

M. en C. Luis Arturo Jaime
Martínez

Evaluación de la actividad de los componentes del poro de transición de la permeabilidad
mitocondrial en células de neuroblastoma (SK-N-SH) tratadas con la Casiopeína-IIIa

2023



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Evaluación de la actividad de los componentes del poro de transición de
la permeabilidad mitocondrial en células de neuroblastoma (SK-N-SH)
tratadas con la Casiopeína-IIIa

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:
Doctorado en Ciencias Biológicas

Presenta:

M. en C. Luis Arturo Jaime Martínez

Dirigido por:

Dra. María del Carmen Mejía Vázquez

Querétaro, Qro. a Junio 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Evaluación la actividad de los componentes del poro
de transición de la permeabilidad mitocondrial en
células de neuroblastoma SK-N-SH tratadas con la
Casiopeína-IIIa

por

Luis Arturo Jaime Martínez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](#).

Clave RI: CNDCC-255716



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Biológicas

Evaluación de la actividad de los componentes del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial en células de neuroblastoma (SK-N-SH) tratadas con la Casiopeína-IIIa

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta:

M. C. Luis Arturo Jaime Martínez

Dirigido por:

Dra. Ma. del Carmen Mejía Vázquez

Dra. María del Carmen Mejía Vázquez
Presidente

_____ Firma

Dra. Angelina Rodríguez Torres
Secretario

_____ Firma

Dra. Santiago Marisela Ahumada Solórzano
Vocal

_____ Firma

Dra. Lena Ruiz Azuara
Suplente

_____ Firma

Dr. Raúl Adrián Martínez Orozco
Suplente

_____ Firma

Director de la Facultad de Ciencias Naturales

Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Junio, 2023

RESUMEN

El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido extracraneal más común de la infancia y se deriva de las células de la cresta neural. Para los pacientes con NB de alto riesgo, la tasa de supervivencia es muy reducida a pesar de la terapia multimodal. Lo que impulsa la investigación de nuevos compuestos como las Casiopeínas®, las cuales han mostrado un efecto antineoplásico en modelos *in vivo* e *in vitro*. Su mecanismo de acción se basa en la inducción de la apoptosis mitocondrial a través de la sobreproducción de las especies reactivas de oxígeno (ERO). La apoptosis mitocondrial está regulada por la formación del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm), sin embargo, hasta la fecha desconocemos si la CasIIIa puede activar el PTPm. Para averiguarlo nos propusimos inhibir la actividad de las proteínas con mayor relevancia en el PTPm por dos métodos. Para las proteínas accesorias Bax y Bcl-2 se indujo un silenciamiento génico mediante la técnica CRISPR/cas9 en células SK-N-SH y 3T3-L1. Las proteínas estructurales como hexocinasa II (HKII), el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) y ciclofilina D (CypD) se inhibieron farmacológicamente con 3-bromopiruvato (3BrPyr), 4,4'-diisotiocianatostilbeno-2,2'-disulfónico (DIDS) y ciclosporina A (CsA) respectivamente, en células SK-N-SH. En todas las condiciones las células fueron tratadas con su respectiva concentración letal media (CL₅₀) de CasIIIa y cisplatino. Los niveles de retención de Ca²⁺ mitocondrial permitieron determinar que la inactividad de Bax, VDAC y CypD, impiden la despolarización de las membranas mitocondriales en presencia de los tratamientos; mientras que en la ausencia Bcl-2 y HKII ocurrió lo contrario. En la relación a lo anterior, observamos que en las células tratadas con CasIIIa y cisplatino y con silenciamiento del gen *BAX*, la expresión de caspasa-3 fue menor que en las células con *BCL2* silenciado. Los ensayos de ANEXINA-V revelaron que las células tratadas con CasIIIa y cisplatino, donde VDAC y CypD fueron inactivadas, la apoptosis fue menor que en las células donde se inhibió a HKII. Concluimos que Bax, VDAC y CypD son los componentes más importantes en la formación del PTPm. Además de la influencia de estas proteínas sobre el mecanismo de acción de las Casiopeínas®.

Palabras clave: Células SK-N-SH y 3T3-L1; CasIIIa; PTPm; Apoptosis.

ABSTRACT

Neuroblastoma (NB) is the extracranial solid tumor most common in childhood, and it originates from the neural crest cells. High-risk NB patients' survival rate is low even with multimodal therapy. This outcome leads to the investigation of new compounds, such as Casiopeinas® (Cas), which have demonstrated an antineoplastic capacity in vivo and in vitro. Its mechanism of action involves the induction of mitochondrial apoptosis throughout the overproduction of reactive oxygen species (ROS). This type of cell death is regulated by the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) assembly, but it is still not well known how CasIIIia activates it. Therefore, we proposed to inhibit the principal proteins of the mPTP with two strategies. For the Bax and Bcl-2 accessory proteins, we induced gene silencing with the CRISPR/Cas9 technique in SK-N-SH and 3T3-L1 cell cultures. On the other hand, we pharmacologically inactivated the hexokinase (HKII), voltage-dependent anionic channel (VDAC), and cyclophilin D (CypD) structural proteins, by treating the cells with the 3-bromopyruvate (3BrPyr), 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DIDS), and cyclosporin A (CsA) inhibitors, respectively. Cells from all experimental conditions were treated with their median lethal dose (LD₅₀) of CasIIIia and cisplatin. The mitochondrial Ca²⁺ retention levels results allowed us to determine the inactivity of Bax, VDAC, and CypD impairs the mitochondrial membrane depolarization when cells are treated with the antineoplastics, an effect opposite to the observed in the absence of Bcl-2 and HKII. We also observed that in BAX-silenced cells treated with CasIIIia and cisplatin, the level of expression of caspase-3 decreases, contrary to what we see in BCL2-silenced cells. The Annexin V assay revealed that cells with VDAC and CypD inactivation treated with both antineoplastics, have lower apoptosis events than those observed in the HKII-inhibited cells. We conclude that Bax, VDAC, and CypD are the essential components of the mPTP and that these proteins significantly influence the Casiopeinas® mechanism of action.

Key words: SK-N-SH and 3T3-L1 cell; CasIIIia; mPTP; Apoptosis.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por la beca otorgada durante mi estancia en el doctorado con el CVU-708398.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por el apoyo económico brindado a través del FONDEC 2021 con clave 8619. Al laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales por prestar sus instalaciones, instrumental y a cada uno de los miembros que lo integran por su colaboración en el desarrollo y culminación de este trabajo.

A la Dra. Carmen Mejía por su orientación, soporte y discusión crítica que me permitió la mejora constante del proyecto. A quien le debo mi mayor crecimiento como investigador. Gracias por el apoyo y la confianza en mí depositada.

A la Dra. Lena Ruiz Azuara por el apoyo en la adquisición de varios reactivos y el uso de las Casiopeínas en el presente trabajo.

A cada uno de los miembros que forman mi comité sinodal (Dra. Angelina, Dra. Lena, Dra. Marisela y Dr. Raúl) por sus tan acertadas observaciones para la realización del presente trabajo, así como incentivarme e inspirarme a mejorar mi desempeño académico.

A cada uno de mis compañeros del grupo del laboratorio de Investigación Interdisciplinaria en Biomedicina, por recorrer conmigo este camino y apoyarme en mi crecimiento profesional.

A mi padre y madre por ser mi fortaleza día con día, darme ánimos, siempre incentivando mi crecimiento profesional y personal. A mis hermanos que siempre me brindan su apoyo. Un especial agradecimiento a mi esposa y mejor amiga Rocío que se ha convertido en el pilar principal de mi crecimiento en todos los aspectos. Y finalmente a Dios, ya que si él no soy nada.

INDICE

1. INTRODUCCION GENERAL.....	10
1.1 NEUROBLASTOMA.....	10
1.2 ESTRATIFICACIÓN POR GRUPO DE RIESGO.....	12
1.2.1 Bajo riesgo.....	12
1.2.2. Riesgo Intermedio.....	13
1.2.3 Riesgo alto.....	13
1.3 APOPTOSIS.....	14
1.4 CASIOPEÍNAS®.....	18
1.4.1 Mecanismo de acción de las Casiopeínas®.....	20
1.5 ESTRUCTURA DEL PTPm.....	24
1.7. HIPÓTESIS.....	27
1.8. OBJETIVO GENERAL.....	27
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
2. CAPITULO 1: <i>BAX</i> , PERO NO <i>BCL2</i> ES NECESARIO PARA LA APOPTOSIS EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA TRATADAS CON CasIIIia.....	33
2.1 INTRODUCCIÓN.....	33
2.2 MATERIAL Y MÉTODOS.....	34
2.2.1 Cultivo celular.....	34
2.2.2 Silenciamiento de <i>BAX</i> y <i>BCL2</i> mediante CRISPR/Cas9.....	34
2.2.3 Tratamientos.....	35
2.2.4 Evaluación de ERO.....	35
2.2.5 Retención de Calcio.....	36
2.2.6 Determinación de apoptosis por presencia de caspasa-3.....	36
2.2.7 Análisis estadístico.....	37
2.3 RESULTADOS.....	37
2.3.1 Ensayo de viabilidad celular de las células 3T3-L1 para CasIIIia y cisplatino.....	37
2.3.2 Viabilidad celular de células <i>BCL2^{KO}</i> y <i>BAX^{KO}</i>	38
2.3.3 Niveles de O ²⁻ y H ₂ O ₂ en células <i>BAX^{KO}</i> y <i>BCL2^{KO}</i>	39
2.3.4 Capacidad de retención de Ca ²⁺	41
2.3.5 Expresión de caspasa-3.....	42
2.4 DISCUSIÓN.....	43

2.5 CONCLUSIONES.....	45
2.6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍAS.....	45
3. CAPITULO 2: LA CasIIIa PERMITE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL A TRAVÉS DE LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE HK, VDAC Y CypD EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SK-N-SH.....	48
3.1 INTRODUCCIÓN.....	48
3.2 MATERIAL Y MÉTODOS.....	50
3.2.1 Cultivo celular.....	50
3.2.2 Inhibición farmacológica de CypD, VDAC y HK en células de NB.....	50
3.2.3 Tratamientos.....	50
3.2.4 Ensayos de glucosa-6-fosfato.....	50
3.2.5 Retención de Calcio.....	50
3.2.6 Anexina V.....	51
3.2.7 Análisis estadístico.....	51
3.3 RESULTADOS.....	52
3.3.1 Evaluación de la inhibición de HKII y VDAC.....	52
3.3.2 Capacidad de retención de mCa^{2+} de las células de NB por acción de la CasIIIa en presencia de los inhibidores de HKII, VDAC y CypD.....	53
3.3.3 Niveles de apoptosis en células de NB por acción de CasIIIa en presencia de los inhibidores de HKII, VDAC y CypD.....	55
3.4 DISCUSIÓN.....	58
3.5 CONCLUSIONES.....	61
3.6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍAS.....	62

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de las vías apoptóticas extrínseca e intrínseca	15
Figura 2. Esquema de la estructura de una procaspasa y una caspasa madura	166
Figura 3. Esquema de los subgrupos de las proteínas Bcl-2	166
Figura 4. Estructura de las Casiopeínas®	199
Figura 5. Teoría de conjunto sobre el mecanismo de acción de las Casiopeínas	233
Figura 6. Estructura clásica del PTPm	255
Figura 5. Evaluación del silenciamiento génico de BAX y BCL2 en células de NB y 3T3-L1	399
Figura 6. Producción de O_2^- con el tratamiento con Casillia en células SK-N-SH y 3T3-L1	40
Figura 7. Producción de H_2O_2 con el tratamiento de células SK-N-SH y 3T3-L1 con Casillia	41
Figura 8. Capacidad de retención de Ca^{2+}	42
Figura 9. Evaluación de la apoptosis mitocondrial.....	43
Figura 10. Determinación de la concentración de trabajo de 3BrPyr.....	52
Figura 11. Determinación de la concentración de trabajo de DIDS	53
Figura 12. Estado de los niveles retención de mCa^{2+} en células de NB con HKII, VDAC y CypD inhibidas.....	55
Figura 13. Porcentaje de apoptosis en células de NB con HKII, VDAC y CypD inhibidas	57

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estadios del NB y sus características clínicas.....	11
Tabla 2. CL_{50} en líneas celulares de NB y fibroblastos.....	37

1. INTRODUCCION GENERAL

1.1 NEUROBLASTOMA

Descrito por primera vez por James Wright en 1910, el neuroblastoma (NB) es un tumor embrionario del sistema nervioso simpático (SNS), que deriva de células de la cresta neural y se localiza más frecuentemente en tejidos de dicho sistema como las glándulas suprarrenales, o en los ganglios paravertebrales (Huang y Weiss, 2013).

Es considerado el tumor sólido extracraneal más común de la infancia; representa aproximadamente el 8-10 % de las neoplasias malignas pediátricas y es responsable del 15 % de la muerte en menores por cáncer infantil (Davidoff, 2012). Existen múltiples variables clínicas que ayudan a estratificar al NB para determinar el riesgo que presentan estos niños y su posible respuesta al tratamiento, como lo son la edad del paciente y la etapa del tumor al momento del diagnóstico (Evans *et al.*, 1987).

Las causas de este padecimiento no han sido descritas con claridad, sin embargo, la predisposición genética y la epigenética apuntan a ser las causas potenciales (Davidoff, 2012). Se han descrito escasos factores biológicos, y varias alteraciones cromosómicas que apoyan la clasificación de los tumores tales como deleciones de 1p, 3p, 11q, ganancia en 17q y la amplificación del oncogen *N-MYC*; este último es considerado el factor pronóstico independiente más importante (Brodeur y Bagatell, 2014; Campbell *et al.*, 2019)

El NB presenta una enorme heterogeneidad biológica, tanto así que su comportamiento abarca desde la regresión espontánea por activación de los mecanismos de apoptosis en el estadio 4s (special), hasta los casos de metástasis altamente agresiva durante los estadios 3 y 4 que no responden al tratamiento convencional (Louis, 2015).

Los criterios de clasificación del NB fueron postulados por primera vez en 1988, los cuales fueron revisados nuevamente en 1993. Los diferentes estadios fueron estratificados en base al Sistema Internacional de Estratificación de Neuroblastoma (INSS *International Neuroblastoma Staging System*), el cual depende de la

valoración quirúrgica del tumor (Davidoff, 2012). Actualmente, se utiliza el esquema de clasificación del Grupo Internacional de Riesgo de Neuroblastoma (INRG *International Neuroblastoma Risk Group*) donde consideran características histológicas y marcadores genéticos para un mejor diagnóstico y tratamiento del NB (Cohn *et al.*, 2009). Las características de cada estadio se pueden apreciar en la **Tabla 1.**

Tabla 1. Estadios del NB y sus características clínicas.

Estadio INRG	Edad (meses)	Categoría Histológica	Grado de diferenciación del tumor	N-MYC	Deleción 11q	Grupo de riesgo pretratamiento
L1/L2		GN maduro GNB intermedio				Muy bajo
L1		Ninguna, excepto GN maduro o GNB intermedio		NA		Muy bajo
				Amp		Alto
L2	< 18	Ninguna, excepto GN maduro o GNB intermedio		NA	No	Bajo
					Sí	Intermedio
	≥18	GNB nodular; neuroblastoma	Diferenciado	NA	No	Bajo
			Pobremente diferenciado	NA	Sí	Intermedio
M	< 18			NA		bajo
	< 12			NA		Intermedio
	12 a < 18			NA		Intermedio
	< 18			Amp		Alto
	≥18					Alto
MS	<18			NA	No	Muy bajo
					Sí	Alto
				Amp		Alto

Esquema de clasificación previa al tratamiento por el INRG. GN, ganglioneuroma; GNB, ganglioneuroblastoma; NA, no amplificado; Amp, amplificado (Tomado de Cohn *et al.* 2009).

Del estadio 4s (MS) se tenían reportes previos, pero no fue sino hasta que Evans y D'Angio en 1971 resaltaron los parámetros para clasificar esta etapa del NB. Observaron que algunos infantes presentaban diseminación metastásica limitada de tumores primarios. Reportaron que los pacientes con dichas

características poseían un panorama muy alentador en la mejoría del malestar, algunos incluso en ausencia de un tratamiento antitumoral (Brodeur y Bagatell, 2014). Con base en los estudios realizados hasta el momento, se cree que la involución del NB ocurre mediante la apoptosis de las células neoplásicas.

En los casos menos agresivos del NB, la primera opción al tratamiento es la remoción quirúrgica. Pero el enfoque general a la respuesta terapéutica en los casos más agravados es el uso intensivo de quimioterapéuticos (Davidoff, 2012). Debido a la diversidad biológica, el comportamiento clínico y la respuesta variable al tratamiento, se desarrolla la terapia multimodal para lograr una mayor tasa de supervivencia en pacientes de alto riesgo. La elección efectiva en el tratamiento es un punto crucial para obtener un mejor resultado, por lo que es importante identificar de manera correcta el cuadro clínico del NB (Luo *et al.*, 2018; Geneshan *et al.*, 2011).

1.2 ESTRATIFICACIÓN POR GRUPO DE RIESGO

Las estrategias terapéuticas utilizadas actualmente están basadas en la estratificación de riesgo propuesta por el *Children's Oncology Group* (COG), clasificándolas en grupos de riesgo bajo, intermedio y alto en función de distintos factores como son la edad, histopatología del tumor, índice de ADN y estado del oncogen *N-MYC*; con la finalidad de determinar la modalidad e intensidad en la terapia aplicada (Luo *et al.*, 2018; Geneshan *et al.*, 2011).

1.2.1 Bajo riesgo

Las características del tipo de NB presentes en este grupo de pacientes están dadas por ser un tumor localizado biológicamente favorable y, por tanto, con altas probabilidades de ser tratable y curable. En este grupo se incluyen aquellos pacientes en etapas L1 y L2 en donde no se observa amplificación del oncogen *N-MYC*. Además, dentro de este grupo también se incluye a aquellos pacientes que se encuentran en el estadio MS (Kushner, 2004).

Las estrategias actualmente utilizadas son en primera estancia la resección quirúrgica, debido al pronóstico alentador que existe en este tipo de población. Por otra parte, aquellos pacientes con estadio MS asintomáticos, generalmente se

someten a una biopsia y puede controlarse solo con revisiones continuas, a menos que presenten síntomas de peligro en el momento del diagnóstico (Luo *et al.*, 2018; Davidoff, 2012).

1.2.2. Riesgo Intermedio

Los pacientes categorizados en este grupo comprenden pacientes en los estadios L1, L2 y M sin amplificación de *N-MYC*, estos dos últimos con histología del tumor favorable. También se incluyen los estadios MS asintomáticos, pero con histología no favorable (Davidoff, 2012). De acuerdo con el COG, el protocolo habitual de tratamiento aplicado para este grupo de pacientes se basa en la respuesta y biología del tipo de NB.

Los pacientes con “riesgo intermedio” que no son susceptibles a la resección quirúrgica, reciben sesiones de quimioterapia de 4 a 8 ciclos con la finalidad de detener la progresión del tumor, tanto en disminución del volumen del mismo como la remisión metastásica. Los agentes quimioterapéuticos utilizados comúnmente para esta clase de pacientes son: ciclofosfamida, carboplatino, etopósido y doxorubicina (Luo *et al.*, 2018; Davidoff, 2012).

