

Determinación de las isoformas del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC)  
en células de Neuroblastoma SK-N-SH tratadas con Casiopeína® Illia.

Q.F.B. Ana Laura Morales  
González



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

Determinación de las isoformas del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en células de Neuroblastoma SK-N-SH tratadas con Casiopeína® Illia.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Maestro en Ciencias en Neurometabolismo

Presenta

Q.F.B. Ana Laura Morales González

Dirigido por

Dra. María del Carmen Mejía Vázquez

Querétaro, Qro. 26 de Septiembre del 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Determinación de las isoformas del canal aniónico  
dependiente de voltaje (VDAC) en células de  
Neuroblastoma SK-N-SH tratadas con Casiopeína®  
IIIa

**por**

Ana Laura Morales González

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

**Clave RI:** MEMAC-290848



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Medicina  
Maestría en Ciencias Neurometabolismo

Determinación de las isoformas del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en células de Neuroblastoma SK-N-SH tratadas con Casiopeína® Illia.

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Maestría en Ciencias en Neurometabolismo.

**Presenta:**

Q.F.B Ana Laura Morales González

Dirigido por:

Dra. María del Carmen Mejía Vázquez

Dra. María del Carmen Mejía Vázquez  
Presidente

\_\_\_\_\_

Firma

Dra. Mónica Leticia Martínez Pacheco  
Secretario

\_\_\_\_\_

Firma

M.C. Luis Arturo Jaime Martínez  
Vocal

\_\_\_\_\_

Firma

Dra. Ana Gabriela Hernández Puga  
Suplente

\_\_\_\_\_

Firma

Dra. Ana Alicia Sánchez Tusié  
Suplente

\_\_\_\_\_

Firma

\_\_\_\_\_  
Dra. Guadalupe Saldívar Lelo de Larrea  
Directora de la Facultad de Medicina

\_\_\_\_\_  
Dr. Nicolás Camacho Calderón  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Septiembre de 2023

## RESUMEN

El neuroblastoma (NB) es un cáncer embrionario y representa el 15% de las muertes por cáncer pediátrico. Debido a los múltiples efectos secundarios de los compuestos empleados para tratar al NB, surgen las Casiopeínas®. Estas son complejos mixtos de cobre(II), cuyo mecanismo de acción produce aumento de especies reactivas de oxígeno (EROs), daño al DNA mitocondrial, desacople de la cadena respiratoria mitocondrial, liberación de citocromo-C (cyt-C) mediante el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP) y, finalmente, apoptosis por vía mitocondrial. Una de las proteínas más importantes del mPTP es el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), que sirve de punto de anclaje para BCL2 y BAX. En mamíferos hay 3 isoformas del gen *VDAC*: *VDAC1*, que regula el paso de iones y metabolitos entre la mitocondria y el citoplasma, y está sobre-expresada en células tumorales; *VDAC2*, que participa en el proceso antiapoptótico al interaccionar con BAK y en el proapoptótico al relacionarse con BAX; y *VDAC3*, que funciona como un regulador de estrés oxidativo. La relevancia del estudio de *VDAC* radica en el importante papel que tiene en la apoptosis mitocondrial, pues permite el ingreso de  $Ca^{2+}$  hacia la mitocondria, con lo que se ocasiona un incremento de EROs y un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa (OMM), desencadenando la apertura del mPTP y conduciendo a la liberación de CYT C. El objetivo del presente trabajo fue ver el efecto de la Casiopeína® IIIa sobre la expresión de las isoformas de *VDAC* en células SK-N-SH. La metodología utilizada para la realización de este proyecto inició con el diseño de primers específicos para cada isoforma de *VDAC* y para el gen constitutivo *RPL32*, después, se cultivó la línea celular de neuroblastoma humano SK-N-SH, tratada con 37  $\mu$ g/mL de Cisplatino o 31  $\mu$ g/mL Casiopeína® IIIa. Se aisló y retrotranscribió el RNA total para evaluar la expresión de las isoformas de *VDAC*, mediante qPCR, en cada condición experimental. Usando el método delta delta Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), se determinaron los cambios en la expresión génica, con respecto al gen de referencia. Los resultados muestran que la Casiopeína® IIIa provoca la sobreexpresión de *VDAC1* y la subexpresión de *VDAC2* y *VDAC3*, a diferencia del grupo tratado con Cisplatino que solo provoca la sobreexpresión de *VDAC1*, pero ningún cambio significativo en cuanto a la expresión de *VDAC2* y *VDAC3*. Esto nos permite concluir que la

Casiopeína® IIIa es un quimioterapéutico eficaz, pues tiene un efecto en la expresión de los genes de *VDAC*, lo cual puede favorecer el proceso de apoptosis intrínseca mediante la función específica de las 3 isoformas de *VDAC* distinto a lo que sucede con el Cisplatino que solo mostró efecto en el gen de *VDAC1*. Además, este trabajo reporta por primera vez los niveles de expresión de *VDAC2* y *VDAC3* en células de NB.

**Palabras Clave:** células SK-N-SH, Casiopeína® IIIa, Apoptosis mitocondrial, mPTP, *VDAC1*, *VDAC2*, *VDAC3*.

## SUMMARY

Neuroblastoma (NB) is an embryonal cancer and accounts for 15% of pediatric cancer deaths. Due to the multiple side effects of the compounds used to treat NB, Casiopeinas® emerged. These are mixed copper(II) complexes, whose mechanism of action produces an increase in reactive oxygen species (ROS), damage to mitochondrial DNA, uncoupling of the mitochondrial respiratory chain, release of cytochrome-C (cyt-C) through the pore mitochondrial permeability transition (mPTP) and, finally, apoptosis via the mitochondrial pathway. One of the most important proteins of mPTP is the voltage-gated anion channel (VDAC), which serves as an anchoring point for BCL2 and BAX. In mammals there are 3 isoforms of the VDAC gene: VDAC1, which regulates the passage of ions and metabolites between the mitochondria and the cytoplasm, and is overexpressed in tumor cells; VDAC2, which participates in the antiapoptotic process by interacting with BAK and in the proapoptotic process by interacting with BAX; and VDAC3, which functions as an oxidative stress regulator. The relevance of the study of VDAC lies in the important role it has in mitochondrial apoptosis, since it allows the entry of Ca<sup>2+</sup> into the mitochondria, causing an increase in ROS and an increase in the permeability of the outer mitochondrial membrane (OMM). ), triggering the opening of the mPTP and leading to the release of CYT C. The objective of the present work was to see the effect of Casiopein® IIIa on the expression of VDAC isoforms in SK-N-SH cells. The methodology used to carry out this project began with the design of specific primers for each VDAC isoform and for the constitutive gene RPL32, then the human neuroblastoma cell line SK-N-SH was cultured, treated with 37 µg/mL of Cisplatin or 31 µg/mL Casiopeína® IIIa. Total RNA was isolated and retrotranscribed to evaluate the expression of VDAC isoforms, by qPCR, in each experimental condition. Using the delta delta Ct (2-ΔΔct) method, changes in gene expression were determined, with respect to the reference gene. The results show that Casiopein® IIIa causes overexpression of VDAC1 and underexpression of VDAC2 and VDAC3, unlike the group treated with Cisplatin that only causes overexpression of VDAC1, but no significant change in the expression of VDAC2 and VDAC3. This allows us to conclude that Casiopein® IIIa is an effective chemotherapeutic, since it has an effect

on the expression of VDAC genes, which can favor the process of intrinsic apoptosis through the specific function of the 3 VDAC isoforms, different from what This happens with Cisplatin, which only showed an effect on the VDAC1 gene. Furthermore, this work reports for the first time the expression levels of VDAC2 and VDAC3 in NB cells.

Keywords: SK-N-SH cells, Casiopeína® Illia, Mitochondrial apoptosis, mPTP, VDAC1, VDAC2, VDAC3.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada para realizar la maestría.

Al programa de seguimiento del fondo de proyectos especiales de rectoría (FOPER) por su contribución para la realización de esta tesis.

Gracias a mis padres y hermanos por apoyarme siempre en cumplir cada una de mis metas.

A mi directora la Dra. María del Carmen Mejía Vázquez por la confianza brindada para pertenecer al grupo de investigación, por su dirección, rigor, exigencia, el tiempo dedicado para la realización de esta tesis.

De igual manera a la Dra. Mónica Martínez Pacheco que fue alguien importante para la realización de los experimentos de laboratorio, la escritura de la tesis, por sus conocimientos, sugerencias, ideas y su apoyo incondicional.

Al Dr. Pablo García Solís y la Dra. Gloria Gutiérrez Silerio por el equipo facilitado para llevar a cabo mis experimentos.

A mis compañeros de laboratorio Luis, José Luis, Judith, Cristian, y a mi amigo de la maestría Xavier por su apoyo personal y profesional durante esta etapa.

Finalmente gracias a Dios por todo.

## TABLA DE CONTENIDOS

1.- INTRODUCCIÓN .....	13
2.- ANTECEDENTES .....	14
Neuroblastoma .....	14
Tratamiento del NB .....	15
Casiopéínas® .....	16
Apoptosis.....	18
Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP) .....	19
Canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC).....	21
3.- OBJETIVOS .....	28
Objetivo general .....	28
Objetivos específicos.....	28
4.- METODOLOGIA .....	29
Cultivo de la línea celular de NB humano SK-N-SH .....	29
Tratamiento con Cisplatino y Casiopéína® IIIa .....	29
Determinación de la expresión de las isoformas de VDAC mediante qPCR. ....	29
Evaluación de retención de calcio mitocondrial (mCa <sup>2+</sup> ) mediante espectrofluorimetría .....	33
Determinación de Anexina V mediante citometría de flujo .....	34
Análisis estadístico .....	34
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	35
PCR punto final .....	35
qPCR (PCR Cuantitativa) .....	36
Evaluación de retención de calcio mitocondrial .....	45
6.- CONCLUSIONES.....	47

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	48
-------------------------------------	----

