53 se activa en respuesta a señales de estrés de la célula incluyendo el daño al DNA, señales de hiperproliferación, hipoxia y estrés oxidativo entre otras. En respuesta a éstas señales, p53 es desplazado de su regulador negativo Mdm2, lo que permite su estabilización y posterior activación (T. Bieging, Spano Mello and D. Attardi, 2014). La expresión de *MDM2* está controlada por p53, lo que promueve una autoregulación negativa manteniendo niveles bajos de p53 en las células que no tienen señales de estrés (Barone *et al.*, 2014).

La función clásica de la proteína p53 es actuar como activador de la transcripción y una vez estabilizada, se acumula en el núcleo donde eleva la transcripción de genes pro-apoptóticos como *PUMA*, *BAX* y *NOXA*. La proteína p53 también tiene acciones citoplásmicas a nivel mitocondrial y puede promover la activación del PTPm a través de Bax; una vez que p53 es activada se acumula en el citosol, donde es secuestrada por proteínas anti-apoptóticas como Bcl-x<sub>L</sub> (Thornton and Hagberg, 2017). Gracias a la expresión aumentada de *PUMA* mediada por p53, esta última puede ser desplazada de Bcl-x<sub>L</sub> permitiendo la activación de Bax y promoviendo así la formación del PTPm con la consiguiente inducción de la apoptosis (Fig.1) (Thornton and Hagberg, 2017).



**Figura 1. Regulación de la apoptosis por p53** (Green, 2004).

En la mayoría de los cánceres, el gen *TP53* se encuentra mutado produciendo un cambio de aminoácidos, donde de acuerdo a la base de datos universal de mutaciones en TP53 (UMDTP53 por sus siglas en inglés), el 96% de los casos caen en el dominio de unión a ADN (DBD). Las mutaciones y la tasa de las mismas dependen de la entidad tumoral, siendo el cáncer de ovario severo la entidad con mayor incidencia de mutaciones de p53 (90% de los casos); mientras que el NB es el tumor con el menor porcentaje de mutaciones con apenas un 5% de casos (Stiewe and Haran, 2018).

Por otra parte, existe la familia de proto-oncogenes *MYC* que comprende los genes *N-MYC* (Línea neural), *C-MYC* (Línea celular) y *L-MYC* (de su traducción en inglés de pulmón “lung”), los cuales comparten homología entre sí. El gen *C-MYC* fue el primero en ser descubierto como homólogo celular del gen transformante del virus mielocitomatoso aviar. Después se identificaron los genes *N-MYC* en células de NB y por último, en células de carcinoma de pulmón el gen *L-MYC* (Laurenti, Wilson and Trumpp, 2009; Westermarck *et al.*, 2011). El proto-oncogén *N-MYC* traduce una proteína de 60-63 KDa, la cual funciona como factor de transcripción para genes encargados de regular la proliferación celular (Gonzalzo and Meeker, 2012). La proteína N-myc consta de un dominio activador

transcripcional en la región N-terminal (HL4-LeuZipper), un dominio de unión a DNA en la región C-terminal y un dominio con interacción de proteínas. La presencia normal de la proteína N-myc está restringida al sistema nervioso central y periférico, riñón, pulmón y bazo durante el desarrollo embrionario, a diferencia de su proteína paróloga C-myc, la cual está presente en una variedad de tejidos sin importar su fase de desarrollo (Bell *et al.*, 2010; Westermarck *et al.*, 2011).

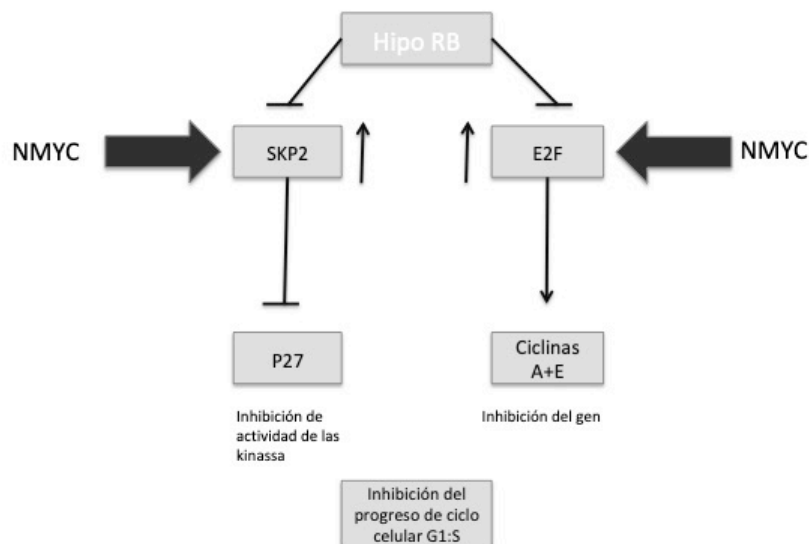
En el 25% de los casos de NB se presenta amplificación del oncogén *N-MYC*, ésta va desde 10 a 500 copias adicionales del oncogén y más de 10,000 copias del RNAm llevando a niveles elevados de la proteína N-myc. De forma interesante, la caspasa-8 se ha encontrado silenciada de forma epigenética en la mayoría de los tumores humanos con *N-MYC* amplificado (Westermarck *et al.*, 2011). También, se han encontrado altos niveles de Survivina (Svv) la cual ha sido asociada a la amplificación de *N-MYC*. Svv es una proteína inhibidora de la apoptosis (IAP) y su gen está localizado en el cromosoma 17q, la cual es una región alélica ganada frecuentemente en el NB (Bell *et al.*, 2010).

La proteína N-myc forma un heterodímero con su proteína afín Max, y este complejo se une a regiones promotoras a través de las secuencias potenciadoras E-box para promover su activación (Agarwal *et al.*, 2018). El dímero proteico N-Myc/Max recluta cofactores transcripcionales como la proteína asociada al dominio de transcripción (TRRAP), que junto con acetil transferasas de histonas (HAT's) forman un complejo que estimula la acetilación de histonas llevando a una estructura abierta de cromatina que provee una zona de anclaje para proteínas adicionales (Westermarck *et al.*, 2011) y con esto funciona como un potenciador transcripcional de genes encargados del crecimiento, proliferación, diferenciación, biosíntesis de proteínas, metabolismo, apoptosis y biogénesis de mitocondria (Bell *et al.*, 2010; Westermarck *et al.*, 2011; Raffeiner *et al.*, 2014).