1.2.3 Riesgo alto

En esta categoría se incluye cualquier estadio (excepto el estadio L1) con presencia de amplificación del gen *N-MYC*, pacientes con tumores en estadios L2 y M con histología desfavorable (Davidoff, 2012). Este grupo presenta estadísticas limitadas en los porcentajes de supervivencia a pesar de los múltiples avances en la aplicación de distintas terapias de tratamiento, y aún continúa siendo un reto para mejorar los resultados y minimizar los riesgos.

El tratamiento está basado en sesiones de quimioterapia e inmunoterapia y suele durar aproximadamente 18 meses. Durante la etapa de inducción, los pacientes reciben de 5 a 8 ciclos de quimioterapia intensiva en donde se incluyen fármacos como vincristina, doxorubicina, ciclofosfamida, cisplatino y etopósido. Además, durante esta etapa los pacientes también son sometidos a la recolección de células madre para posteriormente llevar a cabo un trasplante autólogo y casi

cerca de la recta final de la etapa de la quimioterapia de inducción, aproximadamente entre el 4° ó 6° ciclo se realiza la resección quirúrgica.

La fase de consolidación pretende eliminar los rastros de la enfermedad después de la aplicación de la terapia intensiva realizada en la primera etapa, sumando nuevamente sesiones de quimioterapia en dosis altas, seguidas del trasplante autólogo de células madre con inclusión de radioterapia. Finalmente, la última etapa tiene como finalidad prevenir la recaída del paciente y la aplicación de inmunoterapia (Smith y Foster, 2018; Van y Chung, 2019).

Los agentes a base de platino (cisplatino y carboplatino), los alcaloides de la Vinca (vincristina) y los inhibidores de las topoisomerasas (etopósido y doxorubicina), se han utilizado contra una variedad de neoplasias infantiles, como es el caso del NB. Aunque presentan diversos mecanismos de acción dentro de las células, todos los quimioterapéuticos descritos tienen un objetivo principal, producir citotoxicidad y con ello la inducción de apoptosis (Smith *et al.*, 2018).

1.3 APOPTOSIS

La apoptosis es un proceso normal y dependiente de energía, que se caracteriza por estar finamente organizada en los procesos que conducen a la muerte celular. Por dicha razón, a la apoptosis se le conoce como la muerte celular programada, que difiere de su contraparte no regulada, la necrosis. Las causas de los procesos que llevan al deceso de una célula por apoptosis están regulados a nivel genético como las que suceden durante el daño al ADN, la incapacidad para regular la concentración de las especies reactivas de oxígeno (ERO), por la presencia de un patógeno, e incluso durante el desarrollo de manera normal (Karp y Ariaza, 2011).

Durante el proceso de la muerte celular programada, las células sufren cambios morfológicos característicos como el encogimiento del volumen del citosol y el núcleo, formación de vesículas de la membrana plasmática (cuerpos apoptóticos), externalización de la fosfatidilserina, condensación de la cromatina y fragmentación del ADN. La expresión de la fosfatidilserina en la parte externa de la membrana celular es un factor de reconocimiento para los macrófagos quienes

internalizan los cuerpos apoptóticos para su posterior fagocitosis, lo cual impide la liberación de componentes proinflamatorios (Pistritto *et al.*, 2016).

La apoptosis está mediada por las proteínas conocidas como caspasas (proteasas de cisteína específicas de aspartato). La familia de las caspasas se divide entre caspasas iniciadoras (-8, -9 y -10) y caspasas ejecutoras (-3, -6 y -7). Las iniciadoras median el principio de las vías de apoptosis y las ejecutoras son responsables de las acciones de la desestabilización de los componentes celulares (Elmore, 2007).

Existen dos rutas por las cuales una célula puede ser conducida por apoptosis; la vía extrínseca y la intrínseca (**Fig. 1**). La vía extrínseca es dependiente de receptores y se acciona por la interacción del ligando de la familia de proteínas del factor de necrosis tumoral (TNF) con su respectivo receptor transmembranal. Dicha interacción estimula el acarreamiento de proteínas intracelulares que presentan dominios de muerte (DD) como la proteína de dominio de muerte asociado a FAS (FADD), el factor de necrosis tumoral del receptor tipo 1 asociado a proteínas de dominio de muerte (TRADD), procaspasa-8 y/o -10, y como consecuencia formalizan el complejo de señalización inductor de muerte (DISC).

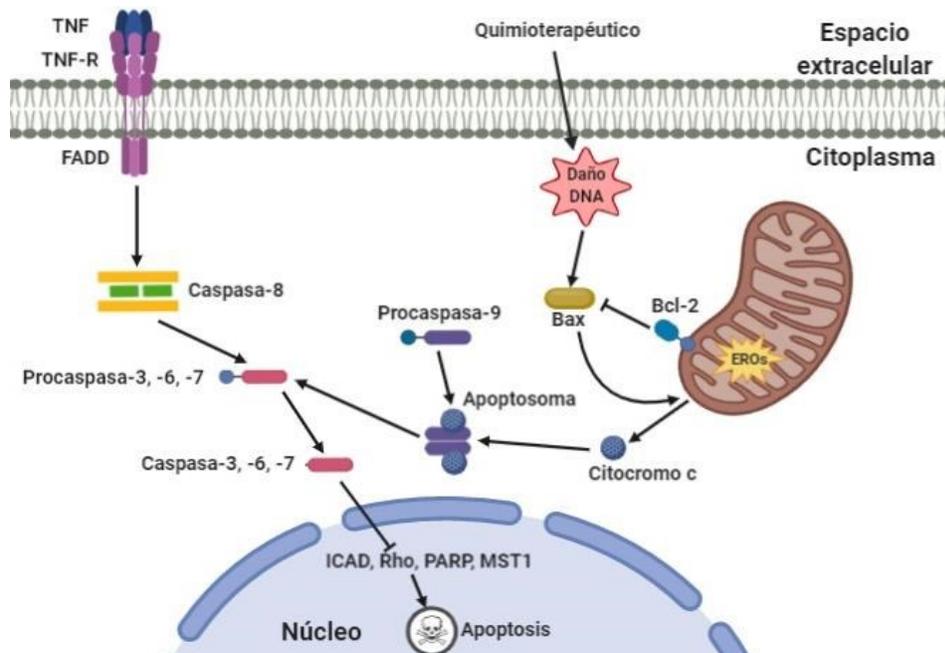


Figura 1. Esquema de las vías apoptóticas extrínseca e intrínseca. Se muestran las dos rutas de muerte celular programada (Pistritto *et al.*, 2016)

El complejo DISC escinde el prodominio de la procaspasa-8 y/o -10, las cuales maduran a caspasa-8 y/o -10, las que posteriormente catalizan a las procaspasas ejecutoras para que puedan realizar sus acciones proteolíticas sobre los componentes celulares, e inducir la muerte (**Fig. 2**) (Pistritto *et al.*, 2016; Karp y Ariaza, 2011).

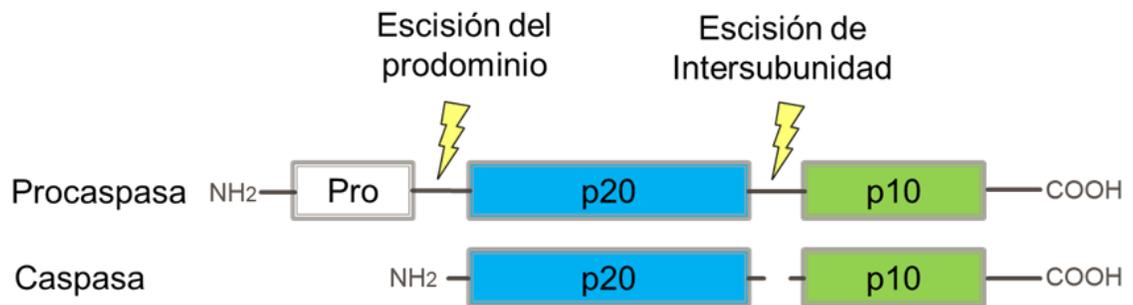


Figura 2. Esquema de la estructura de una procaspasa y una caspasa madura. Muestra el dominio predominio (Pro), el dominio largo (p20) y el dominio corto (p10), así como los sitios donde lleva a cabo los cortes para poder madurar. (Shalini S., *et al.*, 2015)

Los estímulos internos como el daño genético irreversible, las concentraciones de Ca^{2+} citoplásmico, infecciones virales o daño relacionado al estrés oxidativo, desencadenan la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis (Pistritto *et al.*, 2016). Esta vía está regulada por los miembros la superfamilia de proteínas Bcl-2, cuya característica principal es la presencia de uno o más dominios de homología (BH) (**Fig. 3**).

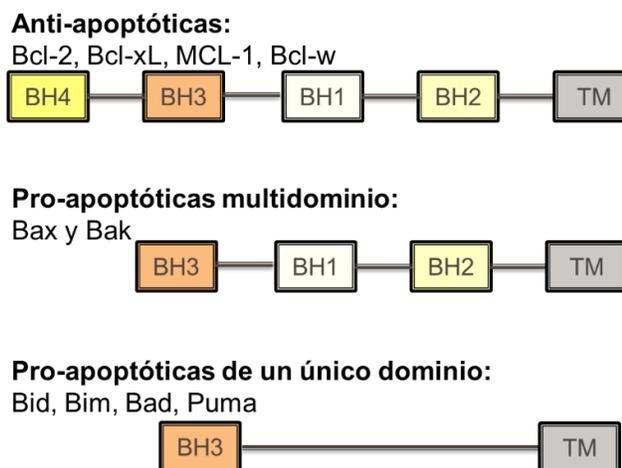


Figura 3. Esquema de los subgrupos de las proteínas Bcl-2. Las proteínas Bcl-2 se clasifican en tres subgrupos, uno con actividad antiapoptótica y dos con función proapoptótica, dependiendo de la composición de los dominios BH típicos, enumerados de BH1 a BH4 (Pistritto *et al.*, 2016).

Dentro de la familia Bcl-2 existe una clasificación en base a su acción apoptótica y el número de dominios BH en su estructura: 1) proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, entre otras, cuya homología es la presencia de 4 dominios BH (BH1-BH4); 2) proteínas precursoras de la apoptosis con multidominios BH (BH2-BH3), Bax y Bak; y 3) proteínas pro-apoptóticas de un solo dominio BH (BH3), Bid, Bim, Bad, Puma Noxa, etc. (Moldoveanu *et al.*, 2014).

En una célula normal, las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 pueden suprimir a sus homólogos apoptóticos. Por el contrario, en presencia de un estímulo que desencadene la vía intrínseca, los componentes proapoptóticos (Bax, Bak) neutralizan a las proteínas antiapoptóticas, lo que conduce a una alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial y provocan la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). Dicha alteración trae como consecuencia la liberación al citosol de proteínas que primordialmente están confinadas al espacio intermembranal de la mitocondria.

Una de estas proteínas es el citocromo c (Cyt c), el cual es un mediador importante en la apoptosis mitocondrial. Una vez en el citoplasma, Cyt c se acopla a Apaf-1 y a procaspasa-9, formando un complejo multiproteico denominado apoptosoma con acción proteolítica similar a caspasa-8, el cual activa a las caspasas ejecutoras corriente abajo (caspasas -3, -6 y -7) para la escisión de sustratos celulares que conducen a la muerte celular (Pistritto *et al.*, 2016; Elmore, 2007).

La activación de las caspasas ejecutoras trae consigo la degradación de sustratos específicos como la proteína ICAD (inhibidor de la nucleasa CAD), Rho (factor de terminación de la transcripción), ROCK1 (regulador del citoesqueleto), la cinasa estimulante de macrófagos 1 (MST1) y la poli [ADP-ribosa] polimerasa (PARP), ambas proteínas encargadas de la reparación del DNA y factores de iniciación de la transcripción y la traducción. La escisión y/o activación de todos estos componentes, acarrea alteraciones en el ADN y la desestabilización estructural de la célula.

La ruptura del ADN origina fragmentos de aproximadamente 200 pb además de la degradación de organelos y proteínas. Finalmente aparecen los macrófagos, que serán los encargados de degradar los cuerpos apoptóticos (D'amelio *et al.*, 2010).

Como se describió anteriormente los quimioterapéuticos tienen la finalidad de inducir la apoptosis, principalmente la vía intrínseca, a través de diferentes mecanismos ya sea por desestabilización del DNA, el impedimento de la replicación celular o la toxicidad inducida por las ERO. No obstante, es claro que la variedad genotípica del NB dificulta el tratamiento antitumoral. El requerimiento de una pluralidad de medicamentos con diferentes mecanismos de acción es vital para garantizar un mayor porcentaje en la regresión tumoral. Sin embargo, esto trae consigo una enorme gama de efectos secundarios.

En lo general, la mayoría de los medicamentos mencionados anteriormente pueden inducir la ototoxicidad, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, cardiomiopatía, mielosupresión y gastrotoxicidad (Achkar *et al.* Below y Das, 2019).

De manera particular, se ha reportado la presencia de ototoxicidad por el uso de cisplatino (Landier *et al.*, 2014). La vincristina por su parte puede inducir neuropatía por la activación de la vía PKC/ERK (Proteína cinasa C/Cinasa regulada por señales extracelulares) (Tsubaki *et al.*, 2018). Por lo que es preciso continuar la investigación que apoye a implementar un tratamiento más personalizado y desarrollar nuevos compuestos con una mayor gama de puntos de acción, a partir de elementos que se consideren más dóciles al organismo y evitar así efectos adversos a otros tejidos.

1.4 CASIOPEÍNAS®

El Cu(II) es un metal que en concentraciones traza es esencial para los sistemas vivos, pero en niveles altos ejerce un efecto tóxico. De manera similar al hierro, el Cu(II) puede intervenir como agente oxidante del peróxido de hidrógeno (H₂O₂), para formar radicales altamente reactivos de hidroxilo ([•]OH) en un proceso denominado reacciones de Fenton (Griendling *et al.*, 2016).

En la búsqueda de nuevos compuestos con menores efectos tóxicos, se desarrollaron las Casiopeínas[®] (Cas), una familia de compuestos de coordinación con un centro activo de Cu(II) (Ruiz-Azuara, 1992, 1997, 2002) que han mostrado una gran actividad antineoplásica *in vitro* e *in vivo* (Gutierrez AG *et al.*, 2013; Carvallo-Chaigneau F *et al.*, 2008). Las Cas tienen como fórmula general [Cu (N–N) (N–O) (H₂O)] NO₃ y [Cu (N–N) (O–O) (H₂O)] NO₃, donde N–N es un sustituyente de diimina aromática (1,10-fenantrolina ó 2,2'-bipiridina) y el donante de oxígeno (O–O) es acetilacetionato o salicilaldehído (Ruiz-Azuara, 1992, 1997, 2002)

La familia de las Cas comprende aproximadamente 100 compuestos sintetizados de los cuales, las investigaciones se han centrado en tres derivados principales: Casiopeína IIgly (CasIIgly), Casiopeína IIIia (CasIIIia) y Casiopeína IIIEa (CasIIIEa) (**Fig. 4**) (Ruiz-Azuara, 1992, 1997, 2002).

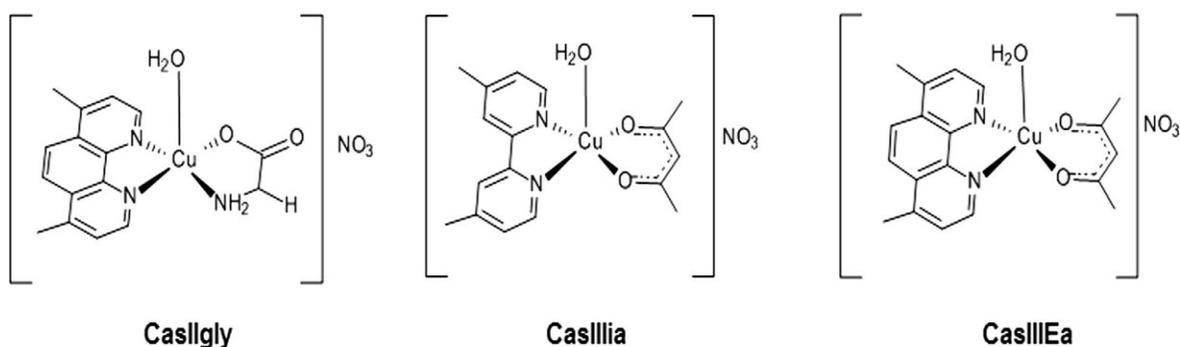


Figura 4. Estructura de las Casiopeínas[®]: CasIIgly, CasIIIia y CasIIIEa (Tomado de García Ramos *et al.*, 2017)

Se han realizado diversos estudios sobre las Cas en una variedad de modelos humanos y animales, destacando la influencia antiproliferativa en cultivos celulares de cáncer de mama (Marín-Hernández *et al.*, 2012), cáncer cervicouterino (Alemón-Medina *et al.*, 2008), cáncer de pulmón (Kachadourian *et al.*, 2010), glioma C6 de rata (Trejo-Solis *et al.*, 2005), meduloblastoma (Mejia y Ruiz-Azuara, 2008), neuroblastoma (Gutiérrez *et al.*, 2013), cultivos primarios de linfocitos humanos (García Ramos *et al.*, 2017), el tumor venéreo transmisible (TVT) y carcinoma de caninos (manuscrito en preparación, 2022), así como el xenoinjerto de células tumorales en el pez cebra (*Danio rerio*) (manuscrito en preparación, 2022)

En un modelo *in vivo* de células de glioma C6 xenotransplantadas en ratas Wistar, se observó que el tratamiento con CasIIgly redujo considerablemente el volumen tumoral, la mitosis y la proliferación celular y provocó un aumento de la apoptosis. El efecto antineoplásico de la CasIIgly se presentó sin toxicidad a los sistemas hepatobiliar o renal. El tratamiento con CasIIgly por otro lado, no indujo la mortalidad animal (Trejo-Solís *et al.*, 2005).

Por otro lado, las células no-tumorales de crecimiento acelerado 3T3-L1 (fibroblastos sanos de ratón) tratadas con CasIIgly y CasIIIEa, presentaron una baja toxicidad. Mientras que las Cas mostraron que para inducir daño en linfocitos periféricos humanos sanos, es necesario aplicar una concentración inhibitoria media (CI₅₀) de hasta 250 veces más, con respecto a las células tumorales (García-Ramos *et al.*, 2017). Resultados similares se obtuvieron en linfocitos, neutrófilos y monocitos caninos tratados con CasIIgly (manuscrito en preparación, 2022). Estos experimentos nos hablan de una selectividad tumoral de las Cas como parte de sus propiedades, además de una baja toxicidad en sistemas sanos comparados con la mayoría de los tratamientos estándar para las diferentes neoplasias

Todos los ensayos realizados en modelos tumorales muestran un patrón en el mecanismo de acción de las Cas basado en la sobreproducción de ERO, acoplamiento al ADN y alteración del metabolismo energético, promoviendo la inducción de la apoptosis mitocondrial (Kachadourian *et al.*, 2010; Becco *et al.*, 2014, Marín-Hernández *et al.*, 2012; Valencia-Cruz, 2013).