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Esquema de riesgo tumoral propuesto por el INRG. ....	15
<b>Tabla 2.</b> Sitios de unión a factores de transcripción únicos para cada gen de <i>VDAC</i> . ....	27
<b>Tabla 3.</b> Cuantificación de RNA de la línea celular SK-N-SH en cada condición experimental. ....	30
<b>Tabla 4.</b> Cuantificación del cDNA de la línea celular SK-N-SH de cada condición experimental. ....	31
<b>Tabla 5.</b> Primers de cada isoforma de <i>VDAC</i> para la qPCR. ....	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Estructura química de la Casiopeína® Illia.....	17
<b>Figura 2</b> Mecanismo de acción de las Casiopeínas® .....	18
<b>Figura 3</b> Componentes del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial...20	
<b>Figura 4</b> Expresión comparativa de isoformas de VDAC en células HeLa .....	23
<b>Figura 5</b> Expresión de genes VDAC humanos en tejidos mediante la base de datos Genotype-Tissues-Expression (GTEx).....	24
<b>Figura 6</b> Familia de los sitios de unión del factor de transcripción .....	26
<b>Figura 7</b> PCR punto final. Estandarización de los primers utilizados en la línea celular SK-N-SH.....	35
<b>Figura 8</b> <i>Media del Ct del gen de referencia en la línea celular SK-N-S-N.....</i>	<i>37</i>
<b>Figura 9</b> Media del Ct de VDAC1 en la línea celular SK-N-S-N.....	38
<b>Figura 10</b> <i>Media del Ct de VDAC2 en la línea celular SK-N-S-N.....</i>	<i>39</i>
<b>Figura 11</b> Media del Ct de VDAC3 en la línea celular SK-N-S-N.....	40
<b>Figura 12</b> Expresión génica de VDAC1 en células de Neuroblastoma SK-N-SH mediante PCR semi-cuantitativa (qPCR).....	42
<b>Figura 13</b> Expresión génica de VDAC2 en células de Neuroblastoma SK-N-SH mediante PCR semi-cuantitativa (qPCR).....	43
<b>Figura 14</b> Expresión génica de VDAC3 en células tratadas con Cisplatino y Casiopeína® Illia mediante PCR semi-cuantitativa (qPCR).....	44
<b>Figura 15</b> Retención de mCa <sup>2+</sup> en células de NB tratadas con Cisplatino, Casiopeína® Illia y con el inhibidor DIDS .....	46

## ABREVIATURAS

<b>NB</b>	Neuroblastoma
<b>TNRF<math>\alpha</math></b>	Receptor del factor de necrosis tumoral alfa
<b>OMM</b>	Membrana mitocondrial externa
<b>IMM</b>	Membrana mitocondrial interna
<b>mPTP</b>	Poros de transición de la permeabilidad mitocondrial
<b>ANT</b>	Translocador de nucleótidos de adenina
<b>CyD</b>	Ciclofilina D
<b>HK</b>	Hexocinasa
<b>VDAC</b>	Canal aniónico dependiente de voltaje
<b>Cas<math>\text{\textcircled{R}}</math></b>	Familia de Casiopeínas $\text{\textcircled{R}}$ (Ruiz-Azuara, L. United States Patent 1992, vol. RE 35, 458; Ruiz-Azuara, L. United States Patent 1996, vol. 5, 576:326; Ruiz Azuara, L. Mark Tittle Casiopeínas $\text{\textcircled{R}}$ , Reg. 407543 SECOFI, 1992, 2002)
<b>AIF</b>	Factor inductor de apoptosis
<b>Lnr</b>	Motivo de iniciador
<b>DPE</b>	Motivo iniciador aguas abajo
<b>BRE</b>	Elemento de reconocimiento B
<b>TCT</b>	Motivo iniciador de polimirimidina
<b>TFBS</b>	Sitios de unión del factor de transcripción
<b>SK-N-SH</b>	Células de NB sin amplificación del oncogen N-Myc
<b>CytC</b>	Citocromo C
<b>EROs</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>mCa<math>^{2+}</math></b>	Calcio mitocondrial

## 1.- INTRODUCCIÓN

El NB es un cáncer pediátrico considerado como el tumor sólido extracraneal más frecuente en la infancia; surge de células de la cresta neural y migra hacia cualquier sitio del sistema nervioso simpático, principalmente a la glándula suprarrenal (Sokol & Desai, 2019; Yu *et al.*, 2021). La tasa de supervivencia para los pacientes con NB de alto riesgo es menor del 50% debido a la gran heterogeneidad clínica, biológica, genética y morfológica, lo que ha dificultado una terapia universal exitosa para su tratamiento (Zafar *et al.*, 2021). Los quimioterapéuticos de primera línea para el tratamiento del NB son los compuestos a base de platino, sin embargo, se ha reportado que pueden causar efectos graves como bajo recuento sanguíneo, náuseas, vómitos, diarrea, daño a médula, así como nefrotoxicidad, neurotoxicidad y ototoxicidad. Además, se ha visto que pueden provocar resistencia al aumentar los niveles de glutatión en el citoplasma, permitiendo de esta manera una reparación del DNA o también impidiendo el paso del Cisplatino a través de la membrana plasmática (Erturgrul *et al.*, 2020). Por ello es necesario continuar estudiando alternativas menos tóxicas y más eficaces para el tratamiento del NB como las Casiopeínas® (Ruiz-Azuara *et al.*, 1995), una familia de compuestos a base de cobre(II) que han demostrado ser un antineoplásico prometedor en ensayos clínicos y modelos animales (Silva-Platas *et al.*, 2018). Su mecanismo de acción es la inducción de la apoptosis en células cancerosas por la vía mitocondrial (Gutiérrez *et al.*, 2013), siendo un componente importante el mPTP. En situaciones de estrés, el mPTP permite la salida de CYT C y con ello la activación de diferentes proteínas que inducen la apoptosis. El mPTP, es una estructura transmembranal que normalmente se encuentra en un estado cerrado y que por varios factores como el estrés oxidativo, se puede inducir su apertura ya sea de forma permanente o transitoria (Yalamanchili *et al.*, 2022). Se conoce que el mPTP está formado por diferentes proteínas, una de ellas es el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) que se encuentra en la membrana mitocondrial externa (OMM, por sus siglas en inglés) y se ha asociado como punto de control clave en el intercambio de metabolitos entre el citosol y la mitocondria. En mamíferos se

conocen 3 isoformas del gen *VDAC*: *VDAC1*, *VDAC2* y *VDAC3* (Zinghirino *et al.*, 2021). En cuanto a su funcionalidad, *VDAC1* ejerce su acción proapoptótica al asociarse con BAX (Camara *et al.*, 2017); hasta el momento, la función de *VDAC2* no ha sido definida ya que según los estudios que se han realizado, le confieren un papel dual ya que puede ser antiapoptótica al unirse con BAK (Yuan *et al.*, 2021) o proapoptótica si se une con BAX (Naghdi *et al.*, 2016); y, finalmente, *VDAC3*, que es la isoforma menos conocida del mPTP, a la cual se le ha atribuido la función de regulador del estrés oxidativo. En cuanto a la expresión de las isoformas de *VDAC*, aunque se ha reportado con niveles elevados en diversas líneas celulares tumorales, aún no se conoce su comportamiento en el NB, por ello la relevancia de este trabajo, donde además nos interesa conocer el papel de la Casiopeína® IIIa sobre las isoformas de *VDAC*.

## 2.- ANTECEDENTES

### Neuroblastoma

El Neuroblastoma es un cáncer embrionario derivado de las células de la cresta neural, se presenta principalmente en los niños, la edad media para su diagnóstico es de 17 meses y representa aproximadamente el 15% de las muertes por cáncer pediátrico (Maris, 2012). En casi el 46% de los casos de NB, este puede aparecer en la médula suprarrenal, el 18% tiene una localización a nivel abdominal y extra-adrenal, el 14% en el mediastino posterior o tórax y el resto puede aparecer en el cuello, pelvis u otros lugares del sistema nervioso simpático (Swift *et al.*, 2018). Debido al amplio comportamiento clínico del NB, el sistema de clasificación del Grupo internacional de Riesgo de NB (INRG) tomó en cuenta variables como la edad del paciente, la categoría histológica, el grado de diferenciación tumoral, la amplificación del oncogén *N-MYC*, la presencia de aberraciones del cromosoma 11q y la ploidía de células tumorales para la estratificación del pretratamiento del NB (Cohn *et al.*, 2009) (**Tabla1**).

**Tabla 1**

*Esquema de riesgo tumoral propuesto por el INRG para el neuroblastoma.*

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

*Nota:* GN, ganglioneuroma; GNB, ganglioneuroblastoma; NA, no amplificado; Amp, amplificado.

Tomado del original Cohn *et al.* 2009.

### **Tratamiento del NB**

Con relación al tratamiento del NB los compuestos de platino son los más comúnmente utilizados, sin embargo, presentan diversos efectos tóxicos. Se ha demostrado que los quimioterapéuticos basados en metales de transición, como el Cisplatino, son dañinos para las células sanas, ya que el organismo no es capaz de metabolizarlo y por ello se acumula en forma de trazas; en este sentido, se ha reportado que este compuesto puede producir nefrotoxicidad, neurotoxicidad y ototoxicidad (Ruggiero et al, 2013), que el carboplatino induce mielosupresión y emesis neurotóxica, y que el oxaliplatino es responsable de producir neuropatía periférica. Además, los pacientes han presentado resistencia al Cisplatino (Erturgrul

*et al*, 2020). Debido a esto, ha sido primordial seguir indagando con otros compuestos menos tóxicos y que el organismo pueda metabolizar, como las Casiopeínas® (Cas), que están compuestas de cobre.

### **Casiopeínas®**

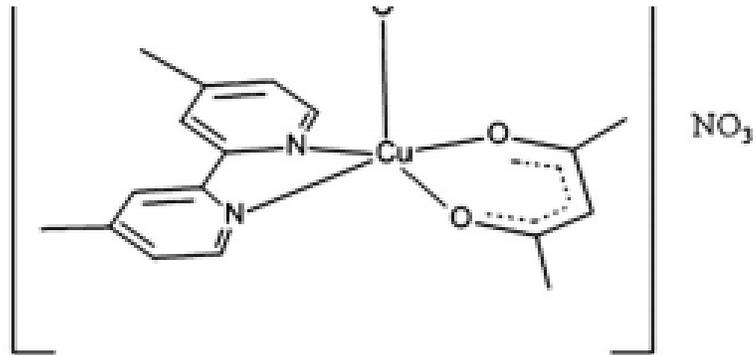
Debido a las reacciones adversas de los compuestos de platino que afectan la calidad de vida de los pacientes, se han investigado otros compuestos como las Casiopeínas®, una familia de complejos mixtos de quelatos de cobre(II) con efectos antiproliferativos (Gracia *et al*, 2001), citotóxicos (Alemón *et al.*, 2007) citostáticos (Sánchez, Gracia, Roldan, & Ruíz, 2006), genotóxicos (Ruiz *et al*, 1995) y antitumorales (Carvalho *et al*, 2008) en modelos *in vitro* e *in vivo*. Además, las Cas han mostrado una efectividad 10 veces mayor en comparación con el Cisplatino (Galindo-Murillo *et al.*, 2015).

Estos compuestos tienen menor capacidad tóxica en comparación con otras drogas antineoplásicas, ya que el cobre participa en las reacciones normales metabólicas. Otra característica de las Cas es que poseen selectividad celular neoplásica específica, por lo que los linfocitos y macrófagos no se ven comprometidos, evitando de ese modo la presencia de leucopenias (García *et al*, 2016).