A diferencia de N-myc, Max se encuentra presente tanto en células en reposo como en células en proliferación (Ferrucci *et al.*, 2018). Raffeiner *et al.* (2014), donde se observó que bajos niveles de Max representan un marcador de mejoría de tumores, aún y cuando *N-MYC* se encuentre amplificado. La señalización de la familia *MYC* es importante en el

mantenimiento del fenotipo indiferenciado y la inhibición de *N-MYC* puede contribuir a tumores menos agresivos (Westermarck *et al.*, 2011)

Mientras que la principal actividad del complejo N-myc/Max es funcionar como potenciador transcripcional, las proteínas Myc pueden también reprimir la expresión génica uniéndose a otros factores de transcripción como la proteína interaccionadora de myc con el dedo de Zinc-1 (Miz-1 por sus siglas en inglés) y la proteína específica-1 (Sp-1). Como consecuencia, inhiben la transcripción de sus propias proteínas siendo esta ruta por la cual N-myc puede reprimir muchos reguladores negativos del ciclo celular y genes involucrados en la adhesión celular como la kinasa-2 asociada a la fase S (SKP2) (Westermarck *et al.*, 2011). Después de que la ruta de p53 se activa, Rb puede actuar de dos formas para arrestar el ciclo celular: 1) SKP2 es inhibida por RB cuando éste se une a su región N-terminal permitiendo un incremento en p27<sup>Kip1</sup> para inhibir la actividad de CDK y, 2) a través de la represión transcripcional de ciclina A, E y otros blancos de E2F (Figura 2). Los niveles de SKP2 y E2F se correlacionan con el estado de amplificación de *N-MYC* en NB (Bell *et al.*, 2010).



**Figura 2: Inhibición del ciclo celular por Rb** (Bell *et al.*, 2010).

Por lo tanto la amplificación de *N-MYC* está ligada con la regulación del ciclo celular, ya que diversos estudios han demostrado que N-myc actúa de forma dependiente de p53 disminuyendo los niveles de p21<sup>Waf1</sup>, y por un mecanismo independiente de p53 afecta el punto de control G<sub>1</sub> logrando el arresto del ciclo celular en células sin estrés. Se ha observado que N-myc es incapaz de lograr el arresto celular después del daño en el DNA por sí sola, pensando que hay rutas alternativas por las cuales ejerce esta acción (Bell *et al.*, 2010).

### **¿Cómo se relacionan los genes *TP53* y *N-MYC*?**

Diversos estudios han demostrado que la proteína N-myc afecta el punto de control de G<sub>1</sub> a través de mecanismos tanto dependientes como independientes de N-myc. Así, N-myc se une a la región P2 en el promotor de *MDM2* para aumentar su expresión y de esta manera, la sobre-expresión de *N-MYC* atenúa la actividad de p53 como proteína al incrementar los niveles de su proteína afin Mdm2, previniendo así el arresto en G<sub>1</sub> como respuesta al daño al DNA (Bell *et al.*, 2010).

El gen *TP53* tiene una región no-canónica en su promotor de secuencia E-box, región a la cual N-myc se puede unir directamente, siendo el gen *TP53* un blanco directo de transcripción de la proteína N-myc en el NB. Se ha observado una relación entre la expresión de *TP53* y la de *N-MYC* en el NB, dando por entendido que la amplificación de *N-MYC* aumenta la expresión de *TP53* en este tumor (Bell *et al.*, 2010).

Argawal *et al.* (2018), demostraron que altos niveles de *N-MYC* alteran la actividad transcripcional de p53 sobre-expresando genes reprimidos y reprimiendo genes sobre-expresados. Además, demostraron que existe una interacción proteína-proteína de N-myc con p53 y que la formación de este complejo reprime la función de p53 para inducir la apoptosis y por lo tanto, promueve la progresión del ciclo celular y con ello la proliferación.

## **JUSTIFICACIÓN**

El Neuroblastoma causa el 15% de muerte infantil y presenta una importante tasa de resistencia a tratamientos convencionales ya que el 60% de los NB de alto riesgo no responden de forma adecuada. Se ha comprobado que la Casiopeína<sup>®</sup> IIIia induce apoptosis mitocondrial de células de NB con y sin amplificación de *N-MYC*. La vía de señalización N-myc y p53 ha sido ampliamente estudiada en NB como posible blanco terapéutico por su importancia en la proliferación y muerte celular. Hasta la fecha no se tienen antecedentes de cómo el tratamiento con Casiopeína<sup>®</sup> IIIia afectará la relación de las proteínas N-myc y p53 en células de NB.

## **HIPÓTESIS**

El tratamiento con Casiopeína IIIia aumentará la presencia y reactivará su función como factor de transcripción de la molécula pro-apoptótica *TP53* y disminuirá la presencia de la molécula involucrada en la proliferación celular *N-MYC* en líneas celulares de NB.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto del tratamiento con Casiopeína IIIia sobre las moléculas *TP53* y *N-MYC* en células de NB.

## **OBJETIVO ESPECÍFICOS**

1. Medir la expresión de los genes *N-MYC* y *TP53* en células de NB tratadas con Casiopeína IIIia.
2. Determinar la expresión del gen blanco de p53 *GADD45A* en células de NB tratadas con Casiopeína IIIia.
3. Comprobar el efecto del tratamiento con Casiopeína IIIia en el ciclo celular en células de NB.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Localización del estudio**

Laboratorio de Biomedicina Interdisciplinaria, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. Avenida de las Ciencias S/N, Juriquilla, Delegación Santa Rosa Jáuregui. C.P. 76230, Querétaro, México.

### **Diseño**

Estudio experimental *in vitro*.

### **Población de estudio**

- Células de Neuroblastoma del linaje SK-N-SH (sin amplificación del oncogén *N-MYC*).

### **Tamaño de la muestra**

Cada condición experimental se realizó por triplicado (n=3).

Dividido en 3 grupos.

### **Criterios de inclusión**

Placas de células con una confluencia mayor del 80% de la línea celular SK-N-SH.

### **Criterios de exclusión**

Aquellas cajas Petri que contengan células con contaminación.

### **Criterios de eliminación**

Muestras de células que presenten características fuera de los parámetros requeridos por la investigación.

## CULTIVO CELULAR

Se realizó la expansión de la línea celular de Neuroblastoma SK-N-SH (sin amplificación del oncogen *N-MYC*) en medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 100 U/ml de estreptomycin y penicilina. Las células se mantuvieron en incubadora con condiciones estándar de cultivo: CO<sub>2</sub> al 5%, 37°C y humedad constante. Se realizaron 3 experimentos por separado en la línea celular: 1) Células tratadas como control positivo con la CL<sub>50</sub> de Cisplatino por 4h; 2) Células tratadas con la CL<sub>50</sub> de Casiopeína<sup>®</sup> IIIia, por 4h; 3) Grupo control sin tratamiento. Las concentraciones de los tratamientos empleados se obtuvieron a partir de Gutiérrez, *et al.*, (2013) (Tabla 2).

**Tabla 2 Grupos experimentales y sus tratamientos**

Línea Celular	Grupo 1	Grupo 2 (CL <sub>50</sub> ) Cisplatino	Grupo 3 (CL <sub>50</sub> ) Cas IIIia
SK-N-SH	Control (Sin tratamiento)	37µg/mL	31µg/mL

(CL<sub>50</sub> determinadas por Gutiérrez *et al.*, 2013).