1.4.1 Mecanismo de acción de las Casiopeínas®

Los procesos de ingreso a la célula y a la mitocondria a través de sus respectivas membranas no se han dilucidado del todo; sin embargo, los resultados de cristalización de CasIIgly, CasIIIIa y CasIIIEa, se determinaron que estas moléculas poseen una estructura plana. Además, la presencia de los dos ligandos de diimina con el Cu(II) le confieren una capacidad lipofílica con base a la estructura del compuesto (la fenantrolina es más lipofílica que la bipyridina).

Estas cualidades no solo las hacen aptas para atravesar las membranas lipídicas, sino que también les confieren la capacidad de intercalarse con el ADN

nuclear y mitocondrial alterando la transcripción y replicación de los mismos. Aunque la intercalación con el ADN es una característica necesaria para inducir citotoxicidad, no es suficiente para una actividad antitumoral (**Fig. 5, puntos 1 y 3**) (García-Ramos *et al.*, 2016; Bravo-Gómez *et al.*, 2009).

Se sabe que en las células cancerígenas existe un elevado ambiente oxidativo, lo que las hace susceptibles a compuestos que propicien el aumento de las ERO. La manera por la que las células cancerígenas se adaptan para resistir el estrés oxidativo es elevando las concentraciones de antioxidantes tales como el glutatión (GSH).

Aunque no se sabe cómo entran las Cas a la mitocondria, si se ha determinado que tienen un importante papel en las alteraciones fisiológicas de este organelo. Kachadourian *et al.* en 2010 demostraron en líneas celulares de cáncer de pulmón (H157 y A549), que la CasIIgly indujo la sobreproducción de las ERO al catalizar una reacción de tipo Fenton y usar el GSH como fuente de electrones. La hipótesis sugiere que el glutatión reacciona con CasIIgly, lo que deriva en la reducción de Cu(II) a Cu(I) y la formación del radical glutatilo (GS[•]), que puede reaccionar con otro GS[•] producto de la misma reacción o la oxidación del GSH mediada por O₂, lo que genera a su vez GS[•] y superóxido (O₂^{-•}), para formar glutatión oxidado (GSSG). El GSSH es un compuesto formado por dos moléculas de glutatión unidas por un enlace de tipo disulfuro (S-S). Por otra parte, la SOD (superóxido dismutasa) cataliza al O₂^{-•} para formar H₂O₂, que a su vez reacciona con el Cu(I) para retornar a su estado oxidado de Cu(II) y producir el radical [•]OH, encargado de iniciar el daño al ADN mitocondrial. Este deterioro trae una baja en la expresión de proteínas del complejo-I de la cadena respiratoria mitocondrial provocando su desacople, lo que se asocia con la formación de O₂^{-•}. La regresión a CasIIgly oxidada, reinicia el ciclo de oxidación de GSH y por consiguiente las posteriores reacciones (**Fig. 5, puntos 2, 3 y 4**) (Kachadourian *et al.*, 2010).

Análisis bioinformáticos han demostrado que las Cas reúnen las características necesarias para intercalarse en el ADN. A pesar de presentar estructuras tridimensionales (metilos), estas no interfieren con la planaridad de la

molécula. El modelo muestra que la Cas tiende a intercalarse en el surco menor entre las bases de A-T, lo que reorienta las bases hacia el surco mayor. Esto podría provocar importantes desviaciones estructurales al ADN y afectar de esta manera, la estabilidad del genoma (**Fig. 5, punto 3**) (Galindo-Murillo *et al.*, 2015).

La sobreproducción de ERO en la mitocondria y la pérdida del GHS intracelular, se asocian con la alteración de la permeabilidad mitocondrial provocando la salida de moléculas hacia el citoplasma a través del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm), para accionar la vía intrínseca de la apoptosis.

Los diversos estudios en líneas celulares cancerígenas han demostrado que las Cas inducen la apoptosis activando los mecanismos antes mencionados. En un ensayo de mapeo completo del transcriptoma de células de cáncer cervicouterino (HeLa) y neuroblastoma (CHP-212) tratadas con CasIIgly, se observó la expresión de diferentes moléculas apoptóticas, en específico las asociadas a la apoptosis intrínseca. La sobreexpresión de los genes *BAX*, *CYTC*, *CAS9* y *CAS3*, y la subexpresión del gen *BCL2*, nos habla de los mecanismos por los que las Cas inducen la muerte celular. A su vez, se observó una concentración elevada de ERO (**Fig. 5, puntos 6, 7 y 10**). Así, la apoptosis se potencializa por la interrupción del ciclo celular debido a la expresión al alza de *BAX*, *TP53* Y *P21* (**Fig. 5, punto 9**) (Valencia-Cruz *et al.*, 2013). En los experimentos en células cardíacas realizados por Silva-Platas *et al.*, se determinó que las CasIIgly, CasIIIa y CasIIIe indujeron la pérdida del $\Delta\psi_m$ por el aumento en las ERO. En este modelo, la inhibición de la apertura del PTPm por CsA, evitó la despolarización de las células tratadas con Cas y protegió a las células de la apoptosis, lo que sugiere la participación del PTPm en el mecanismo de acción de las Cas (**Fig. 5, punto 5**) (Silva-Platas *et al.*, 2016).

Desde el punto de vista energético, las Cas pueden intervenir a diferentes niveles en la respiración celular. La glicólisis es la principal fuente de ATP en los tumores sólidos por encima de la fosforilación oxidativa (OxPhos), conocido como efecto Warburg. La proteína encargada de iniciar la glicólisis es la HK, por lo que los inhibidores selectivos de HK como el 3-BrPyr, son importantes candidatos

quimioterapéuticos (Azevedo-Silva *et al.*, 2016). Por su parte, Marín-Hernández *et al.* en 2012 determinaron la influencia de la CasIIgly sobre la glicólisis. Determinaron que la CasIIgly inhibió la actividad de la HK de 1.3 a 21 veces más que el 3BrPyr, provocando una caída en la producción de ATP (**Fig. 2, punto 8**) (Marín-Hernández *et al.*, 2012).

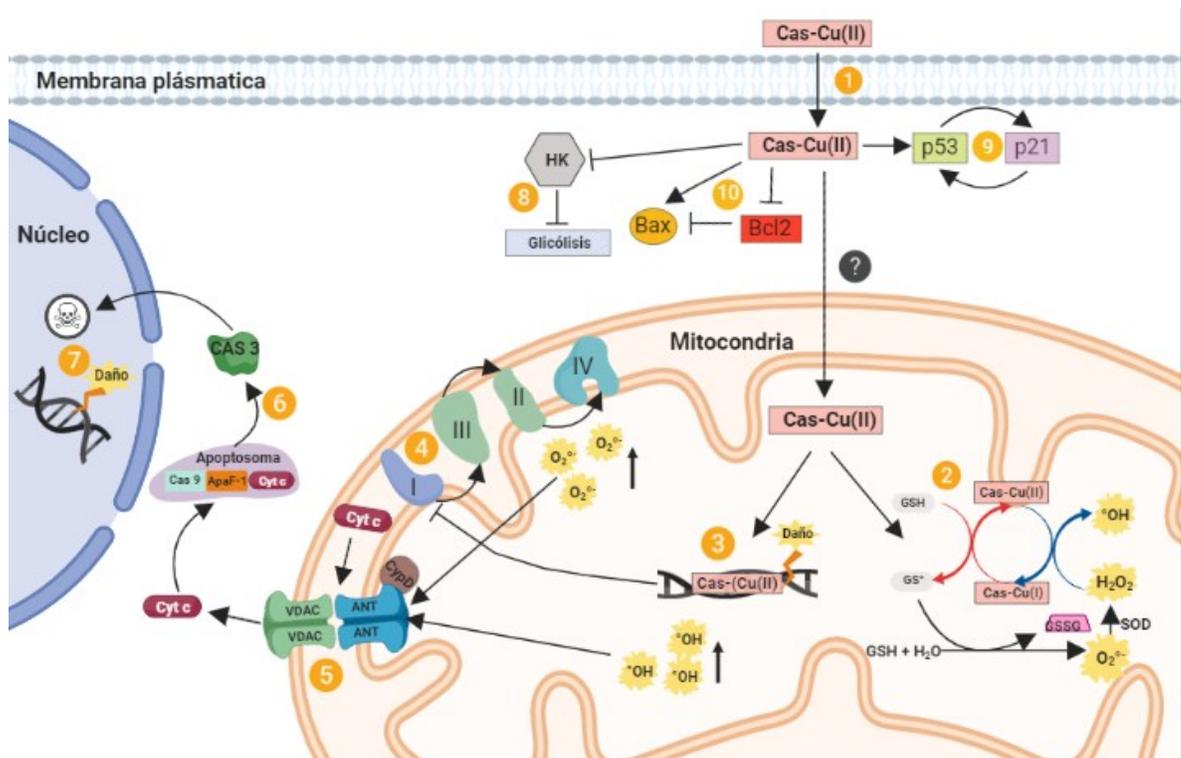


Figura 5. Teoría de conjunto sobre el mecanismo de acción de las Casiopeínas. Casiopeína-Cu²⁺ [Cas-Cu(II)], Hexocinasa (HK), canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), translocador de nucleótidos de adenina (ANT), ciclofilina D (CyD), glutatión (GS), superóxido dismutasa (SOD), especies reactivas de oxígeno (ERO) citocromo c (Cyt c), factor activador de proteasa de apoptosis 1 (Apaf-1), caspasa-9 (cas-9) y caspasa-3 (cas-3) (Valencia-Cruz *et al.*, 2013; Kachadourian *et al.*, 2010; Galindo-Murillo *et al.*, 2015; Silva-Platas *et al.*, 2016; García-Ramos *et al.*, 2017; Marín-Hernández *et al.*, 2012).

El mecanismo de acción de las Cas aún no se ha dilucidado por completo; sin embargo, es claro que su actividad está ligada a la toxicidad mitocondrial por la producción de ERO y la interrupción de la respiración mitocondrial. Lo cual trae como consecuencia la inducción de la muerte celular programada por la vía intrínseca, presumiblemente mediante la caída del $\Delta\psi_m$, lo que permite la activación del PTPm (Silva-Platas *et al.*, 2016).

1.5 ESTRUCTURA DEL PTPm

La comprensión de la muerte celular programada en el NB resulta interesante como un mecanismo para atacar al propio tumor, y una manera de estimular el fenómeno apoptótico mediante la activación del PTPm.

Este complejo mitocondrial es un sitio de contacto entre la membrana mitocondrial interna (MMI) y la membrana mitocondrial externa (MME). El PTPm está formado por varias proteínas entre las que destacan el VDAC en la MME, el ANT en la MMI, la CypD en la matriz mitocondrial y las proteínas accesorias Bcl-2 encargada de cerrar el PTPm, así como Bax que permite la apertura del mismo (Shoshan-Barmatz, *et al.*, 2017). En una célula en estado basal, la proteína antiapoptótica Bcl-2 puede suprimir la acción de sus homólogos apoptóticos. Por el contrario, en presencia de un estímulo que altere la permeabilidad de la membrana mitocondrial como la acumulación de ERO en la matriz, el factor proapoptótico Bax neutraliza a Bcl-2 lo que induce la pérdida del $\Delta\psi_m$. Dicha alteración trae como consecuencia la liberación de proteínas desde el espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citosol. Una de estas proteínas es el Cyt c, el cual es un mediador importante en la apoptosis mitocondrial. Una vez en el citoplasma, Cyt c se acopla a Apaf-1 y a caspasa-9 formando un complejo multiproteico denominado apoptosoma, el cual cuenta con acción proteolítica para activar a las caspasas ejecutoras corriente abajo tales como caspasa-3, e inducir de esta forma la apoptosis (Pistritto *et al.*, 2016; Elmore, 2007) (**Fig. 6**).

A su vez, el PTPm forma un canal no-selectivo que permite la salida de Cyt c y ERO, así como el flujo dinámico de Ca^{2+} (Izzo V, *et al.*, 2016).

Debido a la localización entre los límites del citoplasma y la MME, VDAC es un componente de unión común a otras proteínas que regulan diversas funciones mitocondriales y celulares. Una de las funciones más importantes de VDAC es el transporte regulado de Ca^{2+} ya que posee un dominio de unión a éste, por lo que su inactividad conlleva al resguardo del Ca^{2+} en la mitocondria (Ponnalagu y Singh, 2017).

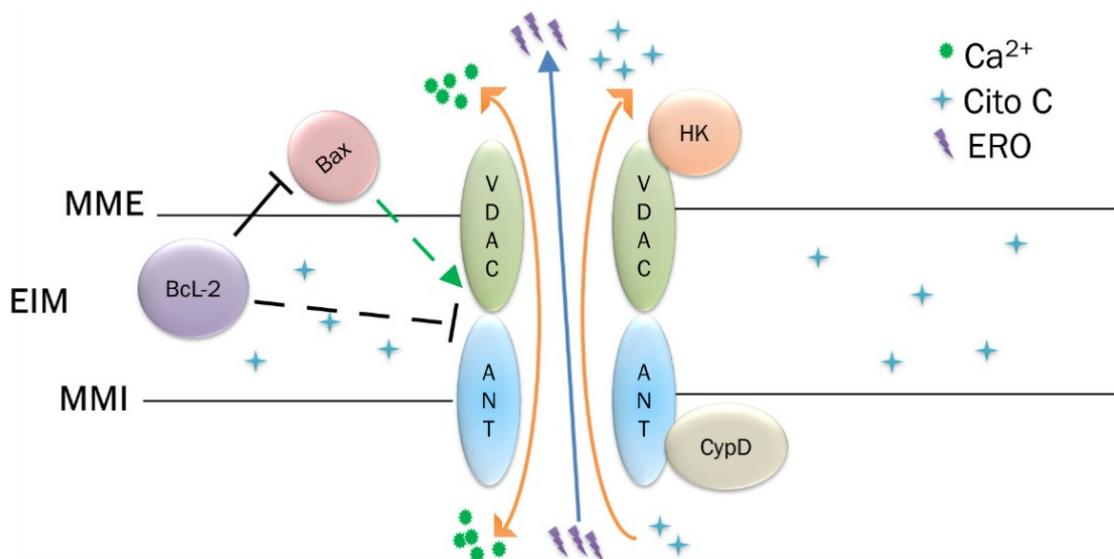


Figura 6. Estructura clásica del PTPm. Se muestran las estructuras principales del PTPm y su ubicación entre las membranas mitocondriales (Modificado de Shoshan-Barmatz et al., 2017)

Por otra parte, la HKII tiene la capacidad de responder a la acción proapoptótica de proteínas de la familia Bcl-2 y presentar una alta afinidad de unión a VDAC. La HKII es abundante en tejido del músculo cardiaco y en células tumorales como el NB. Cataliza la primera etapa de la ruta glucolítica, donde la glucosa es fosforilada a glucosa-6-fosfato por medio de la transición de un grupo fosfato de ATP. Actualmente existe evidencia sobre el papel dual que puede tener la HKII al actuar como un importante regulador apoptótico, dependiendo a qué miembros de la familia Bcl-2 esté relacionado (Wu et al., 2017).

A su vez, la CypD se ha documentado como un componente aún más relevante en la función del PTPm. La CypD es una peptidilpropil *cis-trans* isomerasa, cuyo rol principal es la apertura del PTPm y se encuentra acoplado a VDAC y ANT en la membrana mitocondrial interna. La CypD se considera como un regulador maestro en la apoptosis mediante el flujo de Ca^{2+} y las ERO (Porter y Beutner, 2018). Así, cada una de las proteínas mencionadas puede regular los mecanismos de apoptosis mitocondrial.

1.6. JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios epidemiológicos de países con altos recursos revelaron que la incidencia del NB a nivel mundial es de aproximadamente 10.5% por cada millón niños menores de 15 años. Lo anterior quiere decir que al menos en Estados Unidos, Canadá y en Europa se reportan entre 500 y 700 casos nuevos cada año de NB (Ward *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2018; Tas *et al.*, 2020). Mientras que para los pacientes de riesgo bajo e intermedio la tasa de supervivencia es muy cercana al 100%, para los pacientes considerados de alto riesgo la tasa de supervivencia no supera el 50% (Gatta *et al.*, 2014). Por lo que, a pesar del bajo porcentaje de incidencia, el NB es responsable del 15% de las muertes por cáncer pediátricos al nivel mundial (Zafar *et al.*, 2021).

Como podemos observar, los porcentajes de éxito para los pacientes con NB de alto riesgo son muy bajos, probablemente debido a que responden pobremente a los tratamientos estándares actuales. Se vuelve por tanto una prioridad la investigación de nuevos fármacos que favorezcan la terapia con el NB de alto riesgo, como lo son las Casiopeínas (Ruiz-Azuara, 1992, 1997, 2002), compuestos coordinados de cobre(II) cuyo mecanismo de acción es la inducción del estrés oxidativo y la apoptosis mitocondrial (Kachadourian *et al.*, 2010; García-Ramos *et al.*, 2017). La mitocondria es el principal blanco de la mayoría de los agentes quimioterapéuticos, donde el PTPm juega un papel muy importante en la inducción de apoptosis (Shoshan-Barmatz, *et al.*, 2017). Por lo que resulta de gran interés averiguar qué proteínas del PTPm intervienen en el mecanismo de las Casiopeínas. En este sentido, dilucidar los elementos esenciales para la permeabilización mitocondrial a través de la apertura del PTPm, permitirá averiguar que proteínas pueden ser útiles en el tratamiento contra el NB.

1.7. HIPÓTESIS

Las proteínas que intervienen en la función del PTPm regularán el mecanismo apoptótico de la Casiopeína-IIIa en células de NB.