Uno de los miembros de esta familia de compuestos es la Casiopeína® IIIa (**Figura 1**) que actualmente se encuentra en Fase I en ensayos clínicos para probar su eficacia.

**Figura 1**

*Estructura química de la Casiopeína® IIIa*

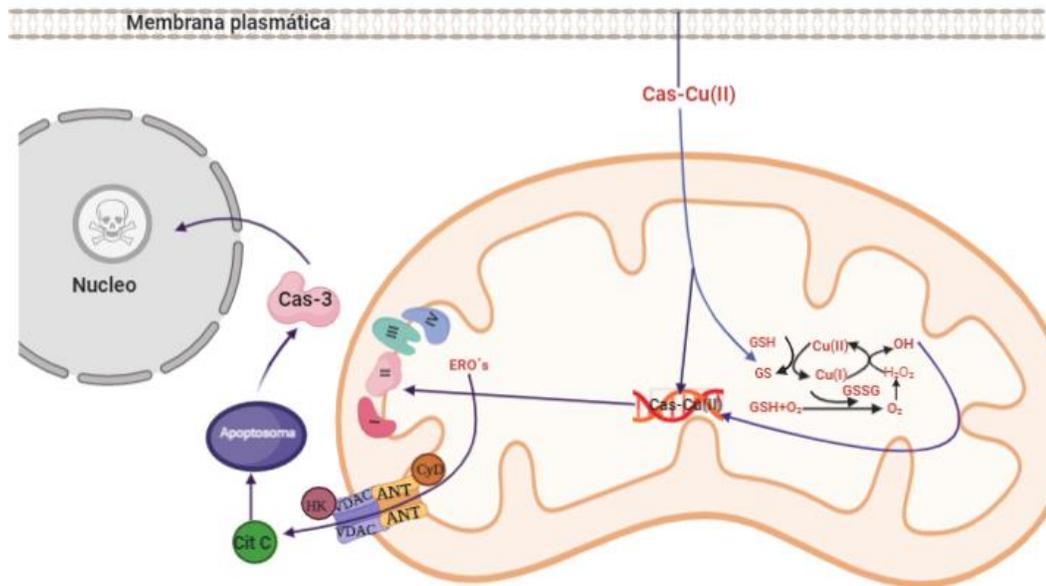


*Nota.* Fórmula [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina) (acetilacetonato) H<sub>2</sub>O] NO<sub>3</sub>. Tomado de Ruíz-Azuara, 1992, 1996, 1997.

En cuanto al mecanismo de acción descrito para las Cas (**Figura 2**), involucra el desacople de la cadena respiratoria celular por la interacción del succinato y 2-oxoglutarato deshidrogenasa, así como la unión al DNA mediante la formación de aductos con fracciones nitrogenadas (Marín *et al*, 2012). Esto conlleva a la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y a la consecuente apoptosis por la vía intrínseca (Gutiérrez *et al*, 2013).

## Figura 2

Mecanismo de acción de las Casiopeínas®



*Nota.* En la figura se puede observar que la Casiopeína® ingresa a la mitocondria, esta actúa interactuando directamente con el DNA o provocando un aumento de EROs, mediante las 2 vías provoca un daño al DNA mitocondrial, llevando a un desacople de la cadena respiratoria mitocondrial y con la salida de CYT C mediante el mPTP, CYT C activa a otras proteínas que llevan finalmente a apoptosis. Modificado de Marín et al., 2012; Gutiérrez et al., 2013.

## Apoptosis

La apoptosis es el principal mecanismo de muerte celular programada. Existen 2 vías apoptóticas: la vía extrínseca mediada por receptor y la vía intrínseca mediada por la mitocondria.

La vía extrínseca comienza con la interacción de los receptores de muerte que forman parte de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR), los cuales se encuentran ubicados en la superficie celular y que al unirse con sus respectivos ligandos pueden interactuar con las procaspasas -8 ó -10, las cuales después de madurar pasan a caspasas -8 ó -10. Posterior a la activación de las caspasas iniciadoras, comienza el procesamiento de las caspasas efectoras -3, -6 ó -7, iniciando la ruptura de sustratos que son esenciales para la viabilidad celular

y provocando la muerte de la célula. En algunos casos la célula no muere mediante esta vía, si no que requiere que la caspasa-8 se una a la proteína BID lo que conlleva a la formación del fragmento truncado t-BID, el cual activará proteínas proapoptóticas que provocarán la permeabilidad de la OMM, uniéndose de esta manera con la vía intrínseca mediante la formación del apoptosoma (Pistritto, Trisciuglio, Ceci, Garufi, & D'orazzi, 2016).

Por su parte, la vía mediada por mitocondrias está activada por estímulos tales como fármacos quimioterapéuticos o radioterapia, que inducirán daño genético, hipoxia y el aumento excesivo en las concentraciones de calcio ( $Ca^{2+}$ ), provocando la activación de los miembros proapoptóticos de la familia BCL2 tales como BAX y BAK que inhiben a las proteínas antiapoptóticas (BCL2, BCL<sup>xL</sup> y MCL1), induciendo de esta manera el aumento de la permeabilidad de la OMM lo que promueve la salida de proteínas apoptogénicas como el CYT C, que posteriormente activa a otras proteínas apoptóticas que llevan a muerte celular (Pistritto, Trisciuglio, Ceci, Garufi, & D'orazzi, 2016).

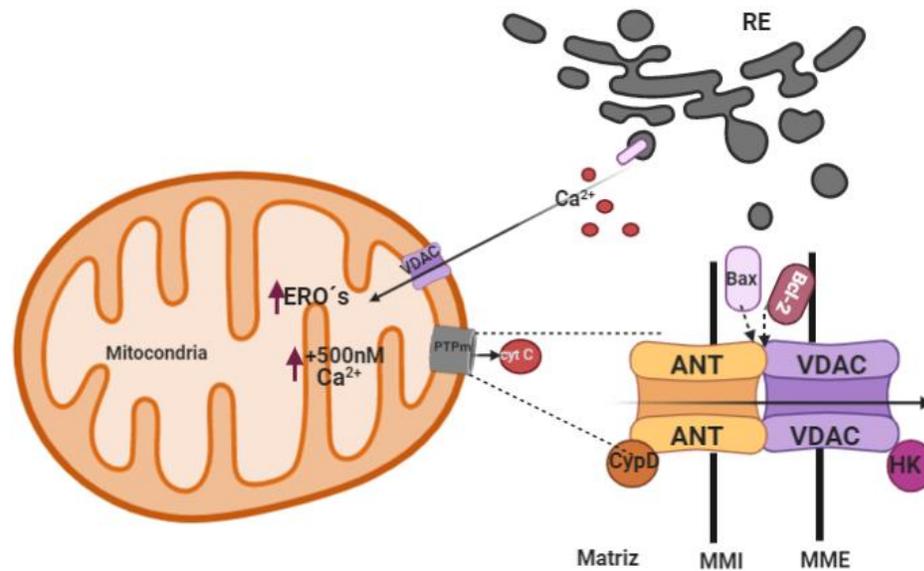
Una de las maneras en que sale el CYT C de la mitocondria es mediante el mPTP.

### **Poros de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP)**

Un factor importante en la apoptosis mediada por mitocondria, es el mPTP, el cual está conformado por proteínas como el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) ubicado en la membrana mitocondrial interna (IMM), la ciclofilina D (CyD) localizada en la matriz mitocondrial, la Hexocinasa (HK) y el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en la OMM (**Figura 3**).

**Figura 3**

*Componentes del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial*



*Nota.* En la figura se observa que cuando el retículo endoplásmico que es el organelo de almacenamiento  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentra en un estado de estrés, (que esto puede ser provocado por quimioterapéuticos), induce la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria ocasionando un aumento de EROs y un incremento de la permeabilidad de la OMM, desencadenando la apertura del mPTP, lo que conduce a la liberación de CYT C y otros factores proapoptóticos. Modificado de Zorov *et al*, 2009.

VDAC es un punto de anclaje importante para BCL2 y BAX, en un estudio llevado a cabo por el grupo de investigación en donde se silenció, mediante CRISPR-Cas9, a  $BCL-2^{KO}$  y  $BAX^{KO}$  se encontró que en células de NB  $BAX^{KO}$  tratadas con Cas no hubo presencia de caspasa-3, por lo que se considera a BAX esencial para la apoptosis (Jaime-Martínez, Martínez-Pacheco, Ruiz-Azuara, & Mejía, 2022), es por ello que es necesario seguir investigando la relación entre BAX, BCL2 y VDAC.

### **Canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC)**

Las VDAC son una familia de proteínas que se encuentran en la OMM, y tienen un peso molecular aproximado de 32 kDa. Como su nombre lo indica, son selectivas a aniones como el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), cloro (Cl), potasio ( $\text{K}^+$ ), sodio ( $\text{Na}^+$ ), metabolitos y moléculas como el ATP, ADP y NADH (Mazure N. , 2017), y tienen una dependencia al voltaje para su conformación abierta de -40 a + 40 mV o cerrada de +40 a +60 mV (Camara, Zhou, Wen, Takhorshid, & Kwok, 2017)

En mamíferos se encuentran las 3 isoformas, *VDAC1*, *VDAC2* y *VDAC3*, con una secuencia altamente conservada, de aproximadamente un 75%.

El gen *VDAC1* en humanos mide aproximadamente 30 kpb, se encuentra en el cromosoma 5q31-32, comprende 9 exones y el intrón 1 abarca aproximadamente la mitad de su longitud (14.1 kpb). (Shoshan *et al*, 2010). *VDAC1* es una proteína de estructura de barril compuesto por 19 hojas  $\beta$  transmembranales, en donde su región N-terminal se ubica dentro del poro, pero una porción se encuentra de forma extracelular e interactuar con proteínas de la familia de BCL2; además contiene 2 cisteínas (Shoshan-Barmatz *et al*, 2020)

*VDAC1* se conoce como “el guardián” que regula el paso de iones y metabolitos entre las mitocondrias y el citoplasma, por lo que se le considera una proteína clave en la regulación mitocondrial y la supervivencia celular. En diversos estudios se ha demostrado que la sobreexpresión de *VDAC1* lleva a su homooligomerización, liberación de proteínas proapoptóticas y finalmente a la inducción de apoptosis (Shoshan-Barmatz *et al*, 2020). Se ha encontrado una mayor expresión de *VDAC1* en líneas de células cancerosas a diferencia de las células normales, y que al interactuar con proteínas como la HK favorecen la producción de energía, esencial para las células cancerosas (Mazure N. , 2017). Según los estudios llevados a cabo, *VDAC1* se asocia con proteínas proapoptóticas (BAX, BAK y BIM) que inducen la permeabilización del OMM y con ello la salida de CYT C. Por otra parte, también se ha reportado su interacción con proteínas

antiapoptóticas (BCL2 y BCL-XL) inhibiendo la oligomerización de VDAC1 y de esta manera impide la apoptosis (Camara, Zhou, Wen, Takhorshid, & Kwok, 2017).