El Cisplatino se obtuvo de Sigma (No. Cat. P4394-1G, Merk KGaA, Missouri, EUA), y la Casiopeína IIIia fue donada por la Dra. Lena Ruiz Azuara de la Facultad de Química de la UNAM.

## EXTRACCIÓN DE RNA

Partiendo de 5 x 10<sup>6</sup> células de cada uno de los grupos experimentales, se realizó la extracción de RNA. Posterior al tratamiento, las células fueron desprendidas de la caja Petri con tripsina al 0.25% (GIBCO No. Cat. 27250-018, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) por 2 min, centrifugadas a 2,500 rpm por 10 min a temperatura ambiente y resuspendidas con 1ml de TRIreagent<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). La extracción se realizó mediante columnas de afinidad con el kit Direct-Zol RNA miniprep

(Zymo Research, CA, EUA), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. La concentración y pureza del RNA fueron evaluadas por Nanodrop™ One (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) (Tabla 3). El cDNA fue obtenido con el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, CA, EUA) de acuerdo a las instrucciones del proveedor, la concentración y pureza del RNA fueron evaluadas por Nanodrop™ One (Tabla 3).

**Tabla 3: Concentraciones de RNA y cDNA de muestras utilizadas.**

<b>Muestra</b>	<b>Condición</b>	<b>[µg/µL]</b>	<b>260/280 (u*)</b>	<b>260/230 (u*)</b>
<b>RNA</b>	Sin tto	1926.2	2.64	2.25
	Cisplatino	106.7	1.92	1.97
	Cas IIIa	279.8	1.98	2.12
<b>Muestra</b>	<b>Condición</b>	<b>[µg/µL]</b>	<b>260/280 (u*)</b>	<b>260/230 (u*)</b>
<b>cDNA</b>	Sin tto	640.8	1.82	2.46
	Cisplatino	324.9	1.84	2.33
	CasIIIa	422.8	1.85	2.25

u\*= Unidades relativas de medida; Sin tto= sin tratamiento.

### **RT-PCR CUANTITATIVA**

La expresión relativa de los genes *N-MYC*, *TP53* y *GADD45A* fue determinada con una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa (qPCR) en tiempo real, con el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), usando al gen que codifica para la proteína ribosomal 60S L32 (*RPL32*) como gen de referencia. Los primers utilizados (Tabla 4) fueron sintetizados por la Unidad de Síntesis de Oligonucleótidos y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología (UNAM, México) y se usaron a una concentración de 10nM. La reacción de qPCR fue generada con el equipo StepOnePlus™ (Applied Biosystems, CA, EUA) y para todos los genes se usaron las condiciones de reacción: 95°C por 15 seg, 60°C por 30 seg, 72°C por 30 seg por 40

ciclos. La concentración de cDNA para cada muestra fue de 50ng/mL. Por último, se hizo un análisis semicuantitativo de la expresión génica mediante el método de Ct (ciclo umbral) comparativo ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ).

**Tabla 4: Primers utilizados para la qPCR de SK-N-SH**

Gen	Secuencia	Tm	Tamaño (pb) amplicón	Referencia bibliográfica
<i>N-MYC</i>	Forward: 5'- CACATTCACCATCACTGTGCG-3' Reverse: 5' - GGATGTTGTGGTTTCTGCGAC-3'	60°C	281	Diseño propio
<i>TP53</i>	Forward:5' - CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG -3' Reverse:5'- TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC -3'	60°C	128	Sola <i>et al.</i> , 2020
<i>GADD45A</i>	Forward:5' - GAGAGCAGAAGACCGAAAGGA -3' Reverse:5' - CACAAACCACGTTATCGGG -3'	60°C	178	Mlakar <i>et al.</i> , 2019
<i>RPL32</i>	Forward: 5'AAGGGCCAGATCTTGATGCC-3' Reverse: 5'- GCATTGGGGTTGGTGA CTCT-3'	60°C	233	Diseño propio

### CICLO CELULAR

A partir de  $5 \times 10^6$  células para cada condición experimental, las células fueron desprendidas de la caja Petri con tripsina, centrifugadas a 2,500 rpm por 10 min a temperatura ambiente y resuspendidas con 1ml de PBS al 1% en tubos eppendorf. De cada tubo se obtuvieron 200µL de células resuspendidas para después centrifugarlas nuevamente a 2,500 por 10 min. El sobrenadante fue descartado, colocado en etanol helado al 70% e incubado por 3 h a -20°C. Posterior a eso, se realizó un lavado con PBS al 1% y se centrifugó nuevamente. Se añadieron 200µL del kit Cell Cycle (Luminex, TX, EUA) a cada tubo, incubándolos por

30 min en oscuridad antes de ser leído en el equipo Guava® MUSE® Cell Analyzer de (Luminex, TX,EUA).

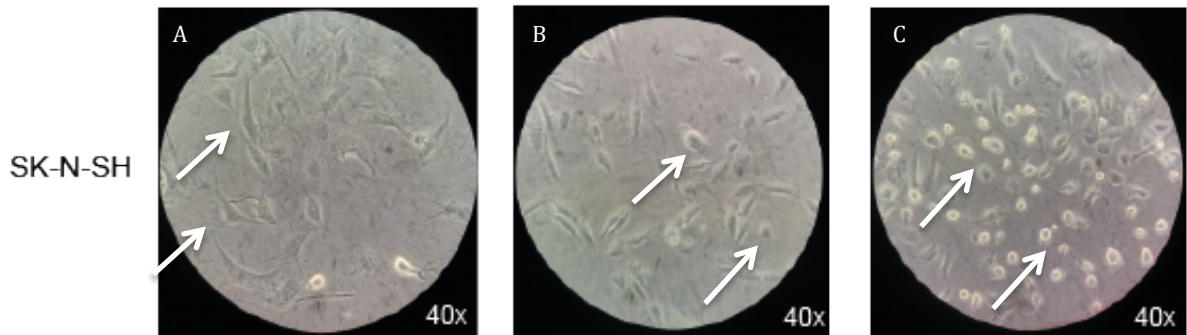
## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todas las metodologías descritas se efectuaron por triplicado y los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía. Los resultados se presentan como Media  $\pm$  Desviación estándar con una  $P \leq 0.05$ . Los grupos que presentaron diferencias entre sus medias fueron evaluados con una prueba estadística *Post Hoc* de TUKEY y Dunnett's para encontrar diferencias entre los grupos. Se usó el programa *GraphPad Prism* en su versión 7.00. Los datos estadísticos fueron incluidos en las gráficas con la librería "ggplot2" del lenguaje de programación R (rproject.org) y la interfase RStudio v.1.4.1106.