1.8. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la Casiopeína-IIIa sobre los componentes del PTPm en células de NB.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achkar, I. W., Abdulrahman, N., Al-Sulaiti, H., Joseph, J. M., Uddin, S., & Mraiche, F. (2018). Cisplatin based therapy: the role of the mitogen activated protein kinase signaling pathway. *Journal of translational medicine*, 16(1), 96.
- Alemón-Medina, R., Muñoz-Sánchez, J. L., Ruiz-Azuara, L., & Gracia-Mora, I. (2008). Casiopeína II gly induced cytotoxicity to HeLa cells depletes the levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 22(3), 710–715.
- Azevedo-Silva, J., Queirós, O., Baltazar, F., Ułaszewski, S., Goffeau, A., Ko, Y. H., Pedersen, P. L., Preto, A., & Casal, M. (2016). The anticancer agent 3-bromopyruvate: a simple but powerful molecule taken from the lab to the bedside. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 48(4), 349–362.
- Becco, L., García-Ramos, J. C., Azuara, L. R., Gambino, D., & Garat, B. (2014). Analysis of the DNA interaction of copper compounds belonging to the Casiopeínas® antitumoral series. *Biological trace element research*, 161(2), 210–215.
- Below J, M Das J. (2019) Vincristine. Jan 1. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan-. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537122/>
- Bravo-Gómez, M. E., García-Ramos, J. C., Gracia-Mora, I., & Ruiz-Azuara, L. (2009). Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonato)]NO₃ and [Cu(N-N)(glycinato)]NO₃ complexes, (Casiopeínas). *Journal of inorganic biochemistry*, 103(2), 299–309.
- Brodeur, G. M., & Bagatell, R. (2014). Mechanisms of neuroblastoma regression. *Nature reviews. Clinical oncology*, 11(12), 704–713.
- Campbell, K., Shyr, D., Bagatell, R., Fischer, M., Nakagawara, A., Nieto, A. C., Brodeur, G. M., Matthay, K. K., London, W. B., & DuBois, S. G. (2019). Comprehensive evaluation of context dependence of the prognostic impact of MYCN amplification in neuroblastoma: A report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) project. *Pediatric blood & cancer*, 66(8), e27819.
- Carvalho-Chaigneau F, Trejo-Solís C, Gómez-Ruiz C, Rodríguez-Aguilera E, Macías-Rosales L, Cortés-Barberena E, Cedillo-Peláez C, Gracia-Mora I, Ruiz-Azuara L, Madrid-Marina V, Constantino-Casas F. (2008) Casiopeína III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *Biometals*. 21(1):17-28.
- Cohn, S. L., Pearson, A. D., London, W. B., Monclair, T., Ambros, P. F., Brodeur, G. M., Faldum, A., Hero, B., Iehara, T., Machin, D., Mosseri, V., Simon, T.,

- Garaventa, A., Castel, V., Matthay, K. K., & INRG Task Force (2009). The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(2), 289–297.
- D'amelio, M., Cavallucci, V., & Cecconi, F. (2010). Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell death and differentiation*, 17(7), 1104.
- Davidoff AM. (2012). Neuroblastoma. *Semin Pediatr Surg*. 21(1):2-14.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- Evans, A. E., D'Angio, G. J., Propert, K., Anderson, J., & Hann, H. W. (1987). Prognostic factor in neuroblastoma. *Cancer*, 59(11), 1853–1859.
- Galindo-Murillo, R., García-Ramos, J. C., Ruiz-Azuara, L., Cheatham, T. E., 3rd, & Cortés-Guzmán, F. (2015). Intercalation processes of copper complexes in DNA. *Nucleic acids research*, 43(11), 5364–5376.
- Ganeshan, V. R., & Schor, N. F. (2011). Pharmacologic management of high-risk neuroblastoma in children. *Paediatric drugs*, 13(4), 245–255.
- García Ramos, J. C., Gutiérrez, A. G., Vázquez Aguirre, A., Toledano Magaña, Y., Alonso Sáenz, A. L., Gómez Vidales, V., Ruiz Azuara, L. (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), 43–58.
- Gatta, G., Botta, L., Rossi, S., Aareleid, T., Bielska-Lasota, M., Clavel, J., Dimitrova, N., Jakab, Z., Kaatsch, P., Lacour, B., Mallone, S., Marcos-Gragera, R., Minicozzi, P., Sánchez-Pérez, M. J., Sant, M., Santaquilani, M., Stiller, C., Tavilla, A., Trama, A., Visser, O., ... EUROCARE Working Group (2014). Childhood cancer survival in Europe 1999-2007: results of EUROCARE-5--a population-based study. *The Lancet. Oncology*, 15(1), 35–47.
- Griendling, K. K., Touyz, R. M., Zweier, J. L., Dikalov, S., Chilian, W., Chen, Y. R. & Bhatnagar, A. (2016). Measurement of reactive oxygen species, reactive nitrogen species, and redox-dependent signaling in the cardiovascular system: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation research*, 119(5), e39-e75.
- Gutiérrez AG, Vázquez-Aguirre A, García-Ramos JC, Flores-Alamo M, Hernández-Lemus E, Ruiz-Azuara L, Mejía C. (2013). Copper(II) mixed chelate compounds induce apoptosis through reactive oxygen species in neuroblastoma cell line CHP-212. *J Inorg Biochem*. 126:17-25.
- Huang, M., y Weiss, WA. (2013). Neuroblastoma y MYCN. *Perspectivas de Cold Spring Harbor en medicina*. 3 (10).

- Izzo V, Bravo-San Pedro JM, Sica V, Kroemer G, Galluzzi L. (2016). Mitochondrial Permeability Transition: New Findings and Persisting Uncertainties. *Trends Cell Biol*, 26(9): 655-667.
- Kachadourian, R., Brechbuhl, H. M., Ruiz-Azuara, L., Gracia-Mora, I., & Day, B. J. (2010). Casiopeína II-gly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. *Toxicology*, 268(3), 176–183.
- Karp, G., & Araiza Martínez, M. E. (2011). *Biología celular y molecular: Conceptos y experimentos / Gerald Karp* (6a ed.). México D.F.: McGraw- Hill.
- Kushner, B. H. (2004). Neuroblastoma: a disease requiring a multitude of imaging studies. *Journal of Nuclear Medicine*, 45(7), 1172-1188.
- Landier, W., Knight, K., Wong, F. L., Lee, J., Thomas, O., Kim, H., Kreissman, S. G., Schmidt, M. L., Chen, L., London, W. B., Gurney, J. G., & Bhatia, S. (2014). Ototoxicity in children with high-risk neuroblastoma: prevalence, risk factors, and concordance of grading scales-a report from the Children's Oncology Group. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(6), 527–534.
- Louis CU, Shohet JM. (2015). Neuroblastoma: molecular pathogenesis and therapy. *Annu Rev Med*. 66:49-63.
- Luo, Y. B., Cui, X. C., Yang, L., Zhang, D., & Wang, J. X. (2018). Advances in the Surgical Treatment of Neuroblastoma. *Chinese medical journal*, 131(19), 2332–2337.
- Marín Hernández, A., Gallardo Pérez, J. C., López Ramírez, S. Y., García García, J. D., Rodríguez Zavala, J. S., Ruiz Ramírez, L., Rodríguez Enríquez, S. (2012). Casiopeína II-gly and bromo-pyruvate inhibition of tumor hexokinase, glycolysis, and oxidative phosphorylation. *Archives of Toxicology*. 86(5): 753–766.
- Mejia, C., & Ruiz-Azuara, L. (2008). Casiopeínas II-gly and IIIa induce apoptosis in medulloblastoma cells. *Pathology and oncology research: POR*, 14(4), 467–472.
- Moldoveanu, T., Follis, A. V., Kriwacki, R. W., & Green, D. R. (2014). Many players in BCL-2 family affairs. *Trends in biochemical sciences*, 39(3), 101-111.
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, 8(4), 603.
- Ponnalagu D, Singh H. (2017). Anion Channels of Mitochondria. *Handb Exp Pharmacol*. 240:71-101.

- Porter GA Jr, Beutner G. 2018. Cyclophilin D, Somehow somehow a Master Regulator of Mitochondrial Function. *Biomolecules*. 14;8(4).
- Ruiz-Azuara L (1996) Process to obtain new mixed copper amino acidate from methylate phenanthroline complexes to be used as anticancerigenic agents. USA, Patent No. 5,576,326 (07/628,628). 1992.
- Ruiz-Azuara L (1997) Process to obtain new mixed copper amino acidate complexes from phenylate phenanthroline to be used as anticancerigenic agents. Patent No. 07/628843, US5107005 A, 1992, RE 35458, US RE35, 458E.
- Shoshan-Barmatz V, Krelin Y, Shteinifer-Kuzmine A and Arif T. (2017). Voltage-Dependent Anion Channel 1 As an Emerging Drug Target for Novel Anti-Cancer Therapeutics. *Front. Oncol.* 7:154.
- Silva-Platas, C., Guerrero-Beltrán, C. E., Carrancá, M., Castillo, E. C., Bernal-Ramírez, J., Oropeza-Almazán, Y. & Ruiz-Azuara, L. (2016). Antineoplastic copper coordinated complexes (Casiopeinas) uncouple oxidative phosphorylation and induce mitochondrial permeability transition in cardiac mitochondria and cardiomyocytes. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 48(1), 43-54.
- Smith, V., & Foster, J. (2018). High-Risk Neuroblastoma Treatment Review. *Children (Basel, Switzerland)*, 5(9), 114.
- Tas, M. L., Reedijk, A., Karim-Kos, H. E., Kremer, L., van de Ven, C. P., Dierselhuis, M. P., van Eijkelenburg, N., van Grotel, M., Kraal, K., Peek, A., Coebergh, J., Janssens, G., de Keizer, B., de Krijger, R. R., Pieters, R., Tytgat, G., & van Noesel, M. M. (2020). Neuroblastoma between 1990 and 2014 in the Netherlands: Increased incidence and improved survival of high-risk neuroblastoma. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 124, 47–5.
- Trejo-Solís, C., Palencia, G., Zúñiga, S., Rodríguez-Ropon, A., Osorio-Rico, L., Luvia, S. T., Gracia-Mora, I., Marquez-Rosado, L., Sánchez, A., Moreno-García, M. E., Cruz, A., Bravo-Gómez, M. E., Ruiz-Ramírez, L., Rodríguez-Enriquez, S., & Sotelo, J. (2005). Cas IIgly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 7(6), 563–574.
- Tsubaki, M., Takeda, T., Matsumoto, M., Kato, N., Yasuhara, S., Koumoto, Y. I., Imano, M., Satou, T., & Nishida, S. (2018). Tamoxifen suppresses paclitaxel-, vincristine-, and bortezomib-induced neuropathy via inhibition of the protein kinase C/extracellular signal-regulated kinase pathway. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 40(10), 1010428318808670

- Valencia-Cruz, A. I., Uribe-Figueroa, L. I., Galindo-Murillo, R., Baca-López, K., Gutiérrez, A. G., Vázquez-Aguirre, A., Ruiz-Azuara, L., Hernández-Lemus, E., & Mejía, C. (2013). Whole genome gene expression analysis reveals casiopeína-induced apoptosis pathways. *PloS one*, 8(1), e54664.
- Van Arendonk, K. J., & Chung, D. H. (2019). Neuroblastoma: Tumor Biology and Its Implications for Staging and Treatment. *Children (Basel, Switzerland)*, 6(1), 12.
- Ward, E., DeSantis, C., Robbins, A., Kohler, B., & Jemal, A. (2014). Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*, 64(2), 83–103.
- Wu J, Hu L, Wu F, Zou L, He T. (2017). Poor prognosis of hexokinase 2 overexpression in solid tumors of digestive system: a meta-analysis. *Oncotarget*. 8 (19): 32332-32344
- Xie, L., Onysko, J., & Morrison, H. (2018). Childhood cancer incidence in Canada: demographic and geographic variation of temporal trends (1992-2010). Incidence du cancer chez les enfants au Canada: variations démographiques et géographiques des tendances (1992-2010). *Health promotion and chronic disease prevention in Canada: research, policy and practice*, 38(3), 79–115.
- Zafar, A., Wang, W., Liu, G., Wang, X., Xian, W., McKeon, F., Foster, J., Zhou, J., & Zhang, R. (2021). Molecular targeting therapies for neuroblastoma: Progress and challenges. *Medicinal research reviews*, 41(2), 961–1021.

2. CAPITULO 1: *BAX*, PERO NO *BCL2* ES NECESARIO PARA LA APOPTOSIS EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA TRATADAS CON CasIIIa.

ANTICANCER RESEARCH 42: 885-892 (2022)

doi:10.21873/anticanres.15546

2.1 INTRODUCCIÓN

El NB es un tumor sólido extracraneal con mayor prevalencia en niños de 0 a 5 años (10-15%) (Valter, Zhivotovsky y Gogvadza, 2018) y representa el 50% de todos los tumores malignos diagnosticados en lactantes. Este tumor sufre regresión espontánea en el 47% de los casos, presumiblemente por apoptosis mitocondrial, por lo que es imperativo potenciar esta vía. El tratamiento más común para el NB es la terapia intensiva multimodal, que resulta en una tasa de supervivencia inferior al 50%, especialmente en casos de alto riesgo y en casos con amplificación de *N-MYC* (Kimura *et al.*, 2021).

En la búsqueda de nuevos compuestos antitumorales surgieron las Cas, que pertenecen a una familia de compuestos con un centro activo de cobre(II) (Ruiz-Azuara, 1992, 1997, 2002) que han mostrado actividad citotóxica y citostática *in vivo* (Trejo-Solís *et al.*, 2005) e *in vitro* (García-Ramos *et al.*, 2017; Castillo-Rodríguez, 2021). El mecanismo de acción de Cas incluye múltiples procesos como el desacoplamiento de la cadena respiratoria por la interacción con succinato, piruvato y 2-oxoglutarato deshidrogenasa y la interferencia con la replicación del ADN a través de la formación de aductos con bases nitrogenadas (Marín-Hernández *et al.*, 2012).

También provocan un aumento de las ERO como H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$, una disminución de los niveles de glutatión y disfunción mitocondrial (Kachadourian *et al.*, 2010) acompañada de una liberación de citocromo-c y Bcl-2, así como la activación de Bax, que conduce a la apoptosis mitocondrial (García-Ramos *et al.*, 2017). La apoptosis intrínseca, requiere de la formación del PTPm para condicionar el paso de moléculas a través de la membrana mitocondrial (Jonas *et al.*, 2015). Sin embargo, no está claro si Bcl-2 y Bax deben actuar juntas para inducir la activación del PTPm. Las células de NB tratadas con Casiopeína IIIa (CasIIIa) representan

un modelo adecuado para estudiar este proceso. Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo examinar el papel de *BCL2* y *BAX* en la inducción de la apoptosis mitocondrial en células NB luego de su silenciamiento y tratamiento con CasIIIa.

2.2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.1 Cultivo celular

Células SK-N-SH de NB humano (ATCC®, HTB-11™) y células de fibroblastos de ratón 3T3-L1 (ATCC®, CL-173™) fueron cultivadas en placas de 6 pozos con medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO USA) suplementado con el 10% de suero fetal bovino (SFB) y 100 U/ml de estreptomicina y penicilina. Las células se mantuvieron en una incubadora de CO₂ al 5%, a 37°C hasta alcanzar una confluencia de ≥80%.

2.2.2 Silenciamiento de *BAX* y *BCL2* mediante CRISPR/Cas9

Primero, mediante un ensayo bioinformático determinamos las secuencias gRNA para los genes de *BAX* y *BCL2* usando el software CHOP-CHOP, se obtuvieron los siguientes oligonucleótidos: ***BAX*** 5' ACTCGGAAAAGACCTCTCG 3' y ***BCL2*** 5' GGAGAACAGGGTACGATAAC 3' (CHOPCHOP: <https://chopchop.cbu.uib.no/> consultado el 10 de septiembre de 2021). Ambas secuencias fueron insertadas con el vector de silenciamiento génico comercial (ORIGENE, Rockville, MD, USA). Veinticuatro horas previas al silenciamiento, se cambió el medio de cultivo a todas las células. En un microtubo de 2 ml, se agregó 1 µg del vector *Knockout* gRNA (KN404498; ORIGENE) en 250 µl de medio Opti-MEM (22600134, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) y se mezclaron suavemente. Posteriormente, se agregó 1 µg de DNA donador (gen de resistencia a ampicilina) y se mezcló gentilmente. En seguida, se agregaron 6 µl de lipofectamina (11668-019, ThermoFisher Scientific), y se dejó incubar la mezcla durante 15 min a temperatura ambiente. Después, se agregaron 42 µl de la mezcla a cada pozo. La placa se sometió a agitación y se incubó durante 48 h en condiciones de cultivo estándar. Las células se transfirieron 1:10, se cultivaron durante 72 h y luego se transfirieron nuevamente 1:10. Las células se transfirieron 7

veces en total. Dado que el vector donante contiene el gen de la ampicilina, proporcionará resistencia a la ampicilina. La razón para cultivar células durante aproximadamente 3 semanas antes de la selección con ampicilina (SK-N-SH $\leq 324,33 \mu\text{g/ml}$ y 3T3-L1 $\leq 260,03 \mu\text{g/ml}$) de células transfectadas es diluir las células que contienen el donante en forma episomal.

2.2.3 Tratamientos

Células transfectadas y no transfectadas se trataron con cisplatino, como control positivo, o CasIIIa. Para las células SK-N-SH, se añadió la respectiva concentración letal 50 (CL₅₀) de cisplatino (69.7 μM) y CasIIIa (123.3 μM) (García Ramos *et al.*, 2017). Respecto a las células 3T3-L1 no transfectadas, los valores de CL₅₀ se determinaron utilizando una curva de dosis-respuesta y la viabilidad celular se examinó mediante el ensayo con azul de tripano.

2.2.4 Evaluación de ERO

Las concentraciones de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se detectaron con el sustrato no-coloreado AmplexRed™ Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Molecular Probes, Inc. 29851 Willow Creek Road Eugene, OR 97402, EE. UU.). Las células se lavaron con tampón de fosfatos (PBS) 1X y se incubaron con la mezcla de reacción (50 μM AmplexRed™) más 0.1 U/ml de HRP, durante 30 min en ausencia de luz.

Los niveles de superóxido (O²⁻) se determinaron por medio del colorante fluorogénico de hidroetidina, MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator, for live-cell imaging (Molecular Probes, Inc. 29851 Willow Creek Road, Eugene, OR 97402, EE. UU.). Las células de NB se incubaron con 250 μL del compuesto por 10 min, en ausencia de luz a 37°C. En ambos casos, las ERO se cuantificaron mediante la detección de fluorescencia de excitación y emisión máxima a 571/585 nm (AmplexRed™) y a 510/580 nm (MitoSox™) en un detector de fluorescencia de microplacas Varioskan Flash (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.).

2.2.5 Retención de Calcio

La determinación de Ca^{2+} se realizó por medio del reactivo éster acetoximatpílico de Fura-2, AM, FluoroPure™ grade–Special Packaging (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.). Primero aislamos mitocondrias de 5×10^3 células mediante centrifugación diferencial. Las células se lavaron dos veces con 1 ml de PBS frío y se resuspendieron en un buffer de aislamiento de mitocondrias que contenía sacarosa 250 mM, HEPES 20 mM, DTT 1 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, MgCl_2 1,5 mM y PMSF 1 mM. Después, se centrifugaron a 1,000 g durante 5 min a 4°C para eliminar los núcleos. El sobrenadante que contenía las mitocondrias se centrifugó a 15,000 g durante 10 min a 4 °C y el sedimento se resuspendió en PBS. Posteriormente, se agregaron 100 μl de la solución mitocondrial a cada pocillo de una placa de 96 pozos, seguido de la adición de 100 μl del reactivo Fura-2. Las placas se incubaron durante 80 min a temperatura ambiente y la fluorescencia se cuantificó en un lector de microplacas Varioskan Flash (ThermoFisher Scientific) a una longitud de onda de Ex/Em de 340/380 nm.

2.2.6 Determinación de apoptosis por presencia de caspasa-3

Las proteínas se fraccionaron y evaluaron a través del ensayo de Western blot. La ruptura celular y la extracción proteica se realizó mediante el buffer de lisis RIPA, y por lisis mecánica utilizando un sonicador húmedo durante 10 min. Posteriormente, se configuraron a 13,000 rpm por 10 min. Se cargó en cada pozo una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína en condiciones desnaturalizantes, y se separó en un gel de SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0.2 μm). Posteriormente, las membranas se incubaron durante la noche a 4°C con los anticuerpos primarios para caspasa-3 y β -tubulina (sc-7272 y sc-166729, respectivamente, Santa cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Después se realizó la hibridación del anticuerpo secundario cabra anti-ratón conjugado con la HRP (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology). Finalmente. la visualización de las bandas inmunoreactivas se realizó mediante el reactivo de Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology Luminal, Cat. sc-2048).