VDAC2 se encuentra en la OMM, su gen se localiza en el cromosoma 10q22 (Shoshan *et al*, 2010), está formado por 10 exones que van de 5' a 3'. En relación a su función, a nivel proteico VDAC2 es importante para la movilización de BAK y BAX hacia la mitocondria para después separarse de VDAC2, oligomerizarse y con ello permitir la salida CYT C, induciendo así la apoptosis por la vía mitocondrial (Yuan, Dewson, Czabotar, & Birkinshaw, 2021). Por otro lado, también se ha reportado que VDAC2 no permite la inserción de BAK ni su oligomerización y por lo tanto, inhibe la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (OMMP) (Naghdi & Hajnóczky, 2016). La función de VDAC2 como promotor o inhibidor de la apoptosis aún no está claro, por ello es necesario seguir realizando pruebas funcionales.

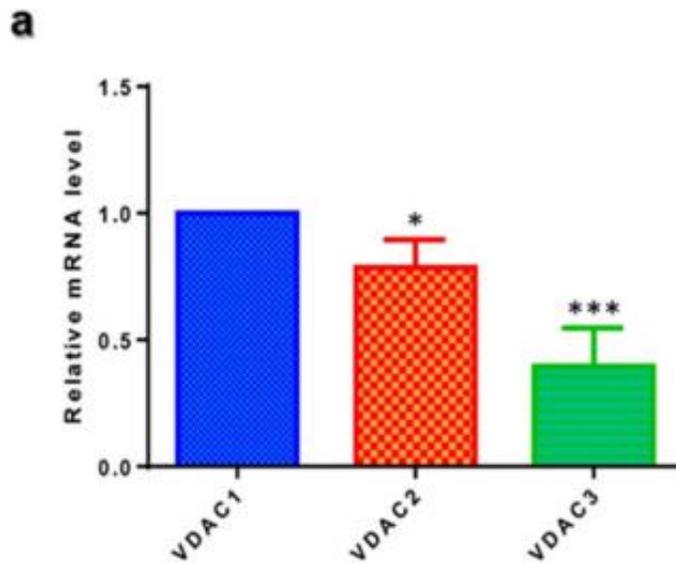
Por su parte VDAC3 se encuentra ampliamente distribuido en la OMM, su gen se localiza en el cromosoma 8p11.2, mide 13 kb y está formado por 10 exones (Shoshan *et al*, 2010). Forma parte del mPTP y, por lo tanto, conduce a la salida de CYT C al inicio de la apoptosis y se ha reportado que está altamente expresado en los testículos (Messina A. , Reina, Guarino, & De Pinto, 2012). Aunque hasta la fecha se conoce muy poco acerca de VDAC3, según los análisis evolutivos, se le considera la más antigua de la familia de VDAC y que mediante la duplicación de genes surgieron más recientemente VDAC1 y VDAC2 (Reina *et al*, 2022). En cuanto a su funcionalidad se ha planteado la hipótesis de que actúa como un regulador de estrés oxidativo. Para comprobar dicha hipótesis se llevó a cabo un estudio en donde se trabajó con HAP1 que es una línea celular casi haploide donde se silenció a VDAC3 (*HAP1-ΔVDAC3*), y se encontró que en células *HAP1-ΔVDAC3* hubo un aumento de superóxido mitocondrial. También se evaluó el efecto de inductores de EROs mitocondrial (rotenona, paraquat y menadiona) ante *HAP1-ΔVDAC3* y se observó una disminución de la viabilidad celular de aproximadamente el 15% en *HAP1-ΔVDAC3* cuando fueron tratadas con paraquat y menadiona, y de

un 40% después del tratamiento con rotenona. En cuanto a la producción de superóxido mitocondrial hubo un aumento significativo en células tratadas con rotenona y menadiona, por lo consiguiente el aumento de EROs provocó también una rápida despolarización del potencial de membrana mitocondrial. Por todo esto hasta el momento se concluye que VDAC3 actúa como un protector del estrés oxidativo mitocondrial (Reina *et al*, 2022).

En un estudio donde se analizó la expresión de las isoformas de VDAC en células HeLa (**Figura 4**), se encontró que el transcrito de VDAC2 fue menor que VDAC1 y el que presentó menor expresión fue VDAC3.

**Figura 4**

Expresión comparativa de isoformas de VDAC en células HeLa



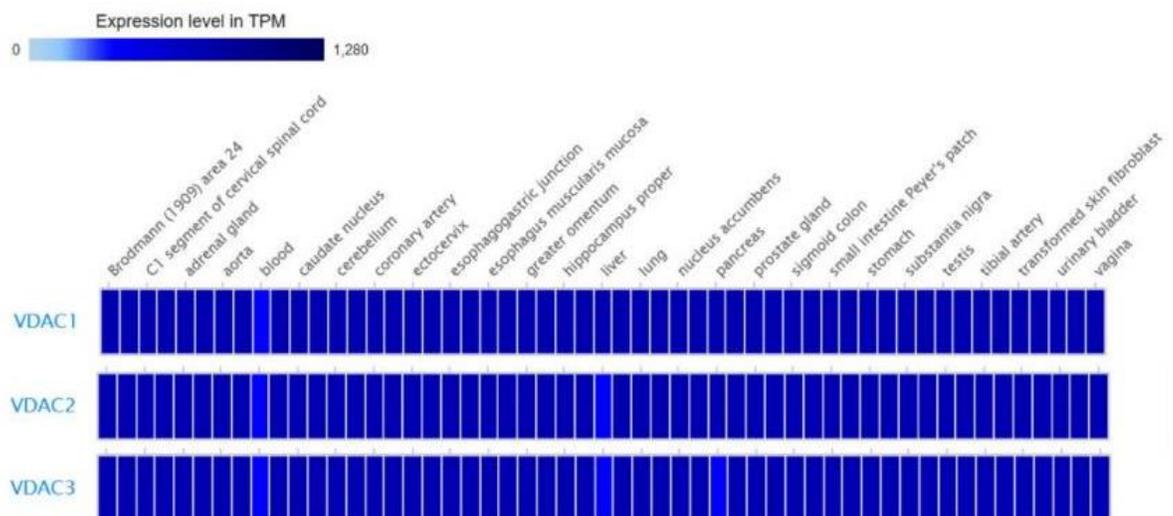
*Nota.* Se muestra la expresión relativa del mRNA de las isoformas de VDAC, la técnica utilizada fue mediante qPCR y para el análisis se aplicó el método  $2^{-\Delta\Delta ct}$ . Se tomó como estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Tomado de Zinghirino *et al*, 2020.

En relación a la expresión del RNAm de las isoformas de *VDAC* en tejidos humanos, Zinghirino *et al* (2020) al analizar el conjunto de datos del proyecto FANTOM 5, encontraron que hay una mayor expresión de los transcritos de *VDAC3* superando a *VDAC2* pero en particular a *VDAC1*, debido a esto, se estudió la actividad de los promotores de *VDAC* y se encontró que el promotor de *VDAC3* tenía una mayor actividad transcripcional y en el caso de *VDAC1* sucedió lo contrario, lo que llevó a una actividad transcripcional 10 a 8 veces mas baja.

Respecto a la especificidad de la expresión de estas isoformas en los tejidos, se conoce que *VDAC1* se expresa en niveles mas altos en tejidos de la piel y riñón; *VDAC2* en vejiga, vagina y cuello uterino; y *VDAC3* se expresa en mayor concentración en los testículos (**Figura 5**).

**Figura 5**

*Expresión de genes VDAC humanos en tejidos mediante la base de datos Genotype-Tissues-Expression (GTEX)*



*Nota.* El mapa de calor muestra un rango que va de 0 a 1280 transcritos por millón de kilobase (TPM) del mRNA. Tomado de Zinghirino *et al*, 2020

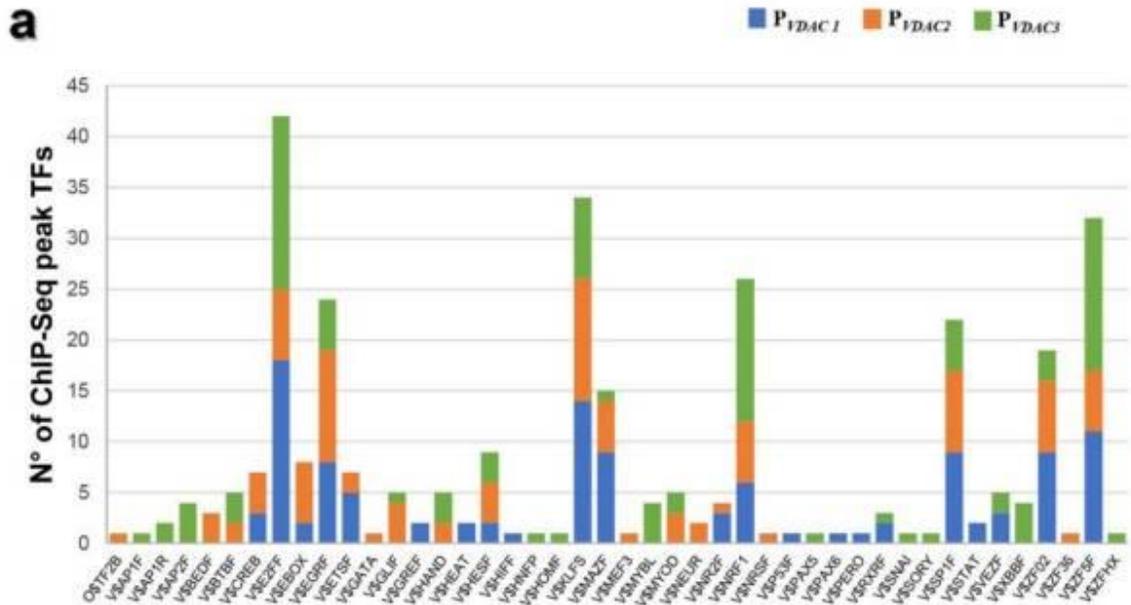
En este mismo estudio (Zinghirino *et al*, 2020) analizaron la actividad promotora de los genes de las isoformas de *VDAC* empleando un sistema reportero de luciferasa, en donde encontraron que *VDAC1* tiene un promotor que presentó de 8 a 10 veces menos actividad transcripcional que *VDAC2* y *VDAC3*.