## **RESULTADOS**

### **La Casiopeína IIIa promueve cambios morfológicos y en las células SK-N-SH**

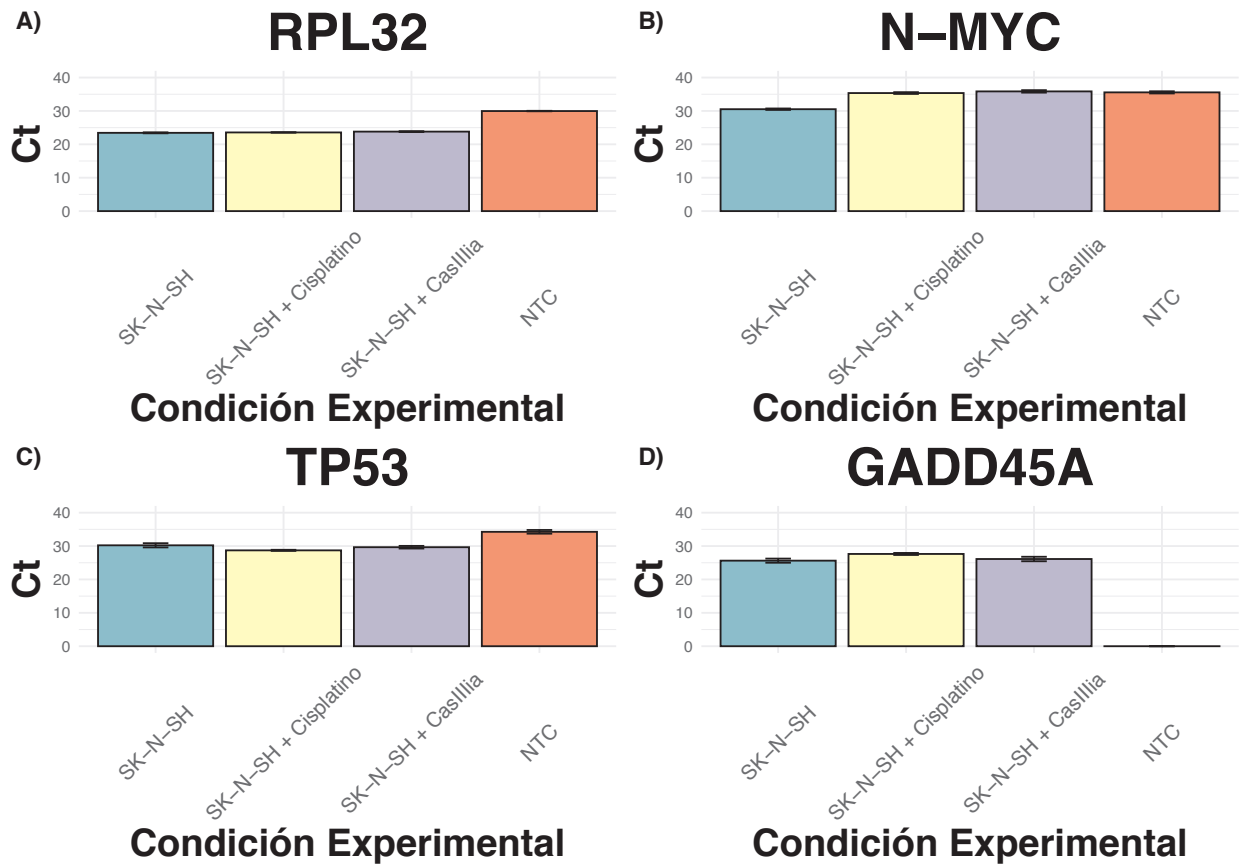
Se analizó a través de microscopía invertida las células SK-N-SH con el objetivo 40x el efecto del Cisplatino y la Casiopeína IIIa sobre la adhesión de las células a la placa a través de sus proyecciones clásicas. Se observó que luego de 4h del tratamiento con Cisplatino (37 $\mu$ g/mL), las células SK-N-SH presentan acortamiento de sus proyecciones sin desprendimiento de la placa de cultivo. En cambio, la Casiopeína IIIa (31 $\mu$ g/mL) por 4h promovió que aproximadamente el 50% de las células no estuvieran adheridas a la placa y el resto de las células presentaron una retracción evidente en sus proyecciones **Figura 3**. Esto sugiere que el tratamiento con 31 $\mu$ g/mL de Cas IIIa tiene un efecto citotóxico sobre las células tumorales SK-N-SH.



**Figura 1: Imágenes de microscopía invertida de la línea celular SK-N-SH.** En A) se muestran células control (sin tratamiento), en B) se observan células tratadas con Cisplatino (37 $\mu$ g/mL) y en C) se muestran células tratadas con Casiopeína IIIia (31 $\mu$ g/mL), ambas por 4h. Las flechas indican proyecciones conformacionales de las células de NB para cada condición experimental en un aumento de 40X.

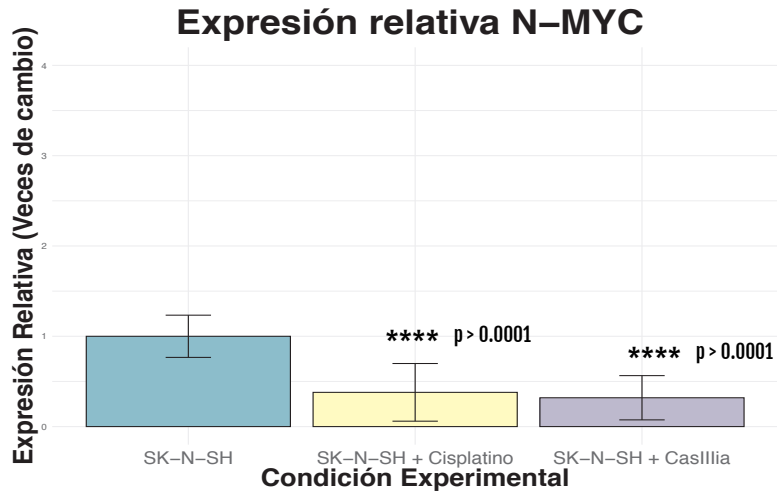
### **La Casiopeína IIIia muestra un efecto sobre genes involucrados en la proliferación y el arresto del ciclo celular.**

Para observar el efecto del tratamiento con Cas IIIia sobre los transcritos de los genes involucrados en la proliferación y la muerte celular se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real, obtuvimos los datos crudos de umbral de ciclos (Ct) de PCR, los cuales después del análisis semicuantitativo de la expresión génica mediante el método de Ct comparativo ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ), mostraron que los primers elegidos y diseñados pueden ser utilizados bajo las condiciones experimentales establecidas, debido a que mostraron una desviación estándar menor a una unidad. De la misma forma, no se encontró amplificación en muestras control sin templado (NTC por sus siglas en ingles “Non template control”) y una ct mayor (Figura 2).



**Figura 2: Datos de ct crudos de primers utilizados.** Se muestran los valores crudos de ct obtenidos para cada par de primers en las tres condiciones experimentales: A) *RPL32* como gen de referencia; B) *N-MYC*; C) *TP53*; D) *GADD45A*.