2.2.7 Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Los datos se expresan como la media y desviación estándar (\pm) con una significancia estadística de $p < 0.05$. Las diferencias significativas entre los grupos se evaluaron mediante ANOVA. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico GraphPad Prism v8.0.0 para Windows (GraphPad Software, La Jolla CA, USA).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Ensayo de viabilidad celular de las células 3T3-L1 para CasIIIa y cisplatino

Previamente nuestro grupo de investigación ya había determinado la CL_{50} de CasIIIa y cisplatino ($123.3 \mu\text{M}$ y $69.7 \mu\text{M}$, respectivamente) para la línea celular SK-N-SH, así como los tiempos de trabajo (4 h) (García Ramos *et al.*, 2017). Por lo que nos dimos a tarea de determinar la CL_{50} de ambos compuestos para la línea celular 3T3-L1 a través de una curva dosis-respuesta mediante azul de tripano.

La CL_{50} de cada uno de los tratamientos para esta línea celular fue de $11.18 \pm 5.10 \mu\text{M}$ para cisplatino y de $149.7 \pm 4.2 \mu\text{M}$ para CasIIIa (**Tabla 2**). De acuerdo con lo reportado anteriormente (García Ramos *et al.*, 2017), podemos observar cómo el valor de CL_{50} para CasIIIa en fibroblastos fue dos veces mayor que el valor de la CL_{50} para las células de NB. Esto nos habla de una selectividad tumoral por parte de la CasIIIa.

Tabla 2. CL_{50} en líneas celulares de NB y fibroblastos

Línea celular	Cisplatino (μM)	CasIIIa (μM)
SK-N-SH	123.3	69.7
3T3-L1	11.18 ± 5.10	149.7 ± 4.2

La citotoxicidad se expresa como $CL_{50} \pm SD$ (μM) para cisplatino y CasIIIa en las líneas celulares SK-N-SH y 3T3-L1.

2.3.2 Viabilidad celular de células *BCL2*^{KO} y *BAX*^{KO}

El análisis bioinformático indicó que las secuencias utilizadas son las adecuadas para lograr el silenciamiento, ya que ambas cumplieron con los criterios de diseño (Mohr *et al.*, 2016); tenían una longitud de entre 17 y 24 nucleótidos, un contenido de GC del 40 al 80% y no eran complementarias. Para optimizar el proceso de transfección se utilizaron vectores ORIGEN *Knockout (KO)*; estos vectores contenían las secuencias de gARN mencionadas e incluían un gen de resistencia a la ampicilina que se utilizó para la selección de las células transfectadas. Determinamos que las dosis de ampicilina para eliminar el 100% de las células en nuestros cultivos fueron extremadamente altas.

Ambas líneas celulares se transfectaron como se especificó anteriormente obteniendo rendimientos superiores al 60%. Las células silenciadas mostraron resistencia a la ampicilina (**Fig. 5**) y mantuvieron tal característica hasta 10 pases después de la transfección. Estos resultados mostraron que el silenciamiento no comprometía la viabilidad de las líneas celulares utilizadas, y que ésta se mantuvo con el tiempo.

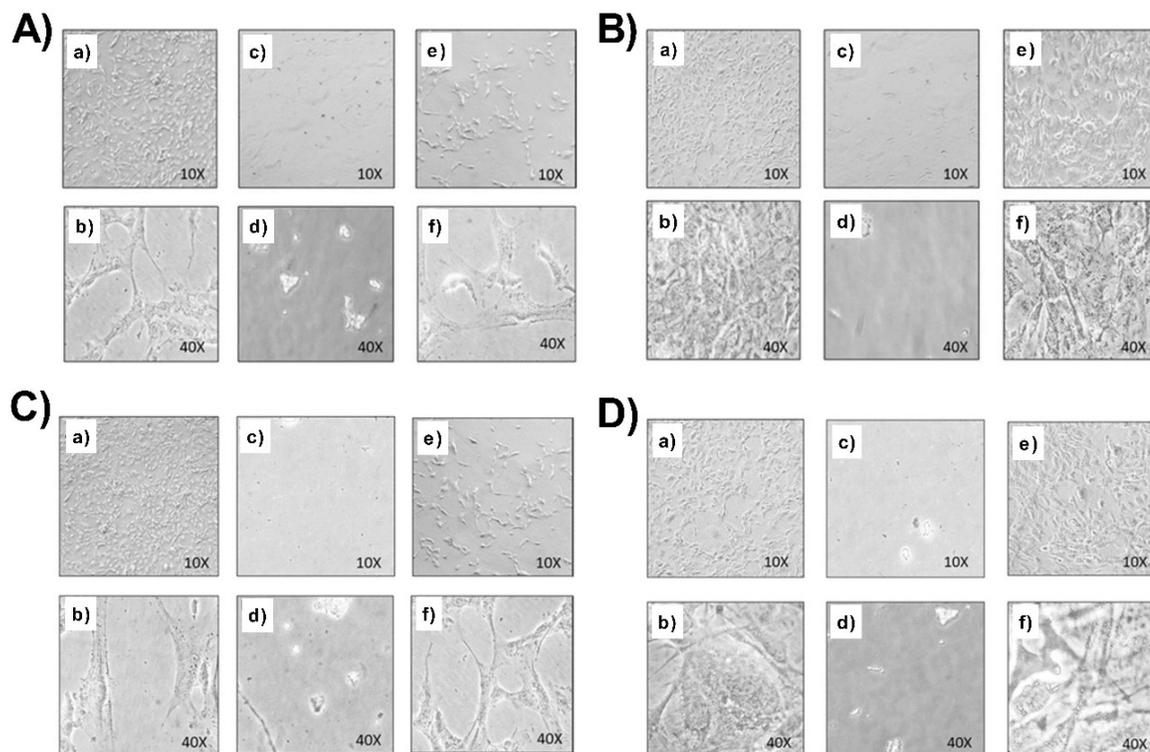


Figura 5. Evaluación del silenciamiento génico de *BAX* y *BCL2* en células NB y 3T3-L1. (A) SK-N-SH *BAX*^{KO}. Evaluación de *BAX* silenciado en células SK-N-SH. (a-b) células no silenciadas; (c-d) células no silenciadas en medio selectivo; (e-f) células transfectadas en medio selectivo con un rendimiento del 73±4%. **(B)** 3T3-L1 *BAX*^{KO}. Evaluación de *BAX* silenciado en células 3T3-L1. (a-b) células no silenciadas; (c-d) células no silenciadas en medio selectivo; (e-f) células transfectadas en medio selectivo con un rendimiento del 78±5,3%. **(C)** SK-N-SH *BCL2*^{KO}. Evaluación del silenciamiento de *BCL2* en células SK-N-SH. (a-b) células no silenciadas; (c-d) células no silenciadas en medio selectivo; (e-f) células transfectadas en medio selectivo con un rendimiento del 66±3,6%. **(D)** 3T3-L1 *BCL2*^{KO}. Evaluación de *BCL2* silenciado en células 3T3-L1. (a-b) células no silenciadas; (c-d) células no silenciadas en medio selectivo; (e-f) células transfectadas en medio selectivo con un rendimiento del 78±5,3%.

2.3.3 Niveles de O^{2•-} y H₂O₂ en células *BAX*^{KO} y *BCL2*^{KO}

Como podemos observar en la **figura 6A**, para las células de NB no silenciadas, las células *BAX*^{KO} y las células *BCL2*^{KO} sin tratamiento, la producción de O^{2•-} se mantuvo alrededor de 10 unidades relativas de fluorescencia (RFU por sus siglas en inglés). Sin embargo, en las células no silenciadas (barras blancas) los tratamientos con cisplatino y CasIIIa lo niveles de O^{2•-} se duplicaron (~20 RFU, *****p*<0.01). Para las células *BAX*^{KO} (barras grises), los niveles de O^{2•-} se mantuvieron en niveles basales (10 RFU) aún con ambos tratamientos. Por su parte, en las células *BCL2*^{KO} (barras azules) el tratamiento con cisplatino triplicó la

producción de este radical (~30 RFU, **** $p < 0.01$) mientras que las células tratadas con Casiopeína incrementó hasta 5 veces más sus niveles (~50 RFU, **** $p < 0.01$).

En las células 3T3-L1 no tratadas, silenciadas y no silenciadas, la producción de superóxido fue alrededor de 10 RFU. En el caso de las células no silenciadas que fueron tratadas con cisplatino, los niveles de $O_2^{\bullet-}$ se triplicaron (**** $p < 0.01$). En las células BAX^{KO} con ambos tratamientos el aumento de la producción de $O_2^{\bullet-}$ no fue estadísticamente significativo. En el caso de las células $BCL2^{KO}$ los niveles de superóxido se triplicaron (**** $p < 0.01$) (Fig. 6B).

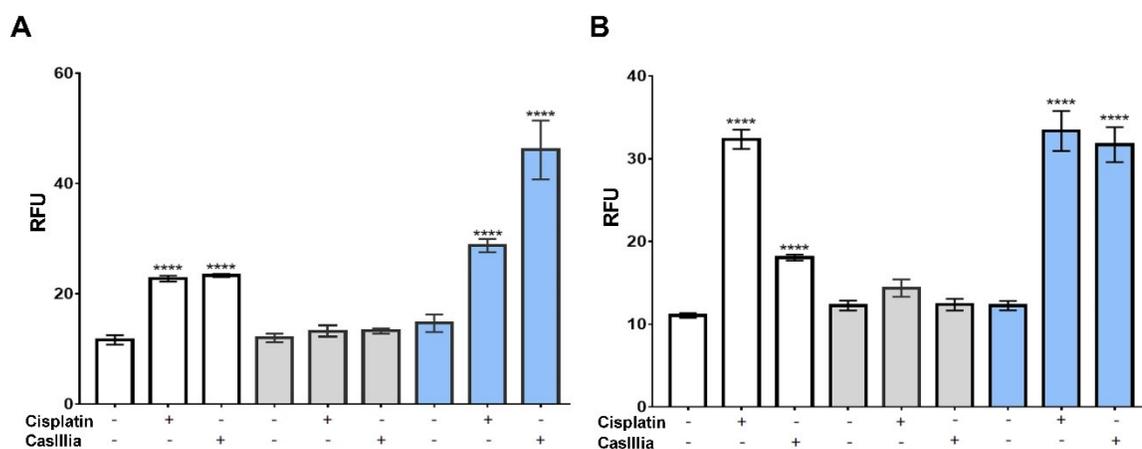


Figura 6. Producción de $O_2^{\bullet-}$ con el tratamiento con Casililia en células SK-N-SH y 3T3-L1. (A) NB y (B) células 3T3-L1. Las barras blancas representan celdas no silenciadas, las barras grises corresponden a celdas BAX^{KO} y las barras azules representan celdas $BCL2^{KO}$. Los niveles de significancia corresponden a **** $p < 0.01$. RFU: *Relative fluorescence units*.

Para las células SK-N-SH sin silenciamiento y sin tratamientos, los niveles de H_2O_2 fueron de 10 RFU, excepto para las células $BCL2^{KO}$ no tratadas, donde se observó un ligero aumento en los niveles de H_2O_2 (~15 RFU). El cisplatino, en células no silenciadas y células $BCL2^{KO}$, propició un aumento de los niveles de H_2O_2 aproximadamente de 50 RFU (**** $p < 0.01$), mientras que la Casililia incrementó los niveles de este compuesto a 30 RFU (** $p < 0.05$) (Fig. 7A).

En el caso de las células 3T3-L1 no tratadas, con y sin silenciamiento de BAX o $BCL2$, el H_2O_2 permaneció en niveles basales (10 RFU). Cuando las células no silenciadas y $BCL2^{KO}$ se trataron con cisplatino, los niveles de H_2O_2 aumentaron 5 veces comparado con las células no tratadas (~50 RFU, **** $p < 0.01$), y con Casililia

casi se triplicaron (~30 RFU, **** $p < 0.01$). Las células BAX^{KO} tratadas con cisplatino mostraron niveles superiores de H_2O_2 (~15 RFU, * $p < 0.05$), por su parte, las tratadas con CasIIIa no mostraron un cambio en sus niveles (10 RFU) (**Fig. 7B**).

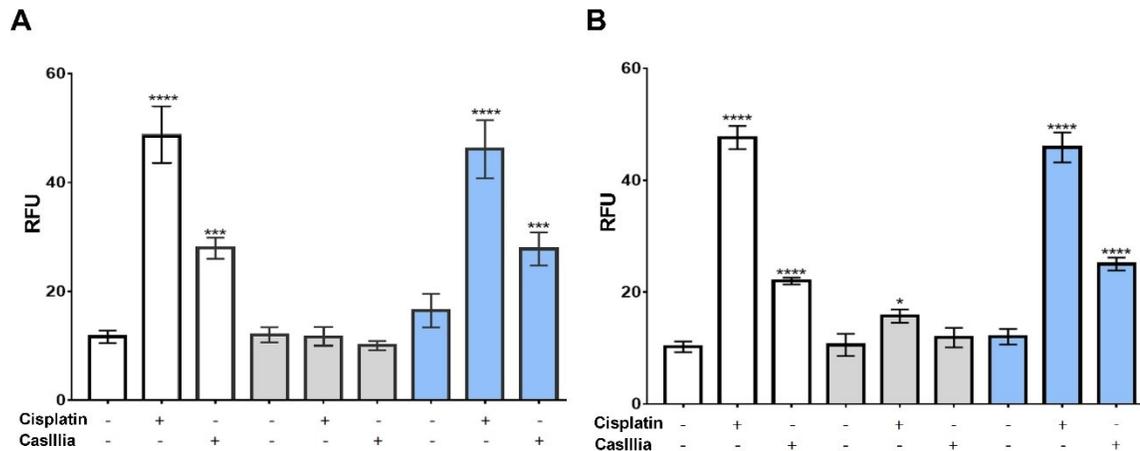


Figura 7. Producción de H_2O_2 con el tratamiento de células SK-N-SH y 3T3-L1 con CasIIIa. (A) NB y (B) células 3T3-L1. Las barras blancas representan células no silenciadas, las barras grises corresponden a células BAX^{KO} y las barras azules representan células $BCL2^{KO}$. Los niveles de significación corresponden a **** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$. RFU: *Relative fluorescence units*.

2.3.4 Capacidad de retención de Ca^{2+}

Los niveles de retención de Ca^{2+} mitocondrial (mCa^{2+}) se determinaron a través de fluorescencia (**Fig. 8**). Estamos en el entendido de que en ausencia de estímulos apoptóticos el PTPm no se encuentra activo y los niveles basales de mCa^{2+} , en ausencia de tratamientos, fueron de 1.76 ± 0.06 RFU para NB y 1.66 ± 0.04 RFU para fibroblastos, lo cual nos dice que en ambas células los niveles de mCa^{2+} son similares a pesar de su diferenciada naturaleza. Sin embargo, cuando las células de NB o fibroblastos no silenciadas se trataron con su respectiva CL_{50} de cisplatino o CasIIIa, la retención de Ca^{2+} disminuyó considerablemente (~1.2 RFU) (**** $p < 0.0001$).

Las células BAX^{KO} de NB tratadas con cisplatino y CasIIIa sufrieron un ligero aumento en la retención de mCa^{2+} en comparación con las células no tratadas (~2 RFU) (* $p < 0.05$). Mientras que las células 3T3-L1 BAX^{KO} aumentaron su capacidad de retención de Ca^{2+} (~2.3 RFU) (**** $p < 0.0001$).

Con respecto a las células $BCL2^{KO}$, ambos tratamientos redujeron la retención de Ca^{2+} aproximadamente a 1.3 RFU tanto en células de neuroblastoma y células 3T3-L1 (**** $p < 0.0001$).

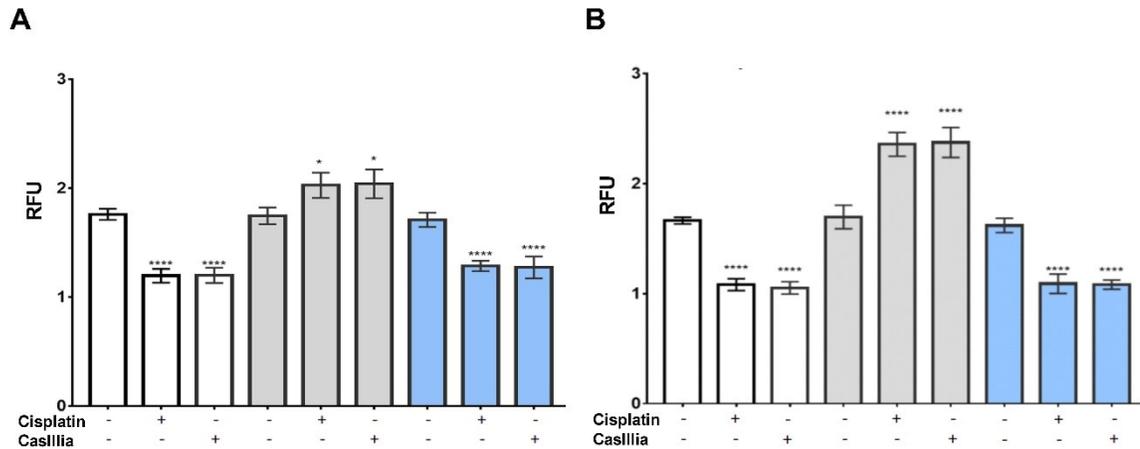


Figura 8. Capacidad de retención de Ca^{2+} . (A) células de neuroblastoma SK-N-SH; (B) Células 3T3-L1. Las barras blancas representan células no silenciadas, las barras grises corresponden a las células BAX^{KO} y las barras azules representan células $BCL2^{KO}$. Los niveles de significancia son **** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$. RFU: *Relative fluorescence units*.

2.3.5 Expresión de caspasa-3

Para comprobar la presencia de apoptosis, inducida por los tratamientos en las diferentes condiciones, se determinó la expresión de caspasa-3 mediante un Western blot (**Fig. 9**). En las células de NB y fibroblastos no silenciadas podemos observar cómo cisplatino y CasIIIa promueven la expresión de caspasa-3. Esta proteína se expresa de igual manera en las células BAX^{KO} y $BCL2^{KO}$ con ambos tratamientos. Sin embargo, como se observa en la **figura 9**, en las células BAX^{KO} se puede apreciar que la expresión de caspasa-3 es mucho menor que en las células $BCL2^{KO}$, independientemente de la línea celular. La expresión diferencial de caspasa-3 fue $BAX^{KO} < \text{control} < BCL2^{KO}$.

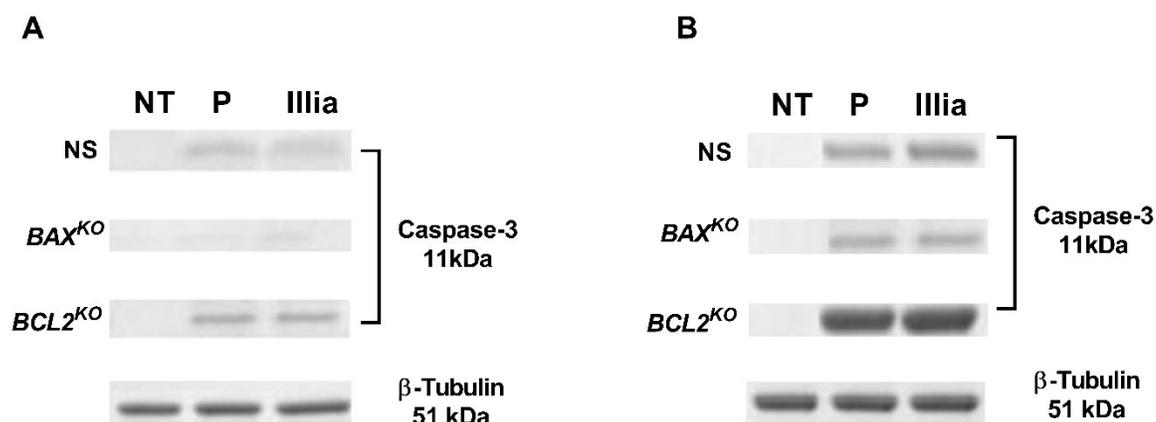


Figura 9. Evaluación de la apoptosis mitocondrial. Expresión diferencial de caspasa-3 en (A) células SK-N-SH y (B) 3T3-L1. NS: No silenciadas; NT: no tratadas; P: cisplatino; Illia: CasIIIa.