Mediante la colección de bases de datos de promotores validados Eukaryotic promoter database (EPD) y YAPP Eukaryotic Core Promoter Predictor y ElemeNT se identificaron los promotores principales, por lo que se reportó que los genes que codifican las isoformas de *VDAC* carecen de caja TATA pero contiene el motivo iniciador (Inr), elemento iniciador río abajo (DPE) y el elemento de reconocimiento B (BRE). Algo característico de *VDAC2* y *VDAC3* es que contienen un sitio de inicio conocido como motivo iniciador de polimirimidina (TCT) (Zinghirino *et al*, 2020).

Por otro lado, los genes reguladores río arriba de los genes *VDAC* se analizaron mediante el software MatInspector (Genomatix v310) y se validaron con experimentos de ChIP-Seq (Proyecto ENCODE v3), en donde Zinghirino y colaboradores en el, 2020 encontraron la familia de los sitios de unión del factor de transcripción (TFBS) donde los más sobre-expresados fueron V\$E2FF, V\$EGRF, V\$KLFS, V\$NRF1, V\$MAZF, V\$SP1F, V\$ZF02, V\$ZF5F (**Figura 6**). Se ha reportado que dichos TFBS participan en procesos biológicos como el crecimiento celular, proliferación, diferenciación, desarrollo, inflamación, tumorigénesis, etc. Particularmente a V\$NRF1 se le considera un regulador maestro de genes que codifican proteínas mitocondriales (Zinghirino *et al*, 2020).

**Figura 6**

*Familia de los sitios de unión del factor de transcripción*



*Nota.* El histograma muestra cada familia TFBS encontrada en las secuencias de los promotores VDAC que fueron predichas por el software MatInspector (Genomatix v3.10) y validadas experimentalmente por datos ChIP-Seq (proyecto ENCODE v3). P<sub>VDAC1</sub>, promotor de VDAC1; P<sub>VDAC2</sub>, promotor de VDAC2; P<sub>VDAC3</sub>, promotor de VDAC3. Tomado de Zinghirino *et al*, 2020.

En relación con los TFBS que se unen a sitios específicos para cada gen de VDAC (Tabla 2), se encontraron 4 familias para VDAC1 que se han relacionado con funciones necesarias como respuesta celular a la hipoxia, reguladores de la biogénesis mitocondrial, estrés celular, reguladores del desarrollo, supervivencia, invasión y proliferación celular.

Para VDAC2 se identificaron 7 TFBS relacionados con el desarrollo del sistema nervioso, control del crecimiento celular, etc.

Finalmente, los TFBS de VDAC3 se conoce que cumplen funciones celulares como diferenciación celular, proliferación, apoptosis, gametogénesis, regulación del desarrollo, organogénesis, metabolismo y homeostasis celular, así como importantes funciones en la tumorigénesis.

**Tabla 2**

*Sitios de unión a factores de transcripción únicos para cada gen de VDAC.*

---

**Sitios de unión al factor de transcripción**

---

**VDAC1** V\$AHRR V\$ETSF V\$HEATT V\$PBXC

**VDAC2** V\$BEDF V\$BRAC V\$CLOX V\$MEF3 V\$NEUR O\$TF2B V\$ZFY

**VDAC3** V\$BCL6 V\$CDXF V\$FOX V\$SOHLH V\$HMG V\$HOMF V\$IRFF V\$LBXF V\$MYBL V\$MAD V\$XBBF

---

*Nota.* Tomado de Zinghirino *et al*, 2020

Es por ello que la importancia de centrarnos en la familia de proteínas de VDAC en este trabajo radica en que, hasta la fecha, no se cuenta con suficiente información sobre el nivel de expresión basal de las isoformas de VDAC en el NB.

Por lo tanto, proponemos averiguar, primero, la expresión basal de las tres isoformas de VDAC sobre células de NB SK-N-SH, ya que hasta el momento no se ha reportado la expresión de VDAC2 y VDAC3 y, posteriormente, elucidar si el tratamiento con Casiopeína® IIIa tendrá algún efecto en la expresión de VDAC1, VDAC2 y VDAC3.

### **3.- OBJETIVOS**

#### Objetivo general

Determinar el efecto de la Casiopeína® IIIa sobre la expresión de las isoformas de *VDAC* en células SK-N-SH.

#### Objetivos específicos

- Determinar la expresión de las isoformas de *VDAC* en células de NB tratadas con Casiopeína® IIIa.
- Evaluar la funcionalidad de las isoformas de *VDAC* en el NB.
- Cuantificar la presencia de EROs en las isoformas de *VDAC*.
- Determinar la presencia de apoptosis en nuestro modelo.

#### **4.- METODOLOGIA**

##### **Cultivo de la línea celular de NB humano SK-N-SH**

Se realizó la expansión de la línea celular de NB humano SK-N-SH en Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO US), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 100 U/ml de estreptomicina y penicilina (1:1). Las células se mantuvieron en una incubadora de CO<sub>2</sub> en condiciones estándar de cultivo a 37°C y humedad constante.

##### **Tratamiento con Cisplatino y Casiopeína® Illia**

Las líneas celulares de NB fueron tratadas con 37 µg/mL de Cisplatino o 31 µg/mL de Casiopeína® Illia durante 4 horas (García-Ramos *et al*, 2017)

##### **Determinación de la expresión de las isoformas de VDAC mediante qPCR**

###### **1.- Extracción de RNA**

Se colectaron 5x10<sup>6</sup> células, se centrifugaron a 3,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente (TA). Posteriormente se agregó 1 mL de TRIreagent® (Sigma-Aldrich, Missouri, US), se mezclaron en vórtex y se centrifugaron a 14,000 rpm x 1 min a TA, se tomó el sobrenadante y se colocó en un tubo eppendorf. Después se agregó 1 mL de etanol y se mezcló. Seguidamente se tomó el total del volumen y se colocó en la columna del kit Direct-Zol RNA miniprep (Zymo Research, CA,US), se centrifugó a 14,000 rpm x 1 min a TA y se desechó el sobrenadante.

Posteriormente se agregó 400 µL de RNA prewash del kit Direct-Zol RNA miniprep (Zymo Research, CA, US) a la columna. Se centrifugó a 14,000 rpm por 1 min a TA y se desechó el sobrenadante. Este paso se realizó por duplicado.

Seguidamente se añadieron 700 µL de Wash Buffer del kit Direct-Zol RNA miniprep (Zymo Research, CA,US) por las paredes, se centrifugó a 14, 000 rpm por 1 min a TA.

Después, en los tubos donde se almacenó el precipitado, se colocó la columna y se agregaron 50  $\mu$ L agua libre de RNAsa y DNAsa; se centrifugó a 14,000 rpm por 1 min a TA y finalmente se guardó a -80°C hasta su cuantificación.

La evaluación de la pureza, integridad y cuantificación del mRNA se realizó en un espectrofotómetro Nanodrop™ One (Thermofisher, Massachusetts, US) (**Tabla 3**).

**Tabla 3**

*Cuantificación de RNA de la línea celular SK-N-SH en cada condición experimental.*

<b>Cuantificación de RNA</b>			
	Concentración ng/ $\mu$ l	A260/A180	A260/A230
SK-N-SH sin tratamiento	645.5	2.09	2.33
SK-N-SH Cisplatino	470.5	2.01	2.24
SK-N-SH Casiopeína® Illia	257.8	2.02	2.43

*Nota.* La relación de absorbancia A260/280 (Ratio de proteínas/ RNA o DNA) con un valor cercano a 2.0 es indicativo de un RNA de pureza óptima.

## 2.- Obtención del cDNA

Para obtener el cDNA a partir del mRNA, se realizó una transcripción inversa mediante el Kit High capacity cDNA reverse transcription (Applied Biosystems, CA, US). Para ello, primeramente se preparó la Master mix con los siguientes componentes: 10x RT Buffer, 25 $\times$  dNTP Mix, 10 $\times$  RT Random Primers, MultiScribe™ Reverse Transcriptase y Nuclease-free H<sub>2</sub>O. A cada tubo se le agregó 10  $\mu$ L de Master mix, 1  $\mu$ g de RNA y lo restante de agua libre de nucleasas para ajustar los 20  $\mu$ L de cada reacción.

Posteriormente se llevó al termociclador (1000 Thermalcycler de BIO-RAD) programando los siguientes tiempos y temperaturas:

- 25°C por 10 min.
- 37°C por 120 min.
- 85°C por 5 min.
- 4°C por tiempo indefinido.

La evaluación de la pureza y cuantificación del cDNA (ratos 260/280 y 260/230 cercanos a 2.0) se realizó en un termociclador Nanodrop™ One (ThermoFisher, Massachusetts, US) (**Tabla 4**).

**Tabla 4**

*Cuantificación del cDNA de la línea celular SK-N-SH de cada condición experimental.*

<b>Cuantificación de cDNA</b>			
	Concentración ng/μl	Relación A260/A180	Relación A260/A230
SK-N-SH sin tratamiento	1880.4	1.92	2.53
SK-N-SH Cisplatino	1995.6	1.92	2.53
SK-N-SH Casiopeína®			
Illia	1935.3	1.92	2.53

*Nota.* La relación de absorbancia A260/280 (Ratio de proteínas/ RNA o DNA) con un valor cercano a 2.0 es indicativo de un RNA de pureza óptima.

### 3.- PCR punto final (estandarización de los primers)

Para llevar a cabo la PCR punto final se usó el kit Pushion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo-Scientific, No. Cat: F548S). Para ello primeramente se preparó la Master mix con los siguientes componentes: H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (Sigma Aldrich, No. Cat: SAW4502-1L), 2X Phusion Flash PCR Master Mix, Template DNA. Posteriormente en un tubo se agregó 1 μL de cada primer (Tabla 4) y 18 μL del Master mix.

Seguidamente se llevó al termociclador (1000 Thermalcycler de BIO-RAD) programando los siguientes tiempos y temperaturas:

- Desnaturalización inicial 98°C por 10 seg.
- Desnaturalización 98°C por 1 seg.
- Alineamiento 60°C por 5 seg.
- Extensión 72°C por 15 seg.
- Extensión final 72°C por 60 seg.
- Hold 4°C por tiempo indefinido.

Para visualizar los amplicones producto de la PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR SAFE DNA GEL STAIN (Thermo Scientific, No. Cat: S33102), que se corrió en Tris-Borato-EDTA (TBE) (1x). Se agregaron 7 µL de DNA de cada gen, utilizando como marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogene, No. Cat: 15628019) y se sometió a una corriente eléctrica de 60V por 30 min. Finalmente se visualizó bajo radiación UV en el fotodocumentador ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-rad, Ca., EUA).