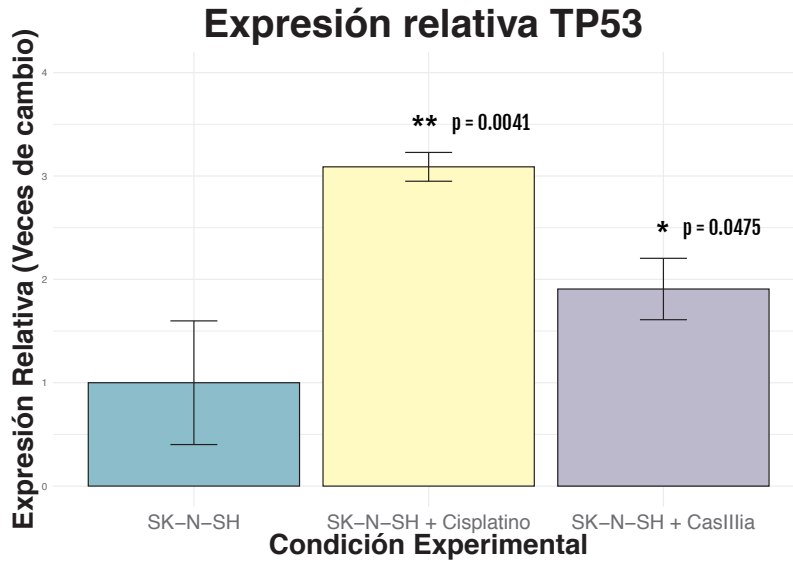
Después, utilizando los mismos primers y metodología analizamos los genes de interés, donde mostramos que la expresión relativa del gen *N-MYC* involucrado en la proliferación celular, se encontraba disminuida de forma significativa para ambos tratamientos (\*\*\*\*  $p > 0.0001$ ) en comparación con el grupo control sin tratamiento (Figura 3),



**Figura 3: Expresión relativa diferencial de *N-MYC*.** Observamos los datos graficados de ct analizados de forma semicuantitativa para la expresión de *N-MYC* en sus tres condiciones: SK-N-SH sin tratamiento (Control); Cisplatino (37µg/mL); Cas IIIa (31µg/mL).

A su vez, observamos un aumento significativo de la sobre-expresión relativa de *TP53* para ambos tratamientos, Cisplatino \*\*p=0.0041 y Casiopeína IIIa \*p>0.0475, en comparación con el grupo control sin tratamiento (Figura 4).

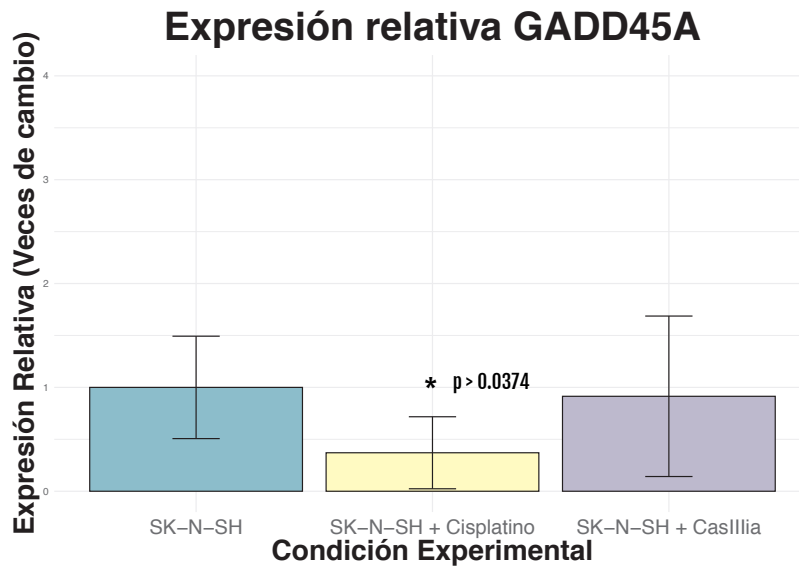




**Figura 4: Expresión relativa diferencial de *TP53*.** Observamos los datos graficados de ct analizados de forma semicuantitativa para la expresión de *TP53* en sus tres condiciones: SK-N-SH (células sin tratamiento); Cisplatino (37  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); Cas IIIa (31  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

**La sobre-expresión de *TP53* no tuvo efecto en la expresión de *GADD45A*.**

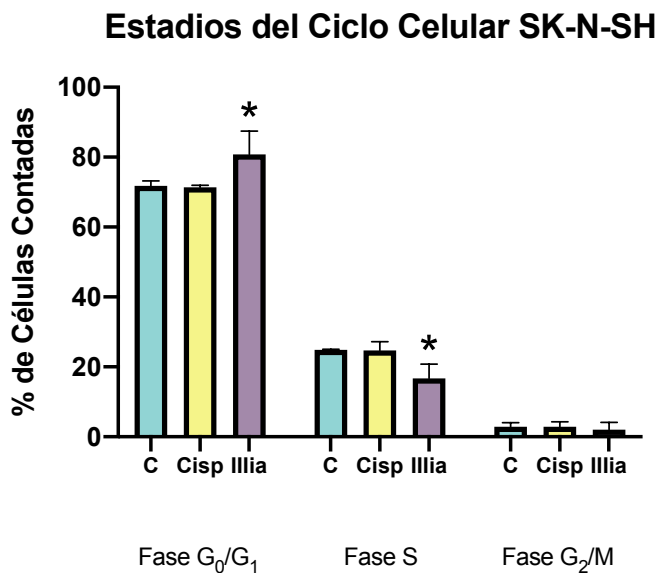
Después de visualizar un aumento en la expresión del gen *TP53*, quisimos averiguar si esta sobre-expresión podría tener efecto en la expresión del gen blanco de p53 *GADD45A*. La proteína Gadd45A está involucrada en el arresto del ciclo celular, específicamente en la Fase G2/M. La PCR cuantitativa en tiempo real del gen *GADD45A* mostró que solo el tratamiento con Cisplatino (37  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) tuvo un efecto en la expresión de *GADD45A* al encontrarse sub-expresado de forma significativa (\* $p > 0.0374$ ) en comparación con el grupo control sin tratamiento. Con la Casiopeína IIIa observamos el mismo comportamiento aunque no fue significativo (Figura 5).