2.4 DISCUSIÓN

Como informaron previamente Kachadourian *et al.* (Kachadourian *et al.*, 2010), el cisplatino es capaz de inducir daño en el ADN mitocondrial debido al desequilibrio en la expresión de apoproteínas en la cadena respiratoria, lo que resulta en una mayor liberación de $O_2^{\cdot-}$ en las células tratadas con cisplatino. Silva Platas *et al.* (Silva-Platas *et al.*, 2016), demostraron que el mecanismo de acción de CasIIIgyl involucra pérdida en el potencial de membrana mitocondrial, asociado a un estado redox alterado, resultando en la apertura de mPTP. De los resultados obtenidos con cisplatino o CasIIIa podemos inferir que ambos tratamientos indujeron daño en el ADN, debido al aumento de $O_2^{\cdot-}$. Aquí, demostramos que el aumento de las ERO fue independiente de la quimioterapia. Este aumento no se observó en células con silenciamiento *BAX*, lo que demuestra que este gen es necesario para la liberación de $O_2^{\cdot-}$ a través de PTPm. Por el contrario, el silenciamiento de *BCL2* provocó el aumento de $O_2^{\cdot-}$ tras la exposición a los tratamientos, demostrando que la ausencia de este gen y su proteína correspondiente no comprometía la liberación de $O_2^{\cdot-}$ desde la mitocondria (Otera *et al.*, 2013).

La ausencia del gen *BAX* no provocó ningún cambio en $\Delta\psi_m$, como se informó en un estudio anterior sobre la dinámica de las mitocondrias y el papel de

las proteínas estructurales (Reyna *et al.*, 2020). En este estudio, la inhibición de proteínas responsables de la dinámica mitocondrial, como Bax, resultó en la rigidez de la mitocondria debido a la baja producción de proteínas estructurales que le permiten adaptarse a los cambios en su entorno.

El aumento en la retención de Ca^{2+} fue consecuencia del incremento en la actividad de fosforilación oxidativa por las ERO, ya que se requiere un flujo constante de electrones para el transporte de Ca^{2+} al espacio intramitocondrial a través del uniportador de calcio (Patron *et al.*, 2014). En las células BAX^{KO} tratadas con cisplatino o CasIIIa, el PTPm permaneció inactivo, ya que la actividad de la proteína Bax es fundamental para inducir la apoptosis mitocondrial. En ambas células $BCL2^{KO}$, la retención de Ca^{2+} disminuyó con el tratamiento con cisplatino y CasIIg, lo que provocó la producción de ERO (Kachadourian *et al.*, 2010). Este fenómeno provocó un aumento del gradiente de Ca^{2+} hacia el interior de la mitocondria, provocando la apertura de PTPm por exceso de Ca^{2+} intramitocondrial (Patron *et al.*, 2014). Observamos que las células tratadas se comportaron de manera muy similar al grupo control. Esto puede deberse, en parte, a que al vaciar su contenido de Ca^{2+} , las mitocondrias podrían volver a su estado basal. Estos resultados concuerdan con los informados por Hou *et al.* (Hou *et al.*, 2014), donde, bajo un estímulo inductor de apoptosis, como el aumento de EROs, se activó PTPm, lo que permitió que las mitocondrias liberaran Ca^{2+} y compuestos proapoptóticos. Nuestros resultados confirmaron la actividad de PTPm. Además, con los valores observados para las células no silenciadas y tratadas, fue posible determinar el momento en que el PTPm estaba activo.

Sin embargo, la expresión casi nula de caspasa-3 observada en los grupos BAX^{KO} con tratamiento puede indicar que este gen es necesario para activar la apoptosis (Valencia-Cruz *et al.*, 2013). Este resultado se reforzó con la evaluación de la viabilidad celular en estas células tras la exposición a cisplatino y CasIIIa, demostrando que el silenciamiento de BAX tenía un efecto protector frente a la apoptosis.

En células con *BCL2* silenciado, la permeabilidad de la membrana de la mitocondria se indujo al disminuir $\Delta\psi_m$ y, por lo tanto, desencadenar la apoptosis (Solà-Riera *et al.*, 2020). Nuestros resultados concuerdan con el postulado de que se detectan niveles más altos de caspasa-3 en ausencia de *BCL2*.

En conjunto, nuestros resultados confirmaron que el PTPm requiere la presencia de la proteína Bax para activar $\Delta\psi_m$, afectando la estructura de las mitocondrias, mientras que la proteína Bcl-2 no afecta la actividad de PTPm.

2.5 CONCLUSIONES

El silenciamiento de los genes *BAX* y *BCL2* no comprometió la viabilidad de las células SK-N-SH y 3T3-L1. En ambas líneas celulares, la ausencia de *BAX* no influyó en la generación de ERO, pero la falta de *BCL2* aumentó sus niveles. El silenciamiento de *BAX* tiene un efecto protector contra la apoptosis inducida por cisplatino o CasIIIa. Como era de esperar, también se detectaron niveles más altos de apoptosis cuando se silenció el gen que codifica la proteína antiapoptótica Bcl-2. Podemos concluir que *BAX* es esencial para desencadenar la apoptosis mitocondrial.

2.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Castillo-Rodríguez, R. A., Palencia, G., Anaya-Rubio, I., Pérez, J., Jiménez-Farfán, D., Escamilla-Ramírez, Á., Zavala-Vega, S., Cruz-Salgado, A., Cervantes-Rebolledo, C., Gracia-Mora, I., Ruiz-Azuara, L., & Trejo-Solis, C. (2021). Anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-invasive effect of the copper coordination compound Cas III-La through the induction of reactive oxygen species and regulation of Wnt/ β -catenin pathway in glioma. *Journal of Cancer*, 12(19), 5693–5711.

CHOPCHOP. Disponible en: <https://chopchop.cbu.uib.no/> Última consulta el 10 de septiembre de 2021

García-Ramos, J. C., Gutiérrez, A. G., Vázquez-Aguirre, A., Toledano-Magaña, Y., Alonso-Sáenz, A. L., Gómez-Vidales, V., Flores-Alamo, M., Mejía, C., & Ruiz-Azuara, L. (2017). The mitochondrial apoptotic pathway is induced by Cu(II) antineoplastic compounds (Casiopéínas®) in SK-N-SH neuroblastoma cells after short exposure times. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 30(1), 43–58.

Hou, Y., Ghosh, P., Wan, R., Ouyang, X., Cheng, H., Mattson, M. P., & Cheng, A. (2014). Permeability transition pore-mediated mitochondrial superoxide flashes

mediate an early inhibitory effect of amyloid beta1-42 on neural progenitor cell proliferation. *Neurobiology of aging*, 35(5), 975–989.

Jonas, E. A., Porter, G. A., Jr, Beutner, G., Mnatsakanyan, N., & Alavian, K. N. (2015). Cell death disguised: The mitochondrial permeability transition pore as the c-subunit of the F(1)F(O) ATP synthase. *Pharmacological research*, 99, 382–392.

Kachadourian, R., Brechbuhl, H. M., Ruiz-Azuara, L., Gracia-Mora, I., & Day, B. J. (2010). Casiopeína II-gly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. *Toxicology*, 268(3), 176–183.

Kimura, S., Sekiguchi, M., Watanabe, K., Hiwatarai, M., Seki, M., Yoshida, K., Isobe, T., Shiozawa, Y., Suzuki, H., Hoshino, N., Hayashi, Y., Oka, A., Miyano, S., Ogawa, S., & Takita, J. (2021). Association of high-risk neuroblastoma classification based on expression profiles with differentiation and metabolism. *PloS one*, 16(1), e0245526.

Marín-Hernández, A., Gallardo-Pérez, J. C., López-Ramírez, S. Y., García-García, J. D., Rodríguez-Zavala, J. S., Ruiz-Ramírez, L., Gracia-Mora, I., Zentella-Dehesa, A., Sosa-Garrocho, M., Macías-Silva, M., Moreno-Sánchez, R., & Rodríguez-Enríquez, S. (2012). Casiopeína II-gly and bromo-pyruvate inhibition of tumor hexokinase, glycolysis, and oxidative phosphorylation. *Archives of toxicology*, 86(5), 753–766.

Patron, M., Checchetto, V., Raffaello, A., Teardo, E., Vecellio Reane, D., Mantoan, M., Granatiero, V., Szabò, I., De Stefani, D., & Rizzuto, R. (2014). MICU1 and MICU2 finely tune the mitochondrial Ca²⁺ uniporter by exerting opposite effects on MCU activity. *Molecular cell*, 53(5), 726–737.

Reyna MV, Rinero R, Rodríguez FM, Carabajal-Miotti CL, Ruiz de Frattari S, Vargas AH, González Silva NE, Novak ITC (2020). Cellular interactions in autologous culture of human leukocytes: Mitochondrial dynamics, cellular activation and extracellular traps. *Archives of Hematology and Blood Diseases* 3(1): 13-25.

Ruiz-Azuara L (1992): Process to obtain new mixed copper aminoacidate from methylate phenanthroline complexes to be used as anticancerigenic agents, 1996. USA, Patent No. 5,576,326 (07/628,628).

Ruiz-Azuara L (1997): Process to obtain new mixed copper amino acidatecomplexes from phenylatephenanthroline to be used as anticancerigenic agents. Patent No. 07/628843, US5107005 A, 1992, RE 35458, US RE35, 458E. Ruiz-Azuara, L. United States Patent.

Ruiz-Azuara L (2002): Mark Tittle Casiopeína, Reg. 407543 SECOFI, 1992.

Shalem, O., Sanjana, N. E., & Zhang, F. (2015). High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nature reviews. Genetics*, 16(5), 299–311.

- Silva-Platas, C., Guerrero-Beltrán, C. E., Carrancá, M., Castillo, E. C., Bernal-Ramírez, J., Oropeza-Almazán, Y., González, L. N., Rojo, R., Martínez, L. E., Valiente-Banuet, J., Ruiz-Azuara, L., Bravo-Gómez, M. E., García, N., Carvajal, K., & García-Rivas, G. (2016). Antineoplastic copper coordinated complexes (Casiopeinas) uncouple oxidative phosphorylation and induce mitochondrial permeability transition in cardiac mitochondria and cardiomyocytes. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 48(1), 43–54.
- Solà-Riera, C., García, M., Ljunggren, H. G., & Klingström, J. (2020). Hantavirus inhibits apoptosis by preventing mitochondrial membrane potential loss through up-regulation of the pro-survival factor BCL-2. *PLoS pathogens*, 16(2), e1008297.
- Trejo-Solís, C., Palencia, G., Zúñiga, S., Rodríguez-Ropon, A., Osorio-Rico, L., Luvia, S. T., Gracia-Mora, I., Marquez-Rosado, L., Sánchez, A., Moreno-García, M. E., Cruz, A., Bravo-Gómez, M. E., Ruiz-Ramírez, L., Rodríguez-Enriquez, S., & Sotelo, J. (2005). Cas IIgly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 7(6), 563–574.
- Valencia-Cruz, A. I., Uribe-Figueroa, L. I., Galindo-Murillo, R., Baca-López, K., Gutiérrez, A. G., Vázquez-Aguirre, A., Ruiz-Azuara, L., Hernández-Lemus, E., & Mejía, C. (2013). Whole genome gene expression analysis reveals casiopeína-induced apoptosis pathways. *PloS one*, 8(1), e54664.
- Valter, K., Zhivotovsky, B., & Gogvadze, V. (2018). Cell death-based treatment of neuroblastoma. *Cell death & disease*, 9(2), 113.

3. CAPITULO 2: LA CasIIIa PERMITE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL A TRAVÉS DE LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE HK, VDAC Y CypD EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SK-N-SH.

3.1 INTRODUCCIÓN

El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido extracraneal más común de la infancia. Se deriva de las células de la cresta neural y es responsable del 15% de las muertes por cáncer infantil (Zafar *et al.*, 2021). Para los pacientes con NB de alto riesgo, la tasa de supervivencia es muy reducida a pesar de la terapia multimodal (Gatta *et al.*, 2014). Por lo que es importante fomentar la investigación de nuevos antitumorales como las Casiopeínas (Ruiz-Azuara, 1992, 1997, 2002). Una familia de compuestos de coordinación con un centro activo de cobre(II), los cuales han mostrado una gran actividad antineoplásica tanto *in vitro* como *in vivo* (Trejo-Solis *et al.*, 2005; García-Ramos *et al.*, 2017). El mecanismo de acción se basa en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y en la inducción de la apoptosis mitocondrial, presumiblemente por la activación del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm) (Kachadourian *et al.*, 2010 (Gutiérrez *et al.*, 2013).

La apoptosis mitocondrial está regulada por la formación del PTPm que trae consigo la pérdida del potencial de membrana ($\Delta\psi_m$), impidiendo así la retención de Ca^{2+} y la liberación de citocromo c (Cyt c) por parte de la mitocondria (Pistritto *et al.*, 2016). El poro está compuesto por varias proteínas que se clasifican como estructurales y accesorias. Entre las estructurales destacan la hexocinasa II (HKII) en el citoplasma, canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) anclado a la membrana interna mitocondrial y la ciclofilina D (CypD) en la matriz mitocondrial (Shoshan-Barmatz, *et al.*, 2017).

La HKII es la primera enzima de la ruta de la glicólisis donde cataliza a la glucosa para la producción de glucosa-6-fosfato (G6P) y presenta una alta afinidad de unión a VDAC (Wu *et al.*, 2017). VDAC está involucrada principalmente en la captación de Ca^{2+} proveniente del retículo endoplásmico hacia la mitocondria, donde está involucrado en varios procesos dentro de este organelo (Ponnalagu y

Singh, 2017). Por su parte la CypD es conocido como el regulador maestro de la apertura de PTPm y por ende de la apoptosis intrínseca, impidiendo a las células morir por dicho mecanismo (Porter y Beutner, 2018). En base a lo anterior, es claro que la formación del PTPm es un paso crucial en la inducción de la apoptosis intrínseca. La inhibición de componentes estructurales puede proporcionar información sobre el papel de estas proteínas en el mecanismo de acción de las Casiopeínas.

Para esto, empleamos inhibidores farmacológicos de componentes del PTPm. El agente alquilante 3-bromopirubato (3BrPyr) produce un desacople de la HK provocando el bloqueo de la glicólisis y ocasionando que la célula entre en apoptosis por el decaimiento del efecto Warbug (Guo *et al.*, 2014). Marín y cols. (2012), reportaron que la CasIIgly actúa como un inhibidor de la glicólisis más potente que la 3BrPyr, lo que proporciona un dato importante sobre la posible interacción de las Cas con la HKII y por ende en la estructura del PTPm (Marín *et al.*, 2012).

El compuesto 4,4'-diisotiocianatostilbeno-2,2'-disulfónico (DIDS) es un conocido bloqueador no-específico de la actividad de VDAC, aun así, está demostrada su influencia en el flujo de Ca^{2+} y la inhibición de la actividad de caspasa-3 mediante la prevención de la oligomerización de VDAC (Ben-Hail y Shosshan-Barmatz 2016).

Por último, la ciclosporina A (CsA) es un inmunosupresor que inhibe la apertura del PTPm mediante su interacción con CypD, lo que provoca que el flujo de Ca^{2+} mitocondrial se vea disminuido. Al contrario de los inhibidores antes mencionados, la ciclosporina A le confiere a las células un efecto protector para eludir la apoptosis mitocondrial (Giorgio *et al.*, 2010). Con base a lo anterior, el presente trabajo pretende determinar si el tratamiento con Casiopeína-IIIa es necesario para activar VDAC, HKII y CypD y con ello inducir la apoptosis intrínseca.

3.2 MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1 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 por Dulbecco (DMEM, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 100 U/ml de estreptomycin y penicilina. Las células se mantuvieron en incubadora de CO₂ al 5%, a 37°C y humedad constante.

3.2.2 Inhibición farmacológica de CypD, VDAC y HK en células de NB

Las células (1x10⁶) se expusieron de manera particular durante 1h a 3BrPyr (50 µM), DIDS (300 µM) o CsA (10 µM) (Sigma Chemical Co®, Saint Louis Missouri, MO, USA), para inactivar a HKII, VDAC y CypD, respectivamente.

3.2.3 Tratamientos

Posterior a la inhibición, las células se trataron con CasIIIa (69.7 µM) o Cisplatino (123.3 µM), por un periodo de 4h (García Ramos *et al.*, 2017).

3.2.4 Ensayos de glucosa-6-fosfato

La determinación de la concentración de trabajo del 3BrPyr en las células SK-N-SH se realizó midiendo los niveles de glucosa 6 fosfato (G6P). Así, 1X10⁶ células se expusieron a 30 y 50 µM de 3BrPyr respectivamente, y las concentraciones de G6P se cuantificaron con Glucose-6-Phosphate Assay Kit (MAK014; Sigma Chemical Co®). Las células se homogenizaron en PBS frío 1X y luego se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 min para eliminar el material insoluble. Se tomaron 50 µl del sobrenadante y se adicionaron en una microplaca de 96 pozos con 50 µl de tampón de reacción (G6P Assay Buffer, G6P Enzyme Mix y G6P Substrate Mix). Finalmente, se determinó la concentración de G6P a partir de los niveles de absorbancia a una longitud de onda de 450 nm, utilizando el lector de microplacas ELISA VersaMax™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE. UU.).

3.2.5 Retención de Calcio

La determinación de Ca²⁺ se realizó por medio del reactivo éster acetoximatpílico de Fura-2, AM, FluoroPure™ grade–Special Packaging (Molecular

Probes, Eugene, OR, EE. UU.). Primero aislamos mitocondrias a partir de 5×10^3 células, mediante centrifugación diferencial. Las células se lavaron dos veces con 1 ml de PBS 1X frío y se resuspendieron en un buffer de aislamiento de mitocondrias que contenía sacarosa 250 mM, HEPES 20 mM, DTT 1 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 1,5 mM y PMSF 1 mM. Después, se centrifugaron a 1,000 g durante 5 min a 4°C para eliminar los núcleos. El sobrenadante que contenía las mitocondrias se centrifugó a 15,000 g durante 10 min a 4°C y el sedimento se resuspendió en PBS 1X. Posteriormente se agregaron 100 µl de la solución mitocondrial a cada pocillo de una placa de 96 pozos, seguido de la adición de 100 µl del reactivo Fura-2. Las placas se incubaron durante 80 min a temperatura ambiente y la fluorescencia se cuantificó en un lector de microplacas Varioskan Flash (ThermoFisher Scientific) a una longitud de onda de Ex/Em de 340/380 nm.