#### 4.- PCR tiempo real

La PCR semi-cuantitativa se realizó en una mezcla de reacción de 25 µL utilizando los tubos de MicroAmp™ Fast 8-Tube strip, 0.1 mL (Applied Biosystems, No. Cat: 4358293), que contenían 10 µL de Green/ROX qPCR Master Mix (ThermoFisher, No. Cat: FS-FERK0221, Massachusetts, USA) y 10 pmol de cada primer, en un termociclador Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Las condiciones de los ciclos fueron: desnaturalización a 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 s, 60°C durante 30 s y 72°C durante 30 s.

Los niveles de expresión génica fueron obtenidos mediante el análisis comparativo del ciclo umbral de (Ct), con la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Los primers que se utilizaron se muestran en la **Tabla 5**, *VDAC2* fue tomado de De pinto *et al*, 2010; mientras que *VDAC1* y *VDAC3* fueron diseñados usando el protocolo de PrimerBLAST, así como del gen constitutivo *RPL32*.

**Tabla 5**

*Primers de cada isoforma de VDAC para la qPCR*

Isoforma	FW Primers	REV Primers
<i>VDAC1</i>	ATGGCTGTGCCACCCACGTATG	ACCCTGTCTTGATTTTAGCA
* <i>VDAC2</i>	CCTTGGTTGTGATGTTGACTTTGA	CTGATGTCCAAGCAAGGTTTACTG
<i>VDAC3</i>	ACGGGATTGTTTTAGTGTTG	CTCCAGTTCAAATCCCAAGC
<i>RPL32</i>	AAGGGCCAGATCTTGATGCC	GCATTGGGGTTGGTGACTCT

*Nota.* Tomado de De pinto *et al*, 2010\*. Fw (Forward), Rev (Reverse).

### **Evaluación de retención de calcio mitocondrial ( $mCa^{2+}$ ) mediante espectrofluorimetría**

Previo a realizar el ensayo de retención de calcio se llevó a cabo la inhibición de VDAC mediante la exposición de las células, durante 1 hora, al inhibidor farmacológico DIDS (ácido 4,4'-diisotiociano-2,2'-estilbenodisulfónico) (300  $\mu$ M) (Sigma Chemical Co®, Saint Louis Missouri, MO, USA).

Posteriormente, se realizó el ensayo de retención de  $mCa^{2+}$  por medio del reactivo Fura-2-AM (éster acetoximatpílico FluoroPure grade-Special Packaging) (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU). Para el aislamiento mitocondrial por centrifugación, las células se lavaron con PBS 1X, se añadió tripsina para despegar las células y se centrifugó a 2,000 rpm por 10 min para recuperar el sobrenadante. El sobrenadante se resuspendió en un 1 ml de PBS 1X, se contaron las células, se centrifugó a 700 rpm por 10 min, se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min para posteriormente resuspender en un 1ml de PBS 1X. Seguidamente, las muestras se incubaron durante 1 h con Fura-2AM a TA en oscuridad. La retención de  $mCa^{2+}$  se cuantificó mediante la detección de fluorescencia de excitación y emisión máxima a 340/380 nm en un detector de fluorescencia de microplacas Varioskan Flash (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU).

### **Determinación de EROs mediante espectrofluorimetría**

Las concentraciones de peróxido de hidrógeno 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 de NB se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos salino (PBS) 1X y se incubó con la mezcla de reacción (50  $\mu$ M de AmplexRed®) más 0.1  $\mu$ /ml de HRP, durante 30 min, en ausencia de luz.

Los niveles de superóxido se detectaron 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 EROs 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).

### **Determinación de Anexina V mediante citometría de flujo**

Partiendo de cultivos celulares con una confluencia de  $1 \times 10^5$  células/mL, se utilizó tripsina para cosechar el contenido celular para ser centrifugado a 2,500 rpm por 10 min a TA. Después se realizó un lavado con PBS para eliminar restos del medio en las células. Una vez lavado el contenido celular, se agregaron 100 µL del reactivo Annexin V & Dead Cell Muse™ (Luminex, Complexity simplified, Austin, TX, USA) a cada tubo para teñir células apoptóticas durante 20 min a TA en la oscuridad. Después del periodo de incubación, el contenido celular ya teñido se leyó en el citómetro de flujo MUSE cell analyzer para su análisis.

### **Análisis estadístico**

Todos los análisis estadísticos se realizaron con paquetería estándar del lenguaje de programación R y las gráficas se realizaron con la librería “ggplot2” de Bioconductor. Cuando fue necesario comparar entre grupos experimentales, las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) se calcularon usando la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, corrigiendo el valor de FDR (False Discovery Rate) a 0.05 con el método Benjamin-Hochberg.

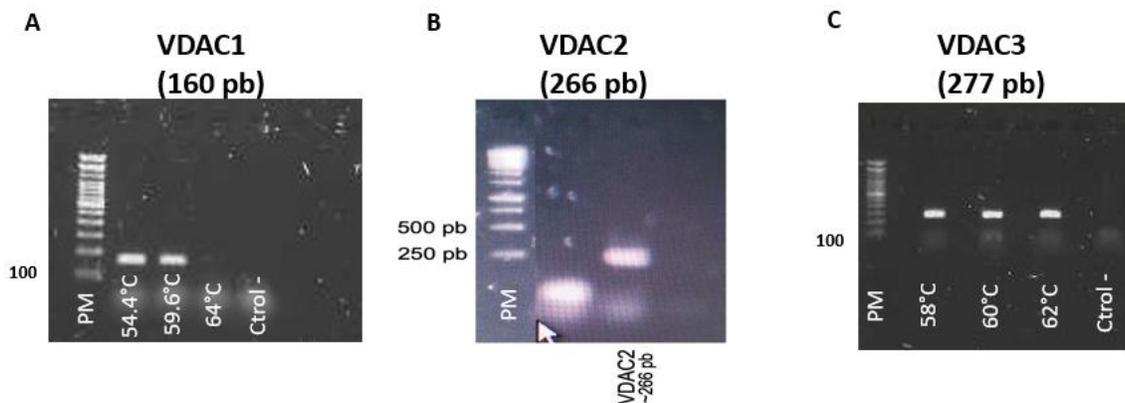
## 5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### PCR punto final

Para la estandarización de los primers se llevó a cabo la PCR punto final, se realizaron pruebas para confirmar la temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) óptima. En el caso de *VDAC1* se realizó una curva de  $T_m$  en donde se encontró la presencia del amplicón de *VDAC1* a las temperaturas de 54.4°C y 59.6°C, con un tiempo de extensión de 30 seg (**Figura 7A**). Para el caso de *VDAC2* no fue necesario realizar una curva de  $T_m$ , ya que se encontró la presencia del amplicón de este gen a una  $T_m$  de 60°C (**Figura 7B**). En relación a *VDAC3*, también se realizó una curva de  $T_m$  y como se observa, los resultados indicaron la presencia de dicho gen a las  $T_m$  de 58°C, 60°C y 62°C, pero con un tiempo de extensión de 15 seg (**Figura 7C**); todo lo anterior en la línea celular SK-N-SH. Debido a los resultados observados, para las tres isoformas de VDAC, se eligió la  $T_m$  de 60°C.

**Figura 7**

*PCR punto final. Estandarización de los primers utilizados en la línea celular SK-N-SH*



*Nota.* A) Muestra la curva de  $T_m$  de VDAC1; B) Amplicón de VDAC2 a 60°C; C) Curva de  $T_m$  de VDAC3. PM: Peso molecular. PB: Pares de base.

### qPCR (PCR Cuantitativa)

Posterior a la estandarización de las condiciones de amplificación, se llevó a cabo la qPCR en la línea celular SK-N-SH, en donde se obtuvo la media del Ct del gen constitutivo *RPL32*, la cual fue de  $23.44 \pm 0.14$  en la condición sin tratamiento, en el grupo tratado con Cisplatino de  $23.55 \pm 0.05$  y finalmente en el grupo con Casiopeína® Illia fue de  $23.80 \pm 0.12$  (**Figura 8**). Estos resultados indican que la expresión de *RPL32* parece ser estable tal y como se esperaba, por lo que se considera un gen de referencia adecuado, ya que presenta un nivel de expresión constante en las diferentes condiciones de trabajo.

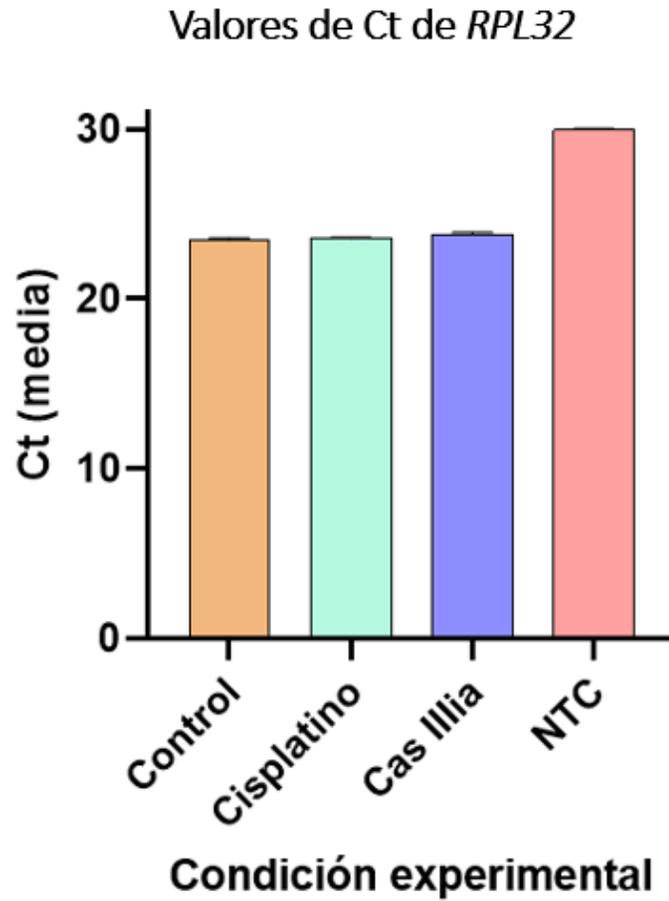
Para el caso de *VDAC1* (**Figura 9**), observamos que no hay diferencias entre las medias de Ct bajo las diferentes condiciones experimentales (sin tratamiento  $29.54 \pm 0.55$ ; Cisplatino  $29.09 \pm 0.14$ ; Casiopeína® Illia  $29.19 \pm 0.20$ ).

En lo que respecta al gen de *VDAC2* (**Figura 10**), los resultados muestran que no hay diferencias entre las medias de los Ct de la condición control ( $20.77 \pm 0.05$ ) con respecto al grupo tratado con Cisplatino ( $20.76 \pm 0.05$ ); a diferencia de lo que se obtuvo con el grupo tratado con Casiopeína® Illia ( $22.79 \pm 0.30$ ), lo que indica que el gen se expresa menos, con respecto al control positivo.