**Figura 5: Expresión relativa diferencial del gen *GADD45A*.** Imagen que muestra la expresión relativa diferencial en veces de cambio del gen *GADD45A* para las 3 condiciones: SK-N-SH sin tratamiento (Control); Cisplatino (37  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); Cas IIIa (31  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

#### **Efecto de la Casiopeína IIIa sobre ciclo celular**

Para confirmar si el tratamiento con Casiopeína IIIa tenía efecto sobre el ciclo celular incluso a falta de expresión de *GADD45A*, realizamos un análisis por citometría de flujo (Guava® Muse® Cell Analyzer, Texas, EUA). Los datos crudos de los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular, fueron analizados mediante una ANOVA de dos vías. Aquellos datos que mostraron diferencias significativas entre sus medias fueron analizados por una prueba *post hoc* de Dunnet. Los datos mostraron una diferencia significativa en el aumento del porcentaje de células en la fase G0/G1, únicamente después del tratamiento con Casiopeína IIIa (\* $p = 0.0257$ ) y una disminución significativa del porcentaje de células en la fase S del ciclo celular (\* $p = 0.0396$ ). Tampoco observamos una diferencia significativa del porcentaje de células en la fase G2/M entre los tratamientos. Igualmente, no encontramos diferencias significativas cuando comparamos cada tratamiento con el grupo control de células sin tratamiento (Figura 6).



**Figura 6: Porcentaje de células de NB en las diferentes fases del ciclo celular:** Imagen que muestra el porcentaje de células en las etapas del ciclo celular G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>/M para las células SK-N-SH en las 3 condiciones. C: control (sin tratamiento); Cisp: **Cisplatino** (37 µg/mL); Cas **IIIa** (31 µg/mL).

## DISCUSIÓN

La amplificación del oncogén *N-MYC* es el factor independiente con más relevancia en el NB y la disminución o aumento de la presencia de esta molécula otorga al paciente un pronóstico de supervivencia (Westermarck et al., 2011). La Casi IIIa se encuentra en Fase clínica I y ha arrojado resultados prometedores debido a que las líneas celulares y los

modelos animales, han sufrido apoptosis mitocondrial luego del tratamiento con Cas IIIa (Carvalho-Chaigneau et al., 2008; Mejia and Ruiz-Azuara, 2008; García-Ramos et al., 2017; Vázquez-Aguirre et al., 2019). Hasta el momento, no existen reportes donde se demuestre el efecto de este tratamiento sobre los genes *N-MYC* y *TP53*.

Como primera instancia, observamos el efecto del tratamiento con la concentración letal media de la Cas IIIa sobre la línea celular de Neuroblastoma SK-N-SH, bajo microscopio invertido donde claramente podemos ver un mayor efecto del tratamiento experimental sobre la morfología y prolongaciones celulares en comparación con el tratamiento con Cisplatino en las células SK-N-SH, las cuales han sido reportadas previamente como resistentes a este fármaco (García-Ramos et al., 2017). Es importante resaltar la selectividad tumoral de la Cas IIIa donde observamos que es necesario adicionar una dosis menor (31µg/mL) de Cas IIIa para alcanzar a su concentración letal media de células SK-N-SH en comparación del tratamiento con Cisplatino (37µg/mL) (Tabla 3). Este experimento se realizó con la [CL<sub>50</sub>] de cada tratamiento aún que sería interesante evaluar el efecto citotóxico y a nivel molecular de los tratamientos a la misma concentración con el fin de contrastar de forma correcta el efecto citotóxico que se observa en la línea celular SK-N-SH.

Para conocer el efecto del tratamiento de la Cas IIIa sobre los genes de nuestro interés *TP53* y *N-MYC* relacionados con la apoptosis y la proliferación celular respectivamente, en células SK-N-SH, se visualizaron los datos de una PCR cuantitativa en tiempo real con los primers obtenidos de literatura (Mlakar *et al.*, 2019; Sola *et al.*, 2020) y los restantes diseñados por nosotros a través de la plataforma primer-blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Tabla 4). Estudios anteriores han establecido altos niveles de *N-MYC* en 7 líneas celulares de Neuroblastoma, no obstante, reportaron a las células SK-N-SH sin sobreexpresión ni amplificación del oncogén *N-MYC* (Lee et al., 2019). Nosotros concordamos con estos datos al encontrar la expresión relativa de *N-MYC* en niveles de ct muy cercanos a la expresión basal.

Por una parte, demostramos que el grupo tratado con 31µg/mL de Cas IIIa produce disminución en la expresión de *N-MYC* casi una vez en comparación del control sin tratamiento, esta disminución podría significar a su vez una disminución en la presencia de

la proteína final y con esto tumores menos agresivos (Westermarck et al., 2011). Futuros experimentos en la búsqueda de la proteína N-myc deberían realizarse para confirmar la disminución de la presencia de la proteína al igual que de su respectiva expresión del gen luego del tratamiento con Cas IIIa. Este efecto de disminución también fue reportado para el grupo tratado con 37µg/mL de Cisplatino y sería interesante también corroborar la presencia disminuida de la proteína luego del tratamiento. Si bien no se observa una diferencia significativa entre los tratamientos de Cisplatino y Cas IIIa, corroboramos que el tratamiento con Cisplatino y Cas IIIa tiene un efecto inhibitorio en la expresión del oncogén *N-MYC*

Por otra parte, la expresión relativa de *TP53* para ambos tratamientos resultó en una sobre-expresión de casi 3 veces de cambio para el Cisplatino después de 4 h y aproximadamente 2 veces para la Cas IIIa, en comparación con el grupo control sin tratamiento. Estos resultados concuerdan con Jiang and Dong (2008), que reportan que el Cisplatino eleva la expresión de *TP53* gracias a su efecto antineoplásico como mecanismo de acción. Slack y colaboradores en el 2005, reportaron que en la línea celular SK-N-SH se encuentra inhibida la expresión de *TP53* de forma indirecta a través de la proteína N-myc y Mdm2, ya que el gen *MDM2* dentro de su promotor tiene una región donde N-myc puede interactuar como factor de transcripción y sobre-expresar a *MDM2*, para regular de forma negativa a p53 y su actividad como factor de transcripción (Slack, Lozano and Shohet, 2005). Sería interesante incluir en experimentos subsecuentes la expresión relativa del gen regulador *MDM2* con y sin tratamiento, con el fin de comprobar si el efecto de sobre-expresión de *TP53* corresponde a la inhibición de la expresión de *MDM2* en células SK-N-SH.

Con el fin de corroborar si esta sobre-expresión observada de *TP53* pudiera resultar en la activación de un factor de transcripción como un gen blanco de p53, nos dimos a la tarea de buscar la expresión relativa de *GADD45A* (Figura 5). La función más importante de *GADD45A* está relacionada con la inducción del arresto de crecimiento y la reparación del ADN en la fase G<sub>2</sub>/M, indicando un rol crucial en el mantenimiento de la estabilidad genómica, en la respuesta del daño al ADN y en la transformación a cáncer (Smaldone et al., 2021). En nuestro caso, no encontramos diferencia significativa para el tratamiento con

Cas IIIa en comparación con el grupo sin tratamiento; no obstante, para el Cisplatino existe una diferencia significativa (\*p = 0.0341) en comparación con el tratamiento. Es importante mencionar que esta medición se realizó a las 4 h posteriores a ambos tratamientos. Por su parte Moskalev *et al.*, (2012) describen que la vida media del transcrito de *GADD45A* es usualmente corta a 1 h, sugiriendo que la actividad de *GADD45A* es más que nada reguladora en vez de presentar alguna función metabólica. Si bien un estrés genotóxico y oxidativo podría inducir rápidamente su transcripción e incrementar la estabilidad del transcrito (Moskalev *et al.*, 2012), nosotros no encontramos algún nivel de sobre-expresión en el gen *GADD45A*. Sería interesante realizar en futuros experimentos una cinética de expresión partiendo de tiempos más inmediatos después del tratamiento, con el fin de asegurar que el mecanismo de acción de la Cas IIIa no tiene ningún involucramiento en *GADD45A*.