3.2.6 Anexina V

La detección de apoptosis se realizó mediante el ensayo Muse Annexin V Dead Cell Kit (Luminex, Complexity simplified, Austin, TX, USA) en el analizador celular Muse™ (Merck Millipore; Alemania). Posterior a los tratamientos, se retiró el medio de las células y se despegaron agregando tripsina. Después se centrifugaron a 2,000 rpm durante 10 min para posteriormente resuspender las células en medio de cultivo, hasta obtener una concentración de entre 1×10^5 y 1×10^7 células/ml; esto con el objetivo de que la concentración final estuviera entre 2×10^4 y 1×10^5 células/ml. Una vez que tuvimos las células en suspensión, tomamos 100 µl y los agregamos a un microtubo de 2 ml, al que adicionamos 100 µl de Anexina V, la cual mezclamos en vórtex durante 3 seg y dejamos incubar por 20 min a temperatura ambiente. Finalmente se realizó la lectura con el software correspondiente a Anexina V Dead Cell Kit en el analizador celular Muse™

3.2.7 Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Los datos se expresaron como la media \pm desviación estándar, con una significancia estadística de $p < 0.05$. Las diferencias significativas entre los grupos se evaluaron mediante

ANOVA y los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico GraphPad Prism v8.0.0 para Windows (GraphPad Software, La Jolla CA, USA).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Evaluación de la inhibición de HKII y VDAC

Para garantizar la inhibición de la actividad de HKII y determinar la concentración de trabajo de 3BrPyr, las células de NB se expusieron a concentraciones crecientes de este compuesto (30 y 50 μM). Según nuestros resultados las células experimentaron una disminución significativa de los niveles de G6P de forma dependiente de la concentración $**p=0.012$, (**Fig. 10**). Cabe destacar que a estas concentraciones y tiempos de exposición (1 h) de 3BrPyr, basados en su morfología, las células no sufrieron algún daño. Por lo que decidimos utilizar la concentración de 50 μM de 3BrPyr para las siguientes determinaciones.

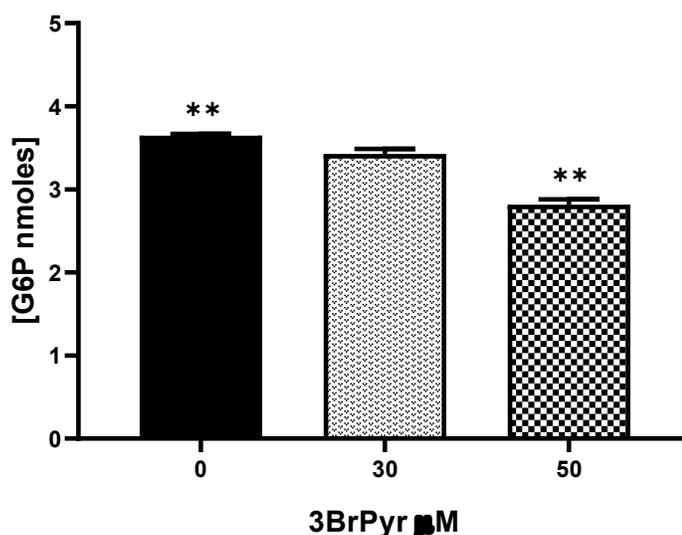


Figura 10. Determinación de la concentración de trabajo de 3BrPyr. Cuantificación de los niveles de G6P en células SK-N-SH expuestas a concentraciones de 30 y 50 μM de 3BrPyr durante 1h. Los niveles significativos corresponden a $**p<0.012$.

Para determinar la concentración de trabajo de DIDS, las células de NB se expusieron a concentraciones ascendentes de este compuesto (100, 200, 300, 400 y 500 μM) y se determinaron los niveles de mCa^{2+} (calcio mitocondrial) por medio de fluorescencia. Podemos observar en la **figura 11**, que las concentraciones de mCa^{2+} se encuentran entre 0.3 y 0.4 más elevadas en los grupos que fueron

expuestos a 300, 400 y 500 μM (**** $p < 0.0001$). Sin embargo, no encontramos una diferencia significativa ($p < 0.9$) de los niveles de $m\text{Ca}^{2+}$ entre estos 3 últimos grupos. Por esta razón decidimos utilizar la concentración de 300 μM para DIDS y así garantizar la inhibición de VDAC en nuestro modelo.

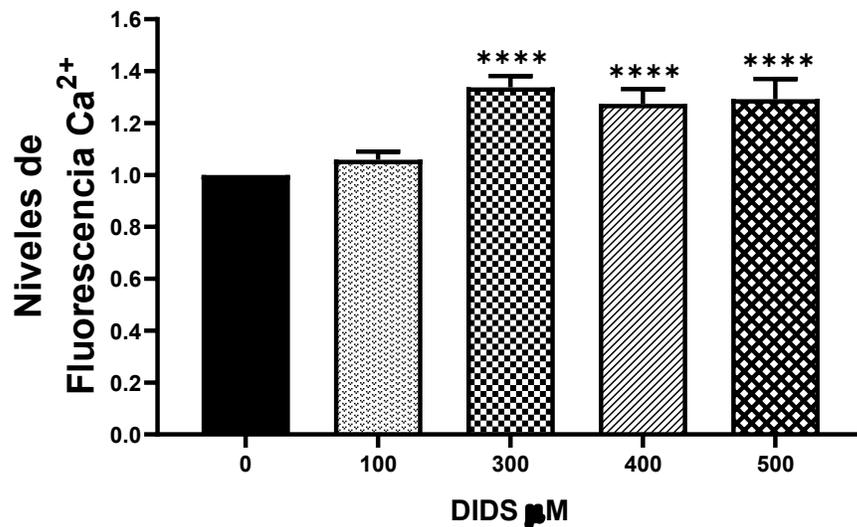


Figura 11. Determinación de la concentración de trabajo de DIDS. Niveles de $m\text{Ca}^{2+}$ en células SK-N-SH expuestas a 100, 200, 300, 400 y 500 μM por 1 h. Los niveles significativos corresponden a **** $p < 0.0001$.

La gran mayoría de la literatura concuerda con que la concentración de trabajo de CsA en múltiples modelos oscila entre 1 y 10 μM , y que la mejor manera de determinar si la proteína CypD está inactiva, es a través de la disminución de apoptosis, por lo que decidimos trabajar directamente con la concentración de 10 μM de CsA para las determinaciones posteriores (Silva-Platas *et al.*, 2015).

3.3.2 Capacidad de retención de $m\text{Ca}^{2+}$ de las células de NB por acción de la CasIIIa en presencia de los inhibidores de HKII, VDAC y CypD

Antes que nada, debemos explicar cada una de las condiciones que se muestran en la **figura 12**. El grupo control son células sin tratamiento; las células se expusieron 1 h a los inhibidores (3BrPyr, DIDS y CsA) + 4 h a los tratamientos (total de exposición 5 h).

En todos los ensayos de retención de mCa^{2+} (**figura 12**) las células experimentaron un decaimiento de los niveles mCa^{2+} con los tratamientos de CasIIIa y cisplatino, comparados con el grupo control.

En la **figura 12A** observamos que existe una diferencia significativa, en la capacidad de retención mCa^{2+} , entre el grupo control y el resto de las condiciones ($p < 0.0001$), con excepción del grupo de células expuestas al 3BrPyr. Esta misma diferencia se presentó entre el grupo inhibido con 3BrPyr y los grupos en los que las células fueron expuestas a ambos tratamientos ($p < 0.0001$). Por su parte, entre el grupo CasIIIa y el grupo 3BrPyr+CasIIIa se observó una diferencia significativa ($p = 0.0008$). Mientras que en el grupo tratado con cisplatino y el grupo 3BrPyr+Cisplatino, la diferencia no fue significativa; aun así, los niveles de mCa^{2+} en el grupo con inhibidor más cisplatino, fue inferior que en el grupo tratado únicamente con cisplatino.

En la **figura 12B**, apreciamos un comportamiento totalmente diferente entre los grupos donde se dio el inhibidor más los tratamientos comparados con la **figura 12A**. En este caso, DIDS (inhibidor de VDAC) conservó los niveles de mCa^{2+} en las células, a pesar de ser expuestas a cisplatino y CasIIIa. La capacidad de retención de mCa^{2+} es superior en los grupos donde las células se expusieron a DIDS con tratamientos que en los grupos que solo fueron tratados con cisplatino y CasIIIa. El grupo con Cisplatino presentó una significancia de $p < 0.0001$ comparado con los grupos DIDS+Cisplatino y DIDS+CasIIIa. Por su parte, el grupo CasIIIa mostró una diferencia de $p = 0.0001$ entre los grupos DIDS+Cisplatino y DIDS+CasIIIa.

En lo que respecta a la **figura 12C**, se observó un efecto similar de los porcentajes de mCa^{2+} comparado con el **panel B**. La inactivación de CypD por ciclosporina A, mantuvo estables los niveles de mCa^{2+} en las células aún después de agregar los tratamientos. El grupo tratado solo con cisplatino presentó porcentajes de retención de mCa^{2+} inferiores a los grupos CsA+Cisplatino y CsA+CasIIIa ($p < 0.0001$). El grupo CasIIIa presentó esta misma tendencia entre los grupos CsA+Cisplatino y CsA+CasIIIa ($p < 0.0001$).

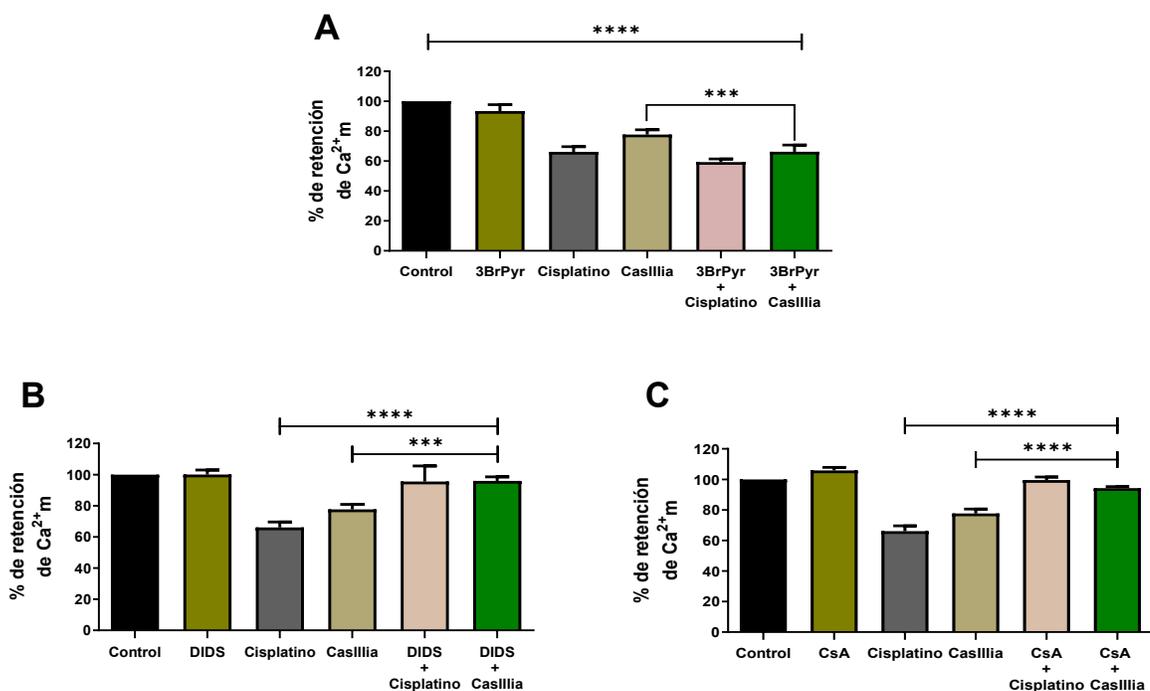


Figura 12. Niveles de retención de mCa²⁺ en células de NB con HKII, VDAC y CypD inhibidas. A) Células donde se inactivó a HKII con 3BrPyr (50 μ M); B) Células donde se inactivó a VDAC con DIDS (300 μ M); C) Células donde se inactivó a CypD con CsA (10 μ M). Los niveles significativos corresponden a A) **** p <0.0001, *** p =0.0008; B) **** p <0.0001, *** p =0.0001; C) **** p <0.0001.

3.3.3 Niveles de apoptosis en células de NB por acción de CasIIIa en presencia de los inhibidores de HKII, VDAC y CypD

Observamos que el patrón de los grupos y las condiciones de los inhibidores y los tratamientos, fueron las mismas que en el ensayo de retención de mCa²⁺(**figura 13**) Encontramos que en las que las células expuestas a los inhibidores (3BrPyr, DIDS y CsA), los porcentajes de apoptosis fueron muy parecidos a los de su correspondiente grupo control, lo que significa que la célula no se ha dañado de manera significativa. Es importante destacar que los resultados mostrados aquí presentan una gran correspondencia con los del ensayo anterior (**Fig. 12**). Por lo que concluimos que a menor retención de mCa²⁺ mayor será el porcentaje de apoptosis.

Por otro lado, es posible apreciar que los mayores niveles de apoptosis se dieron en los grupos donde las células se expusieron a la CasIIIa. Así, la media de los porcentajes de apoptosis para el grupo CasIIIa fue de 19.57 ± 4.65 ; mientras

que para los grupos Control, 3BrPyr y Cisplatino fueron de 9.1 ± 3.39 , 6.5 ± 2.13 y 7.99 ± 5.35 , respectivamente. La media del grupo de 3BrPyr+Cisplatino (12.23 ± 10.03) es ligeramente más alta que en el grupo solo con Cisplatino. Por último, cabe destacar que los porcentajes de apoptosis entre los grupos CasIIIa (19.57 ± 4.65) y 3BrPyr (21.60 ± 4.29) son muy parecidos; por lo que podemos inferir que el daño sufrido por las células se debe exclusivamente a la CasIIIa (**Fig. 13A**).

En el caso de la **figura 13B**, en donde inactivamos a VDAC por acción de DIDS, podemos apreciar cómo el porcentaje de apoptosis se encuentra disminuido en los grupos donde además agregamos los tratamientos. Se observa claramente que el mayor daño causado a las células es debido a la CasIIIa (22.20 ± 1.27). Por su parte, los porcentajes de muerte celular solo por DIDS o Cisplatino, no fueron significativos comparados con el grupo control ($p=0.99$). Podemos observar también una clara diferencia entre el grupo solo con CasIIIa y los grupos DIDS+Cisplatino y DIDS+CasIIIa ($p=0.02$). Esto parece indicar que la inhibición de VDAC afecta el mecanismo de ambos tratamientos disminuyendo considerablemente los porcentajes de apoptosis. Lo anterior puede apreciarse mejor entre el grupo solo con CasIIIa (22.20 ± 1.27) y el grupo DIDS+CasIIIa (5.05 ± 0.21). Sin embargo, no se logra apreciar entre los niveles del grupo Cisplatino (7.66 ± 5.35) y el grupo DIDS+Cisplatino (5.30 ± 0.84). Pero, aun así, es claro que las células están siendo protegidas de morir por apoptosis, debido a la influencia de DIDS.

En el **panel C**, se observa la misma naturaleza que en el **panel B**. No existe una diferencia significativa entre los grupos CsA y Cisplatino comparándolos contra el grupo control ($p=0.93$ y $p=0.99$, respectivamente). En el caso del grupo CasIIIa, se aprecia un nivel de significancia cuando se compara con los grupos de CsA+Cisplatino y CsA+CasIIIa ($p=0.015$ y $p=0.02$, respectivamente). Esta información nos indica que, al parecer, CypD está interviniendo en los procesos apoptóticos mediados por los tratamientos. Al igual que en el **panel B**, entre el grupo Cisplatino y el grupo CsA+Cisplatino, no hay una diferencia significativa entre los porcentajes de apoptosis ($p=0.95$); pero es claro que los niveles de muerte celular disminuyeron más en el grupo expuesto solo al inhibidor (4.73 ± 2.72) que en aquel

al que solo se le agregó cisplatino (7.66 ± 5.35). Esto se refleja con mayor fuerza entre los niveles de apoptosis del grupo CasIIIa (19.57 ± 4.64) y el grupo CsA+CasIIIa (6.06 ± 5.48).

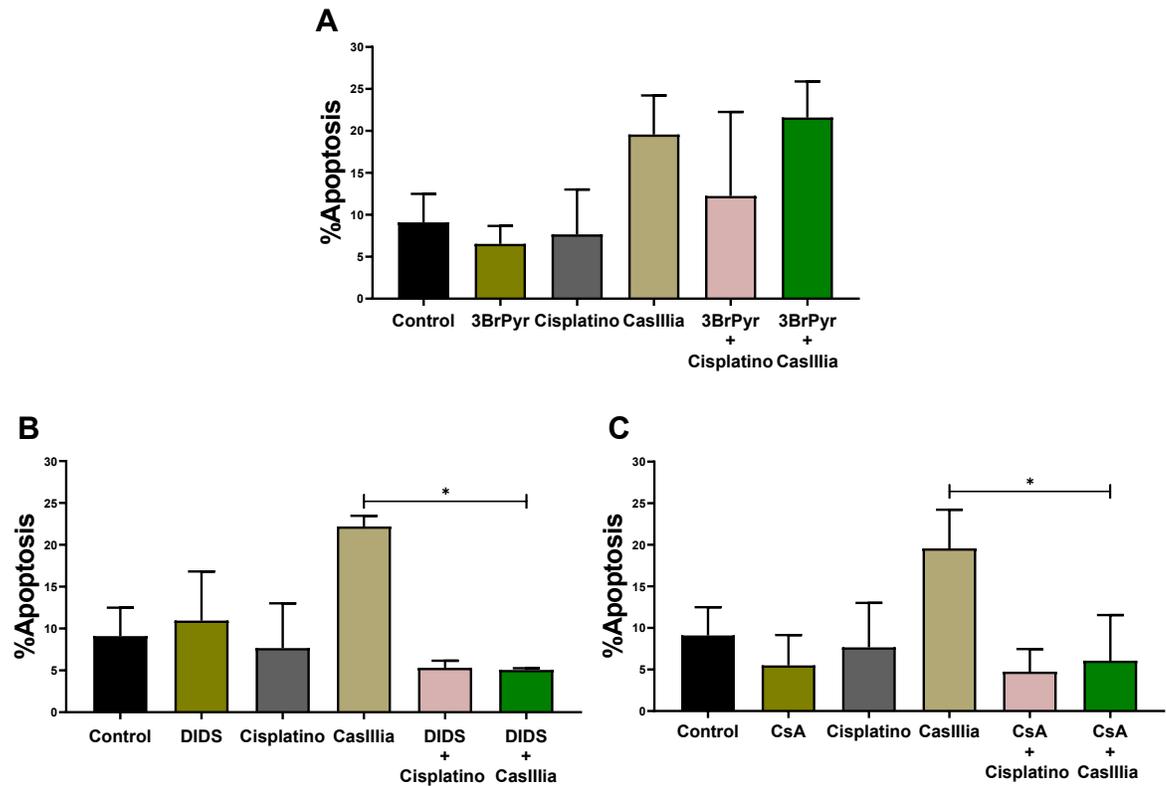


Figura 13. Porcentaje de apoptosis en células de NB con HKII, VDAC y CypD inhibidas. A) Células donde se inactivó HKII con 3BrPyr ($50 \mu\text{M}$); B) Células donde se inactivó VDAC con DIDS ($300 \mu\text{M}$); C) Células donde se inactivó CypD con CsA ($10 \mu\text{M}$). Los niveles significativos corresponden a $*p < 0.02$.