Finalmente, con *VDAC3* (**Figura 11**) se obtuvo una media de Ct similar en los grupos sin tratamiento ( $21.56 \pm 0.20$ ) y con Cisplatino ( $21.88 \pm 0.47$ ), mientras que el grupo con Casiopeína® Illia mostró un ligero aumento ( $22.94 \pm 0.24$ ), indicativo de una menor cantidad de DNA correspondiente al gen.

**Figura 8**

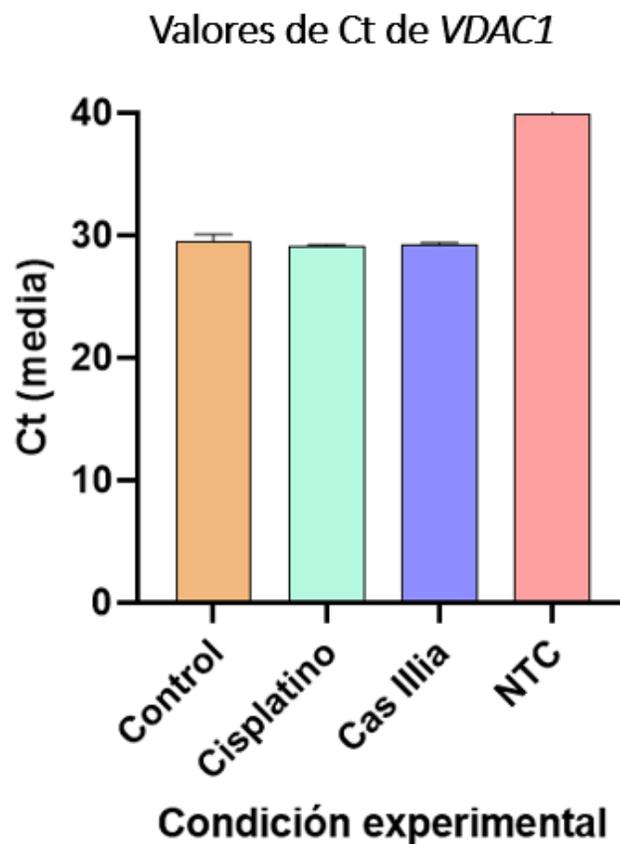
Media del Ct del gen de referencia en la línea celular SK-N-S-N



*Nota.* En el eje de las "X" se observa la condición experimental: grupo sin tratamiento, tratado con Cisplatino y Casiopeínas IIIa, y en el eje de las "Y" se muestra la media de Ct.

**Figura 9**

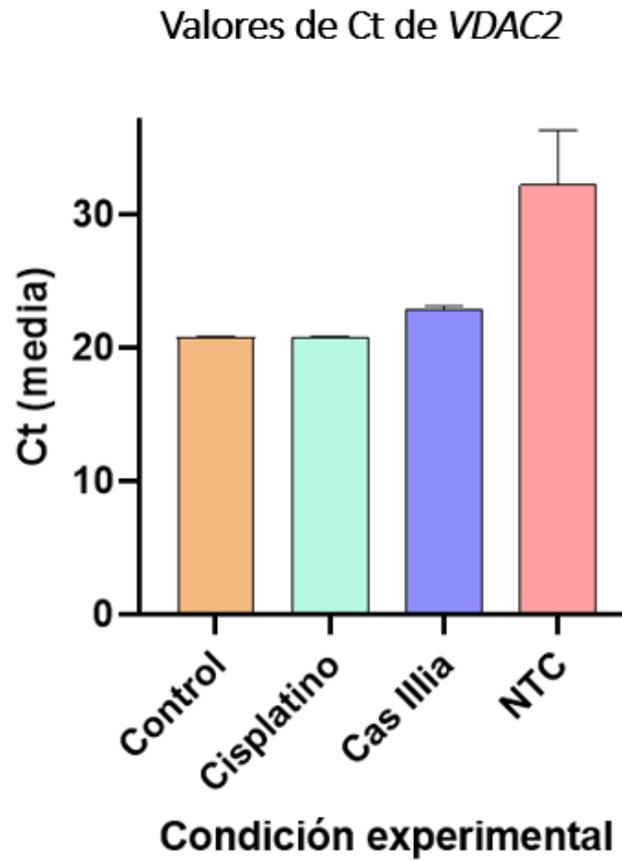
*Media del Ct de VDAC1 en la línea celular SK-N-S-N*



*Nota.* En el eje de las "X" se observa la condición experimental: grupo sin tratamiento, tratado con Cisplatino y Casiopeínas IIIa, y en el eje de las "Y" se muestra la media de Ct.

**Figura 10**

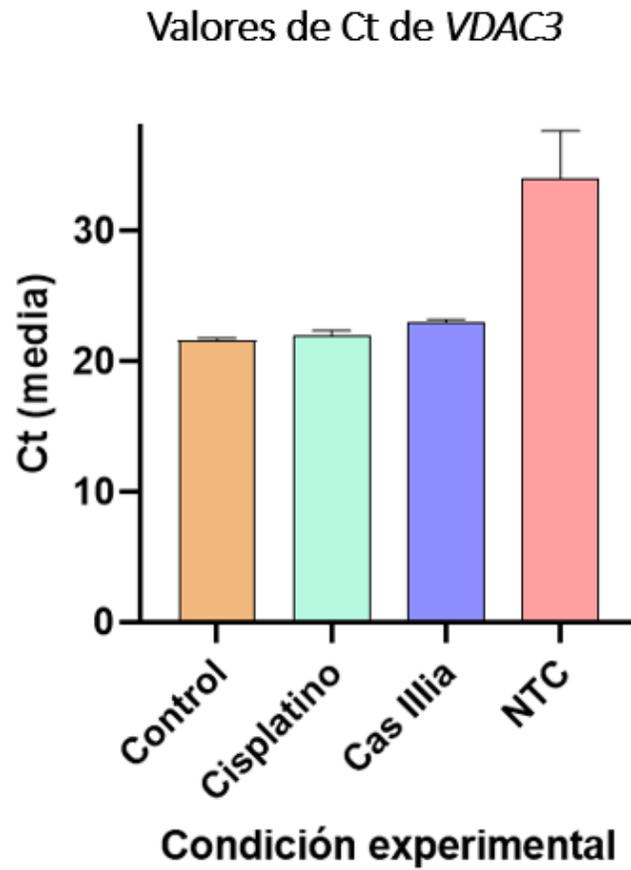
*Media del Ct de VDAC2 en la línea celular SK-N-S-N*



*Nota.* En el eje de las "X" se observa la condición experimental: grupo sin tratamiento, tratado con Cisplatino y Casiopeína® Illia, y en el eje de las "Y" se muestra la media de Ct.

**Figura 11**

Media del Ct de VDAC3 en la línea celular SK-N-S-N

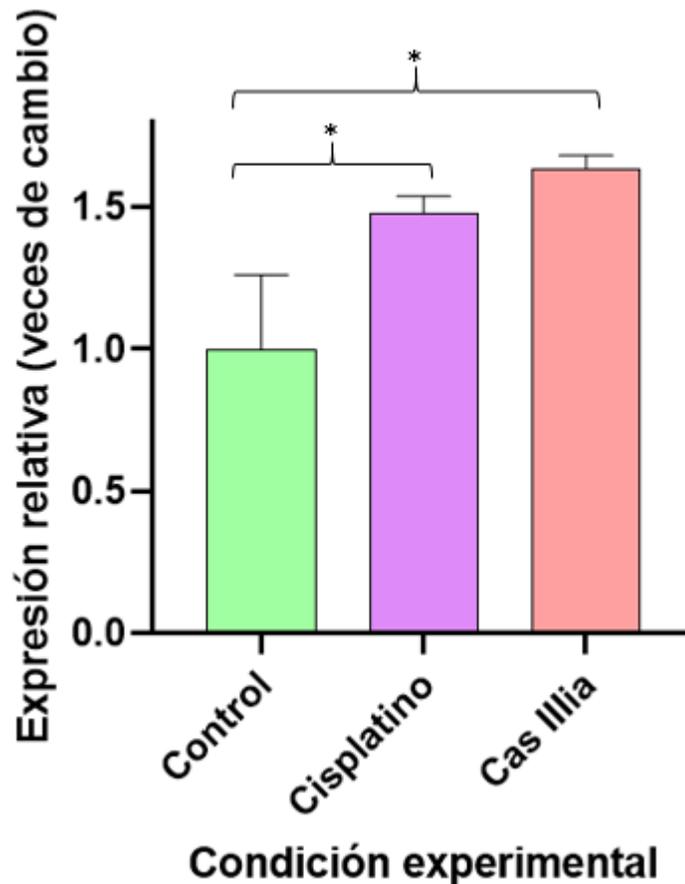


*Nota.* En el eje de las "X" se observa la condición experimental: grupo sin tratamiento, tratado con Cisplatino y Casiopeína® Illia, y en el eje de las "Y" se muestra la media de Ct.

Con los datos de qPCR obtenidos, se realizó el análisis comparativo del Ct, con la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , para determinar los cambios en la expresión génica respecto al gen de referencia. Los resultados obtenidos indican que la Casiopeína® IIIa induce una sobreexpresión de *VDAC1* (**Figura 12**), pues esta se encuentra por encima del 60% con respecto al control, siendo un patrón similar a lo que sucede con el Cisplatino, donde hay una elevación importante de la expresión de este gen, casi mayor al 50% con respecto al control, ambos resultados fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ). También se observa una sobreexpresión de *VDAC1* (aproximadamente un 10%) con Casiopeína® IIIa, con respecto al Cisplatino. De acuerdo a lo reportado en la literatura, se podría inferir que *VDAC1* está involucrado de manera importante en el mecanismo de acción de las Casiopeínas®, específicamente a través de la apoptosis mediante la formación del mPTP, que al interactuar con BAX permite la salida de CYT C y con ello la inducción de apoptosis (Shimizo *et al*, 2010). En un estudio reportado por Tajeddine y colaboradores, se observó que al silenciar *VDAC1* en la línea celular A549 previamente tratada con Cisplatino, se redujo significativamente la apoptosis, ya que se encontró una disminución de la caspasa-3 escindida y de EROs, actuando de esta manera como un citoprotector. Por lo que a *VDAC1* se le considera un mediador importante de la apoptosis inducida por el Cisplatino. También se observó que al inhibir *VDAC1* no hubo activación de BAX pero si de BAK, esto indica que BAX podría estar actuando de manera dependiente de *VDAC1*. (Tajeddine *et al*, 2008). Es por ello que se podría inferir que la expresión génica observada en dichos resultados, tanto en el grupo tratado con Cisplatino como con Cas IIIa, podría estar llevando a una sobre-expresión proteica de *VDAC1* lo que sería importante para nuestro modelo de estudio ya que esto conduciría a apoptosis.