Por último, decidimos comprobar el efecto de los tratamientos sobre el ciclo celular en células SK-N-, midiendo el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular. Obtuvimos un porcentaje por arriba del 60% de células del grupo control sin tratamiento en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> lo que concuerda con estudios previos donde antes de algún tratamiento reportan más del 50% de células en fase G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> y un porcentaje menor al 20% en etapa G<sub>2</sub>/M (Lee *et al.*, 2019), comportamiento el cual también observamos antes en ambos tratamientos (Figura 6). Después de los tratamientos con Cisplatino y Cas IIIa se observa únicamente una disminución de células en fase S (\*p = 0.0396) y aumento de forma significativa del porcentaje a 80% de células en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> después del tratamiento con Cas IIIa (p=0.0257) a diferencia de Lee y colaboradores (2019) que solo observaron un aumento del porcentaje de células en fase G<sub>2</sub>/M después de la inhibición de la expresión del gen codificante para la proteína metiltransferasa de argininas 1 (PRMT1 por sus siglas en inglés) en células de NB. Estos datos indican que otro mecanismo debe ser necesario para el efecto de la Casiopeína IIIa en el ciclo celular. Nuestros resultados remarcan que el mecanismo de acción de la Cas IIIa después de 4 h en células SK-N-SH, no tiene efecto sobre la fase G<sub>2</sub>/M debido a que no observamos acumulación de células en esta fase, ni aumento en la expresión relativa de *GADD45A*.

Las limitaciones de este estudio se centran principalmente en la utilización de una sola línea celular de neuroblastoma sin amplificación o sobre-expresión de *N-MYC* (SK-N-SH) por lo cual no es posible comprobar si este efecto será el mismo en células de Neuroblastoma con amplificación de *N-MYC*. Otra limitante de nuestro estudio fue la incorporación de solo un blanco específico de regulación de expresión a través de p53 como factor de transcripción, sería interesante incluir otros blancos de activación de p53 en diferentes fases del ciclo celular para agregar información al mecanismo de acción de la Cas IIIa.

### CONCLUSIÓN

El tratamiento con Cas IIIa tuvo un efecto sobre la expresión de genes *TP53* y *N-MYC* al disminuir su expresión luego de 4 horas. Observamos una disminución en la expresión relativa de *N-MYC* lo que puede resultar en tumores menos agresivos de NB, a su vez observamos un incremento en la expresión relativa de *TP53* lo que puede deberse a que el mecanismo de acción de la Cas IIIa tiene alguna relación con esta molécula involucrada en el arresto del ciclo celular y apoptosis. Si bien buscamos un gen blanco activado por p53 como factor de transcripción después del tratamiento con Cas IIIa, no fue posible identificar la actividad de p53 como factor de transcripción debido a que no encontramos una elevación en la expresión del gen *GADD45A* el cual está involucrado en el arresto celular en fase G<sub>2</sub>/M, sin embargo, concluimos que el panorama completo del mecanismo de acción de la Cas IIIa en células de Neuroblastoma sin amplificación ni sobre-expresión de *N-MYC* es más complicado de lo que encontramos en las células SK-N-SH, ya que con la búsqueda de un solo marcador de activación de p53 solo podemos explicar de forma parcial el mecanismo de acción de la Casiopeína IIIa.

## **BIBLIOGRAFÍA.**

Agarwal, S. *et al.* (2018) 'MYCN acts as a direct co-regulator of p53 in MYCN amplified neuroblastoma', *Oncotarget*, 9(29), pp. 20323–20338. doi: 10.18632/oncotarget.24859.

Barone, G. *et al.* (2014) 'MDM2-p53 Interaction in Paediatric Solid Tumours: Preclinical Rationale, Biomarkers and Resistance', *Current Drug Targets*, 15(1), pp. 114–123. doi: 10.2174/13894501113149990194.

Bell, E. *et al.* (2010) 'MYCN oncoprotein targets and their therapeutic potential', *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 293(2), pp. 144–157. doi: 10.1016/j.canlet.2010.01.015.

Berlanga, P., Cañete, A. and Castel, V. (2017) 'Advances in emerging drugs for the treatment of neuroblastoma', *Expert Opinion on Emerging Drugs*. Taylor & Francis, 22(1), pp. 63–75. doi: 10.1080/14728214.2017.1294159.

Cao, X. *et al.* (2020) 'Towards the overcoming of anticancer drug resistance mediated by p53 mutations', *Drug Resistance Updates*. Elsevier, 49(October 2019), p. 100671. doi: 10.1016/j.drug.2019.100671.

Carvallo-Chaigneau, F. *et al.* (2008a) 'Casiopaina III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo', *BioMetals*, 21(1), pp. 17–28. doi: 10.1007/s10534-007-9089-4.

Carvallo-Chaigneau, F. *et al.* (2008b) 'Casiopaina III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo', *BioMetals*, 21(1), pp. 17–28. doi: 10.1007/s10534-007-9089-4.

Chen, L. *et al.* (2010) 'p53 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma', *Cancer Research*, 70(4), pp. 1377–1388. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2598.

Colegio, O. R. *et al.* (2012) 'Principles of Tumor Biology and Pathogenesis of BCCs and SCCs', *Dermatology*, pp. 1759–1773. doi: 10.1016/B978-0-7020-6275-9.00107-0.

Delloye-Bourgeois, C. and Castellani, V. (2019) 'Hijacking of embryonic programs by neural crest-derived neuroblastoma: From physiological migration to metastatic dissemination', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12(March), pp. 1–14. doi: 10.3389/fnmol.2019.00052.