3.4 DISCUSIÓN

Las concentraciones de trabajo de cada uno de los inhibidores en nuestro modelo se encuentran dentro de los rangos reportados por la literatura. Para 3BrPyr los rangos de inhibición oscilan entre los 40 y 100 μM para múltiples líneas celulares (Marin *et al.*, 2012). Mashushita *et al.* en 2012 reportaron 50 μM de 3BrPyr como la CL_{50} para la línea SK-N-SH, la cual es igual a la que nosotros determinamos como concentración de trabajo (Mashushita *et al.*, 2012). En el caso de DIDS, se menciona que es un inhibidor poco específico de VDAC, pero que sin embargo en concentraciones de 100 a 500 μM ha demostrado su efectividad inactivando a VDAC (Ben-Hail y Shoshan-Barnatz, 2016; Yang *et al.*, 2018). Para nuestro modelo, realizamos una cinética de 100 a 500 μM de DIDS y determinamos que la concentración de trabajo adecuada era la de 300 μM , con lo cual garantizamos la inhibición específica de VDAC. Respecto a CsA, decidimos trabajar con concentración de 10 μM , la cual se encuentra dentro del rango previamente reportado para la inhibición de CypD, la cual oscila entre 1 y 10 μM para diversas líneas celulares (Ye *et al.*, 2016; Chauhan *et al.*, 2022).

Así, una menor retención de mCa^{2+} por parte de las mitocondrias, se traduce en una caída del $\Delta\psi\text{m}$ y la consecuente permeabilidad de las membranas mitocondriales (Izzo V, *et al.*, 2016).

Tanto el Cisplatino como la CasIIIa por si solos, redujeron significativamente los niveles de mCa^{2+} . Esta caída en los porcentajes de mCa^{2+} debida a los tratamientos, ya fue previamente reportada por nuestro grupo (Jaime-Martinez *et al.*, 2022). Los bajos niveles de mCa^{2+} (**Fig. 12**) junto con los altos porcentajes de apoptosis (**Fig. 13**) en las células tratadas con CasIIIa, son probablemente debidos a la desestabilidad de la mitocondria inducida por la sobreproducción de ERO (Kachadourian *et al.*, 2010). Se ha observado también que el Cisplatino puede propiciar la caída del $\Delta\psi\text{m}$ en la mitocondria y la liberación del mCa^{2+} a través de la activación de Bax (**Fig. 12**) (Hamdy y Basma, 2020). No obstante, aunque los niveles de mCa^{2+} fueron similares a los de la CasIIIa, esto no se vio reflejado en los porcentajes de apoptosis. El grupo con Cisplatino presentó niveles de apoptosis

muy similares a los del grupo control o el de los inhibidores solos (**Fig. 13**). Esto nos brinda evidencia de que, aunque el Cisplatino logra liberar el mCa^{2+} de manera temprana, la inducción de apoptosis no es tan prominente y rápida como con la CasIIIa. Esta información es comparable con los resultados de García-Ramos *et al.*, donde demostraron el efecto apoptótico de la CasIIIa en tiempos cortos (4 h) (García-Ramos *et al.*, 2017).

Los inhibidores por si solos no disminuyeron los niveles de mCa^{2+} a los tiempos empleados en este trabajo (1 h), ya que solo buscábamos la inactividad de sus respectivos blancos y no un daño a las células.

La inhibición de HKII no afectó el mecanismo de acción en ambos tratamientos. La caída de los porcentajes de mCa^{2+} en los grupos expuestos a 3BrPyr primero y posteriormente tratados con Cisplatino o CasIIIa se debió principalmente a la acción de los tratamientos; aunque al parecer, el 3BrPyr actuó de manera sinérgica con la CasIIIa para disminuir aún más los niveles de mCa^{2+} (**Fig. 12A**). Los niveles de mCa^{2+} son comparables a la presencia de muerte celular. Los porcentajes de apoptosis fueron superiores en los grupos en los que se inactivó la HKII y se expusieron al Cisplatino y a la CasIIIa (**Fig. 13A**). Lo anterior posiblemente se debe a que la HKII interviene más en la producción de ATP durante la glicólisis, que en la formación del PTPm. Es bien sabido que el 3BrPyr puede funcionar como un quimioterapéutico en tumores sólidos, como el NB. Estos tumores se adaptan al cambio de producción de energía de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) por la glicólisis, conocido como efecto Warburg (Warburg, 1925).

Por lo que respecta a la inhibición de VDAC por CypD, la inactivación de esta proteína mantuvo los niveles de mCa^{2+} a pesar de la presencia de ambos tratamientos, seguramente debido a que las membranas mitocondriales permanecieron impermeables manteniendo intacto el $\Delta\psi_m$ (**Fig. 12A y 12B**). Los niveles de mCa^{2+} se correlacionan con los porcentajes de apoptosis. Observamos que la inhibición de la actividad de VDAC propició que los niveles de apoptosis disminuyeran significativamente aún en presencia de Cisplatino y CasIIIa. En un trabajo previo Shoshan-Barnatz *et al.* (2010), demostraron que la oligomerización

de VDAC es un paso importante en la inducción de apoptosis (Shoshan-Barnatz *et al.*, 2010). Posteriormente, Ben-Hail y Shoshan-Barnatz demostraron que DIDS puede impedir la oligomerización de VDAC y por lo tanto impedir la inducción de la apoptosis en células SH-SY5Y de NB tratadas con Cisplatino (Ben-Hail y Shoshan-Barnatz, 2016). Lo anterior demuestra los escasos niveles de apoptosis observados en nuestros resultados (**Fig. 13B**) y refuerza el papel tan importante que tiene VDAC en la formación del PTPm. La CsA está reportada como un inhibidor del PTPm en varios trabajos (Kim *et al.*, 2014), pero se ha observado que su efecto es específicamente sobre CypD (Fakharnia *et al.*, 2017). La investigación de CsA se ha centrado en su posible uso como un medicamento para tratar enfermedades neurodegenerativas. Esto toma relevancia en nuestro estudio ya que varios de los trabajos realizados han tomado como modelos líneas celulares de NB. La CsA ha demostrado servir como agente protector de la apoptosis para las células SH-SY-5Y en el envenenamiento con plomo y zinc impidiendo el colapso del $\Delta\psi_m$, disminuyendo la expresión de Cyt c y caspasa-3, e inclusive atenuando la producción de ERO por parte de estos metales (Ye *et al.*, 2016; Chauhan *et al.*, 2022). Además, se ha observado que la CsA puede ayudar a evitar daños a otros órganos como los riñones y corazón inducidos por el Cisplatino durante su uso en el tratamiento contra el cáncer (Cohen *et al* 2021; Silva-Platas *et al*, 2016). Silva-Platas *et al.* (2016) observaron en mitocondrias de cardiomiocitos, que la CsA confería protección contra la pérdida del $\Delta\psi_m$ e impedía la salida de mCa^{2+} a pesar de que fueron expuestos a la CasIIIa (Silva-Platas *et al*, 2016). Observamos este mismo fenómeno en nuestro modelo (**Fig. 12C**). Con respecto a la muerte celular programada, es claro que nuestros resultados concuerdan con varios de los trabajos ya mencionados anteriormente (Cohen *et al* 2021; Silva-Platas *et al*, 2016; Ye *et al.*, 2016; Chauhan *et al.*, 2022). La CsA protegió a las células de NB de morir por apoptosis en presencia tanto de Cisplatino como de CasIIIa. Lo que reafirma que la CypD juega un papel igual de importante que VDAC en la formación del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial y, en consecuencia, que ambas

proteínas intervienen en gran medida en el mecanismo de acción de las Casiopeínas.

3.5 CONCLUSIONES

La inhibición de la actividad de HKII, VDAC y CypD no alteró la fisiología de las células SK-N-SH. La inhibición de HKII no impidió que el Cisplatino y la CasIIIa disminuyeran los niveles de retención de mCa^{2+} . La inactivación de VDAC y CypD impidieron que ambos tratamientos permitieran la permeabilidad de las membranas mitocondriales y liberaran el Ca^{2+} . Los niveles de apoptosis fueron más pronunciados en las células tratadas con CasIIIa cuando HKII fue inactivada, comparados con los niveles donde se inhibieron VDAC o CypD. Esto demuestra que VDAC y CypD son los componentes más importantes en la formación y actividad de PTPm. Además, demostramos que VDAC y CypD intervienen en el mecanismo de acción de las Casiopeínas sobre las células de neuroblastoma. En base a nuestros hallazgos, es pertinente seguir estudiando la función del PTPm y las proteínas que lo conforman. Así también como la influencia de las Casiopeínas sobre el PTPm en diferentes tumores.

3.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achkar, I. W., Abdulrahman, N., Al-Sulaiti, H., Joseph, J. M., Uddin, S., & Mraiche, F. (2018). Cisplatin based therapy: the role of the mitogen activated protein kinase signaling pathway. *Journal of translational medicine*, 16(1), 96.
- Alemón-Medina, R., Muñoz-Sánchez, J. L., Ruiz-Azuara, L., & Gracia-Mora, I. (2008). Casiopeína II gly induced cytotoxicity to HeLa cells depletes the levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 22(3), 710–715.
- Azoulay-Zohar H, Israelson A, Abu-Hamad S, Shoshan-Barmatz V. (2004). In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel Closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochem. J*, 377: 347–355.
- Bean, J. F., Qiu, Y. Y., Yu, S., Clark, S., Chu, F., & Madonna, M. B. (2014). Glycolysis inhibition and its effect in doxorubicin resistance in neuroblastoma. *Journal of pediatric surgery*, 49(6), 981-984.
- Below J, M Das J. (2019) Vincristine. Jan 1. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan-. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537122/>
- Ben-Hail, D., & Shoshan-Barmatz, V. (2016). VDAC1-interacting anion transport inhibitors inhibit VDAC1 oligomerization and apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(7), 1612-1623.
- Botzer, L. E., Maman, S., Sagi-Assif, O., Meshel, T., Nevo, I., Yron, I., & Witz, I. P. (2016). Hexokinase 2 is a determinant of neuroblastoma metastasis. *British journal of cancer*, 114(7), 759–766.
- Carvalho-Chaigneau F, Trejo-Solís C, Gómez-Ruiz C, Rodríguez-Aguilera E, Macías-Rosales L, Cortés-Barberena E, Cedillo-Peláez C, Gracia-Mora I, Ruiz-Azuara L, Madrid-Marina V, Constantino-Casas F. (2008) Casiopeína III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *Biometals*. 21(1):17-28.
- Chevrollier A, Loiseau D, Reynier P, Stepien G. (2011). Adenine nucleotide translocase 2 is a key mitochondrial protein in cancer metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807: 562–567.
- Cohn, S. L., Pearson, A. D., London, W. B., Monclair, T., Ambros, P. F., Brodeur, G. M., Faldut, A., Hero, B., Ichihara, T., Machin, D., Mosseri, V., Simon, T., Garaventa, A., Castel, V., Matthay, K. K., & INRG Task Force (2009). The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(2), 289–297.

- D'amelio, M., Cavallucci, V., & Cecconi, F. (2010). Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell death and differentiation*, 17(7), 1104.
- Dasari S, Tchounwou PB. (2014) Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 740:364-78.
- Davidoff AM. (2012). Neuroblastoma. *Semin Pediatr Surg*. 21(1):2-14.
- Deniaud, A., Maillier, E., Poncet, D., Kroemer, G., Lemaire, C., & Brenner, C. (2008). Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene*, 27(3), 285.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- Espinal-Enrriquez J, Hernández-Lemus E, Mejía C and Ruiz-Azuara L. (2016). Network analysis shows novel molecular mechanisms of action for copper-based chemotherapy. *Front Physiol*. 6:406.
- Ganeshan, V. R., & Schor, N. F. (2011). Pharmacologic management of high-risk neuroblastoma in children. *Paediatric drugs*, 13(4), 245–255.
- García Ramos, J. C., Gutiérrez, A. G., Vázquez Aguirre, A., Toledano Magaña, Y., Alonso Sáenz, A. L., Gómez Vidales, V., Ruiz Azuara, L. (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), 43–58.
- Giorgio, V., Soriano, M. E., Basso, E., Bisetto, E., Lippe, G., Forte, M. A., & Bernardi, P. (2010). Cyclophilin D in mitochondrial pathophysiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(6-7), 1113-1118.
- Grewal S, Merchant T, Reymond R, McInerney M, Hodge C, Shearer P. (2010) Auditory late effects of childhood cancer therapy: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatrics*. 125: e938-50
- Griendling, K. K., Touyz, R. M., Zweier, J. L., Dikalov, S., Chilian, W., Chen, Y. R. & Bhatnagar, A. (2016). Measurement of reactive oxygen species, reactive nitrogen species, and redox-dependent signaling in the cardiovascular system: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation research*, 119(5), e39-e75.
- Guo, X., Zhang, X., Wang, T., Xian, S., & Lu, Y. (2016). 3-Bromopyruvate and sodium citrate induce apoptosis in human gastric cancer cell line MGC-803 by inhibiting glycolysis and promoting mitochondria-regulated apoptosis pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 475(1), 37-43.

- Gutiérrez AG, Vázquez-Aguirre A, García-Ramos JC, Flores-Alamo M, Hernández-Lemus E, Ruiz-Azuara L, Mejía C. (2013). Copper(II) mixed chelate compounds induce apoptosis through reactive oxygen species in neuroblastoma cell line CHP-212. *J Inorg Biochem.* 126:17-25.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770.
- Huang, M., y Weiss, WA. (2013). Neuroblastoma y MYCN. *Perspectivas de Cold Spring Harbor en medicina.* 3 (10).
- Izzo V, Bravo-San Pedro JM, Sica V, Kroemer G, Galluzzi L. (2016). Mitochondrial Permeability Transition: New Findings and Persisting Uncertainties. *Trends Cell Biol*, 26(9): 655-667.
- Karp, G., & Araiza Martínez, M. E. (2011). *Biología celular y molecular: Conceptos y experimentos / Gerald Karp* (6a ed. --.). México D.F.: McGraw- Hill.
- Kushner, B. H. (2004). Neuroblastoma: a disease requiring a multitude of imaging studies. *Journal of Nuclear Medicine*, 45(7), 1172-1188.
- Landier, W., Knight, K., Wong, F. L., Lee, J., Thomas, O., Kim, H., Kreissman, S. G., Schmidt, M. L., Chen, L., London, W. B., Gurney, J. G., & Bhatia, S. (2014). Ototoxicity in children with high-risk neuroblastoma: prevalence, risk factors, and concordance of grading scales--a report from the Children's Oncology Group. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(6), 527-534.
- Louis CU, Shohet JM. (2015). Neuroblastoma: molecular pathogenesis and therapy. *Annu Rev Med.* 66:49-63.
- Luo, Y. B., Cui, X. C., Yang, L., Zhang, D., & Wang, J. X. (2018). Advances in the Surgical Treatment of Neuroblastoma. *Chinese medical journal*, 131(19), 2332-2337.
- Marín Hernández, A., Gallardo Pérez, J. C., López Ramírez, S. Y., García García, J. D., Rodríguez Zavala, J. S., Ruiz Ramírez, L., Rodríguez Enríquez, S. (2012). Casiopeina II-gly and bromo-pyruvate inhibition of tumor hexokinase, glycolysis, and oxidative phosphorylation. *Archives of Toxicology.* 86(5): 753-766.
- Mejia, C., & Ruiz-Azuara, L. (2008). Casiopeinas IIgly and IIIia induce apoptosis in medulloblastoma cells. *Pathology oncology research: POR*, 14(4), 467-472. <https://doi.org/10.1007/s12253-008-9060-x>
- Moldoveanu, T., Follis, A. V., Kriwacki, R. W., & Green, D. R. (2014). Many players in BCL-2 family affairs. *Trends in biochemical sciences*, 39(3), 101-111.
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, 8(4), 603.

- Ponnalagu D, Singh H. (2017). Anion Channels of Mitochondria. *Handb Exp Pharmacol.* 240:71-101.
- Porter GA Jr, Beutner G. 2018. Cyclophilin D, Somehow somehow a Master Regulator of Mitochondrial Function. *Biomolecules.* 14;8(4).
- Roberts DJ, Tan-Sah VP, Smith JM, Miyamoto S. (2013). Akt Phosphorylates HK-II at Thr-473 and Increases Mitochondrial HK-II Association to Protect Cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 288: 23798–23806.
- Ruiz-Azuara L (1996) Process to obtain new mixed copper amino acidate from methylate phenanthroline complexes to be used as anticancerigenic agents. USA, Patent No. 5,576,326 (07/628,628). 1992.
- Ruiz-Azuara L (1997) Process to obtain new mixed copper amino acidate complexes from phenylatephenanthroline to be used as anticancerigenic agents. Patent No. 07/628843, US5107005 A, 1992, RE 35458, US RE35, 458E. Shoshan-Barmatz V, Krelin Y, Shteinifer-Kuzmine A and Arif T. (2017). Voltage-Dependent Anion Channel 1 As an Emerging Drug Target for Novel Anti-Cancer Therapeutics. *Front. Oncol.* 7:154.
- Silva-Platas, C., Guerrero-Beltrán, C. E., Carrancá, M., Castillo, E. C., Bernal-Ramírez, J., Oropeza-Almazán, Y. & Ruiz-Azuara, L. (2016). Antineoplastic copper coordinated complexes (Casiopeinas) uncouple oxidative phosphorylation and induce mitochondrial permeability transition in cardiac mitochondria and cardiomyocytes. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 48(1), 43-54.
- Smith, V., & Foster, J. (2018). High-Risk Neuroblastoma Treatment Review. *Children (Basel, Switzerland)*, 5(9), 114.
- Trejo-Solís, C., Palencia, G., Zúñiga, S., Rodríguez-Ropon, A., Osorio-Rico, L., Luvia, S. T., Gracia-Mora, I., Marquez-Rosado, L., Sánchez, A., Moreno-García, M. E., Cruz, A., Bravo-Gómez, M. E., Ruiz-Ramírez, L., Rodríguez-Enriquez, S., & Sotelo, J. (2005). Cas IIgly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 7(6), 563–574.
- Tsubaki, M., Takeda, T., Matsumoto, M., Kato, N., Yasuhara, S., Koumoto, Y. I., Imano, M., Satou, T., & Nishida, S. (2018). Tamoxifen suppresses paclitaxel-, vincristine-, and bortezomib-induced neuropathy via inhibition of the protein kinase C/extracellular signal-regulated kinase pathway. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 40(10), 1010428318808670
- Van Arendonk, K. J., & Chung, D. H. (2019). Neuroblastoma: Tumor Biology and Its Implications for Staging and Treatment. *Children (Basel, Switzerland)*, 6(1), 12.

- Warburg, O. (1925). The metabolism of carcinoma cells. *The Journal of Cancer Research*, 9(1), 148-163.
- Wu J, Hu L, Wu F, Zou L, He T. (2017). Poor prognosis of hexokinase 2 overexpression in solid tumors of digestive system: a meta-analysis. *Oncotarget*. 8 (19): 32332-32344