Ferrucci, F. *et al.* (2018) 'MAX to MYCN intracellular ratio drives the aggressive phenotype and clinical outcome of high risk neuroblastoma', *Biochimica et Biophysica*



- Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. Elsevier B.V, 1861(3), pp. 235–245. doi: 10.1016/j.bbagr.2018.01.007.
- García-Ramos, J. C. *et al.* (2017) ‘The mitochondrial apoptotic pathway is induced by Cu(II) antineoplastic compounds (Casiopeínas®) in SK-N-SH neuroblastoma cells after short exposure times’, *BioMetals*, 30(1), pp. 43–58. doi: 10.1007/s10534-016-9983-8.
- Geurten, C. *et al.* (2019) ‘Endocrine consequences of neuroblastoma treatment in children: 20 years’ experience of a single center’, *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 32(4), pp. 347–354. doi: 10.1515/jpem-2018-0273.
- Gonzalzo, M. L. and Meeker, A. K. (2012) ‘Molecular Genetics and Cancer Biology’, *Campbell-Walsh Urology*, pp. 530-567.e16. doi: 10.1016/b978-1-4160-6911-9.00018-9.
- Green, D. R. K. G. (2004) ‘Cytoplasmic functions of p53’, *Nature*, 458(7242), pp. 1–10. doi: 10.1038/nature07986.Cytoplasmic.
- Gröbner, S. N. *et al.* (2018) ‘The landscape of genomic alterations across childhood cancers’, *Nature*, 555(7696), pp. 321–327. doi: 10.1038/nature25480.
- Gutiérrez, A. G. *et al.* (2013) ‘Copper(ii) mixed chelate compounds induce apoptosis through reactive oxygen species in neuroblastoma cell line chp-212’, *Journal of Inorganic Biochemistry*. Elsevier Inc., 126(3), pp. 17–25. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2013.05.001.
- Irwin, M. S. and Park, J. R. (2015) ‘Neuroblastoma: Paradigm for precision medicine’, *Pediatric Clinics of North America*, 62(1), pp. 225–256. doi: 10.1016/j.pcl.2014.09.015.
- Jiang, M. and Dong, Z. (2008) ‘Regulation and pathological role of p53 in cisplatin nephrotoxicity’, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 327(2), pp. 300–307. doi: 10.1124/jpet.108.139162.
- Laurenti, E., Wilson, A. and Trumpp, A. (2009) ‘Myc’s other life: stem cells and beyond’, *Current Opinion in Cell Biology*, 21(6), pp. 844–854. doi: 10.1016/j.ceb.2009.09.006.
- Lee, Y. J. *et al.* (2019) ‘Downregulation of PRMT1 promotes the senescence and migration of a non-MYCN amplified neuroblastoma SK-N-SH cells’, *Scientific Reports*. Springer US, 9(1), pp. 1–14. doi: 10.1038/s41598-018-38394-6.
- Mejia, C. and Ruiz-Azuara, L. (2008) ‘Casiopeínas iigly and IIIia induce apoptosis in medulloblastoma cells’, *Pathology and Oncology Research*, 14(4), pp. 467–472. doi: 10.1007/s12253-008-9060-x.

- Mlakar, V. *et al.* (2019) 'PRIMA-1MET-induced neuroblastoma cell death is modulated by p53 and mycn through glutathione level', *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), pp. 1–14. doi: 10.1186/s13046-019-1066-6.
- Moskalev, A. A. *et al.* (2012) 'Gadd45 proteins: Relevance to aging, longevity and age-related pathologies', *NIH Public Access*, 11(1), pp. 51–66. doi: 10.1016/j.arr.2011.09.003.Gadd45.
- Oh, L. *et al.* (2019) 'P53, stem cell biology and childhood blastomas', *Current Opinion in Oncology*, 31(2), pp. 84–91. doi: 10.1097/CCO.0000000000000504.
- Pinto, N. R. *et al.* (2015) 'Advances in risk classification and treatment strategies for neuroblastoma', *Journal of Clinical Oncology*, 33(27), pp. 3008–3017. doi: 10.1200/JCO.2014.59.4648.
- Raffeiner, P. *et al.* (2014) 'In vivo quantification and perturbation of Myc-Max interactions and the impact on oncogenic potential', *Oncotarget*, 5(19), pp. 8869–8878. doi: 10.18632/oncotarget.2588.
- Rich, B. S. and La Quaglia, M. P. (2012) *Neuroblastoma*. 7th edn, *Pediatric Surgery*. 7th edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-323-07255-7.00031-3.
- Slack, A., Lozano, G. and Shohet, J. M. (2005) 'MDM2 as MYCN transcriptional target: Implications for neuroblastoma pathogenesis', *Cancer Letters*, 228(1–2), pp. 21–27. doi: 10.1016/j.canlet.2005.01.050.
- Smaldone, G. *et al.* (2021) 'Members of the GADD45 protein family show distinct propensities to form toxic amyloid-like aggregates in physiological conditions', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19). doi: 10.3390/ijms221910700.
- Sokol, E. and V. Desai, A. (2019) 'The Evolution of Risk Classification for Neuroblastoma', *Children*, 6(27), pp. 1–12. doi: 10.3390/children6020027.
- Sola, M. *et al.* (2020) 'Tau affects P53 function and cell fate during the DNA damage response', *Communications Biology*. Springer US, 3(1), pp. 1–15. doi: 10.1038/s42003-020-0975-4.
- Stiewe, T. and Haran, T. E. (2018) 'How mutations shape p53 interactions with the genome to promote tumorigenesis and drug resistance', *Drug Resistance Updates*. Elsevier,

38(April 2018), pp. 27–43. doi: 10.1016/j.drup.2018.05.001.

T. Bieging, K., Spano Mello, S. and D. Attardi, L. (2014) ‘Unravelling mechanism of p53-mediated tumor suppression’, *Nature*, 14, pp. 359–370.

Tan, M., Sobel, R. H. and Ha, P. K. (2017) *Molecular Biology of Head and Neck Cancer*. Sixth Edit, *Oncology Research and Treatment*. Sixth Edit. Elsevier Inc. doi: 10.1159/000477127.

Thornton, C. and Hagberg, H. (2017) *Mechanisms of Cell Death in the Developing Brain*. Fifth Edit, *Fetal and Neonatal Physiology*. Fifth Edit. Elsevier Inc. doi: 10.1016/b978-0-323-35214-7.00007-x.

Tonini, G. P. and Capasso, M. (2020) ‘Genetic predisposition and chromosome instability in neuroblastoma’, *Cancer and Metastasis Reviews*. *Cancer and Metastasis Reviews*. doi: 10.1007/s10555-020-09843-4.

Vázquez-Aguirre, A. *et al.* (2019) ‘Autophagy promotes survival of CHP-212 neuroblastoma cells treated with Casiopeínas®’, *Anticancer Research*, 39(7), pp. 3687–3695. doi: 10.21873/anticancer.13517.

Vo, K. T. *et al.* (2014) ‘Clinical, biologic, and prognostic differences on the basis of primary tumor site in neuroblastoma: A report from the International Neuroblastoma Risk Group project’, *Journal of Clinical Oncology*, 32(28), pp. 3169–3176. doi: 10.1200/JCO.2014.56.1621.

Westermarck, U. K. *et al.* (2011) ‘The MYCN oncogene and differentiation in neuroblastoma’, *Seminars in Cancer Biology*. Elsevier Ltd, 21(4), pp. 256–266. doi: 10.1016/j.semcancer.2011.08.001.