**Figura 12**

Expresión génica de *VDAC1* en células de Neuroblastoma SK-N-SH mediante PCR semi-cuantitativa (qPCR)



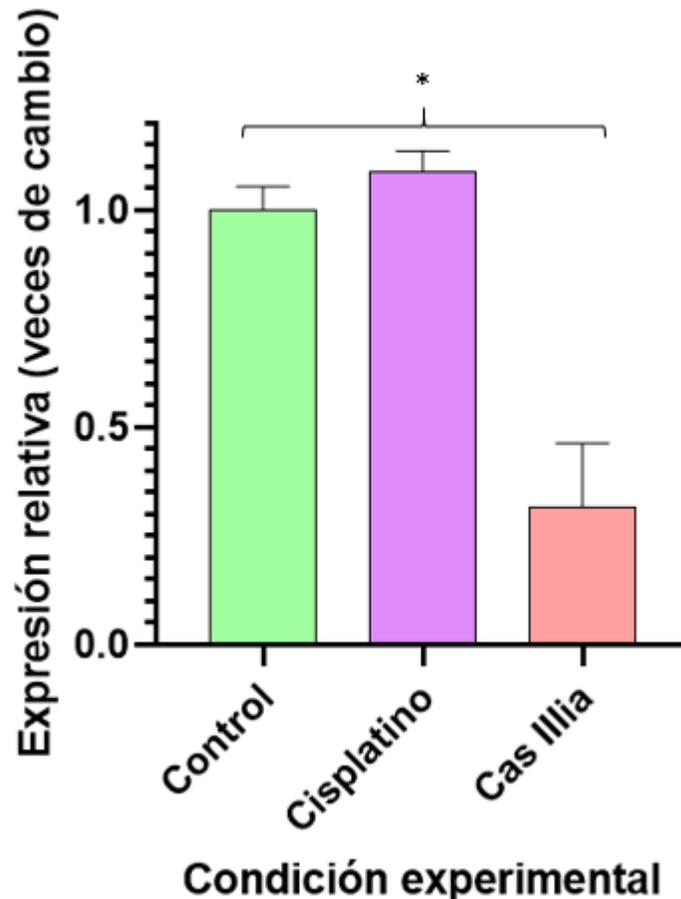
*Nota.* El eje de las “X” muestra la condición experimental y en el eje de las “Y” se observa la expresión relativa en veces de cambio. N=3, prueba de t de dos colas. \*p<0.05

En cuanto a la expresión génica de *VDAC2* (**Figura 13**), se puede observar que el grupo tratado con Cisplatino actúa de manera similar que el control, ya que solo se observa un aumento de aproximadamente 10%. Cuando las células fueron tratadas con Casiopeína® IIIa, se observó una disminución de aproximadamente un 70% en la expresión génica respecto al control (p<0.05). Por lo tanto, se podría inferir que, como no hay suficiente *VDAC2* que arreste a BAK (Mazure, 2017), *VDAC2* no ejercería su función antiapoptótica lo que favorecería la apoptosis. Sin embargo, tal y como se reporta en la literatura, *VDAC2* también puede tener la

función proapoptótica al interactuar con BAX (Zhengyuan et al, 2021). Por lo tanto, sería interesante estudiar si VDAC2 está interactuando a través de la unión con BAK o BAX.

**Figura 13**

*Expresión génica de VDAC2 en células de Neuroblastoma SK-N-SH mediante PCR semi-cuantitativa (qPCR)*



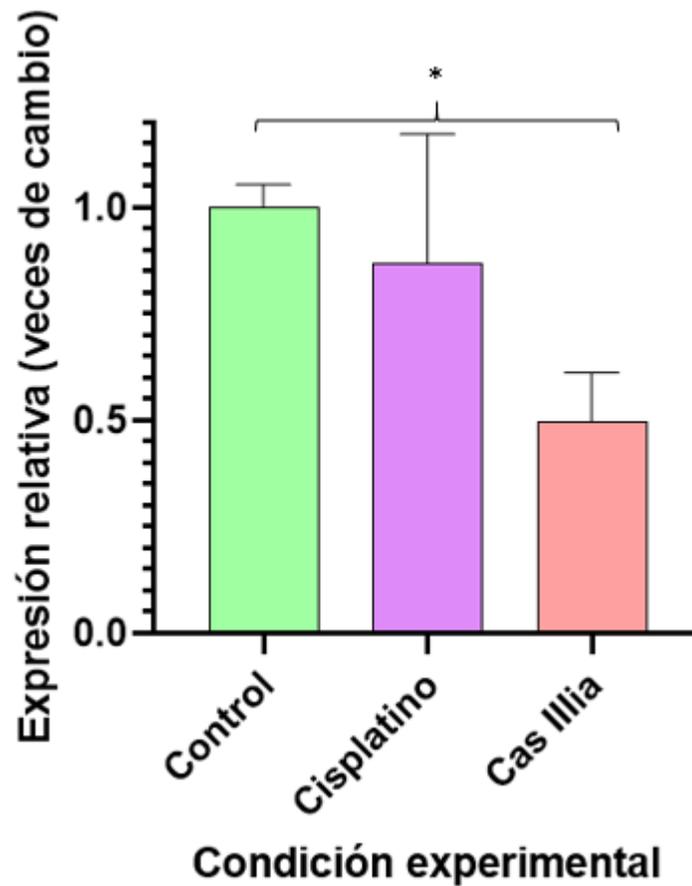
*Nota.* El eje de las "X" muestra la condición experimental y el eje de las "Y" la expresión relativa en veces de cambio. N=3, prueba de t de dos colas.  
\*p<0.05.

Por último, la Casiopeína® IIIa (**Figura 14**) induce una sub expresión de alrededor del 50% con respecto a las condiciones control (p<0.05) y al tratamiento con Cisplatino (12%). Por lo que se podría deducir que la Casiopeína® IIIa estaría induciendo apoptosis al disminuir la expresión de VDAC3, ya que como se ha reportado VDAC3 es un regulador del estrés mitocondrial, por lo provocaría un

aumento de EROs y una despolarización del potencial de membrana mitocondrial, lo que conduciría a la muerte celular por la vía mitocondrial (Reina *et al*, 2022).

**Figura 14**

*Expresión génica de VDAC3 en células tratadas con Cisplatino y Casiopeína® IIIa mediante PCR semi-cuantitativa (qPCR)*



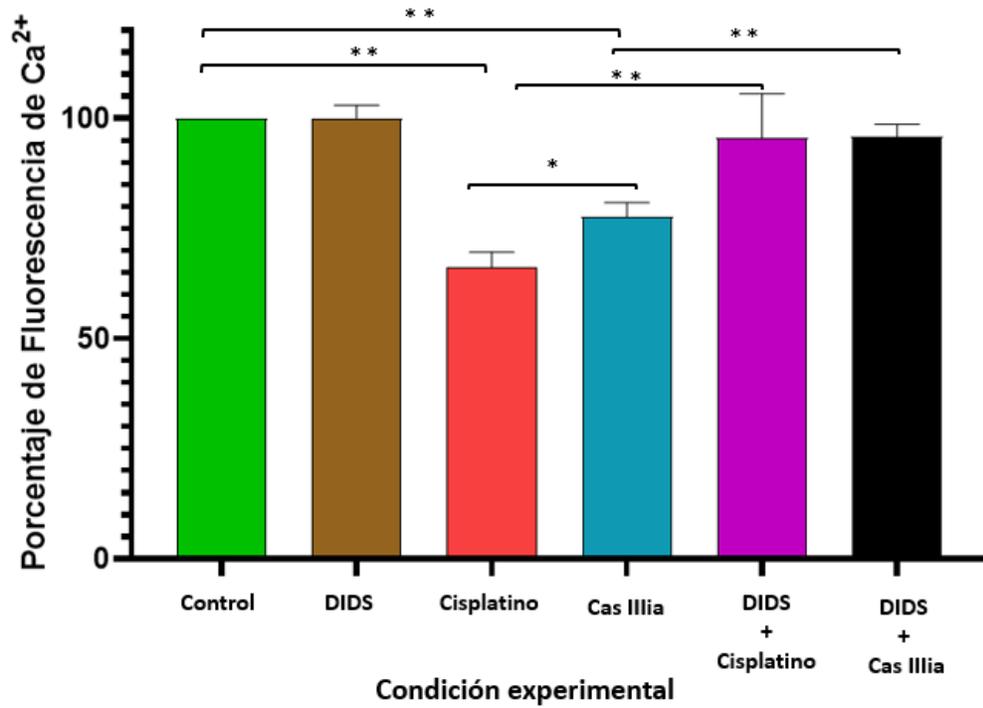
*Nota.* En el eje de las "X" se muestra la condición experimental y mientras que el eje de las "Y" muestra la expresión relativa en veces de cambio. N=3, prueba de t de dos colas. \*p<0.05.

### Evaluación de retención de calcio mitocondrial

Como se observa en la **Figura 15**, el grupo que fue tratado con el inhibidor DIDS no mostró una caída del porcentaje  $mCa^{2+}$ . Esto se debe a que se ha demostrado que DIDS inhibe la oligomerización de la proteína proapoptótica VDAC1, lo que impide la salida  $mCa^{2+}$  (Ben-Hail *et al*, 2016). Lo contrario se observa en las células que fueron tratadas con Cisplatino y Casiopeína® IIIa, donde hubo una caída en el porcentaje de  $mCa^{2+}$ , comparado con el grupo control y con el grupo tratado con DIDS, donde la diferencia observada fue estadísticamente significativa ( $p=0.0001$ ). Esto puede deberse a que ambos fármacos tienen un efecto pro-oxidante provocando una disminución del glutatión intracelular, lo que posteriormente llevará a la baja de glutatión mitocondrial, con un aumento de EROs. Esto conduce a una disfunción mitocondrial que permite el aumento de la permeabilidad mitocondrial y con ello la salida de  $mCa^{2+}$  (Kachadourian *et al*, 2010). En lo que respecta a los grupos con DIDS+Cisplatino y DIDS+Casiopeína® IIIa, se puede observar (**Figura 15**) una ligera disminución respecto al grupo control y al grupo con DIDS solo ( $p>0.05$ ). En el caso del grupo DIDS+Cisplatino, dicho resultado puede estar respaldado por un estudio llevado a cabo por Ben-Hail & colaboradores en el 2016, donde demostraron que DIDS inhibía la oligomerización de VDAC1 inducida por Cisplatino. Esto fue realizado en la línea celular de neuroblastoma SH-SY-5Y, por lo que tampoco permite la liberación de  $mCa^{2+}$  tal y como se observó en nuestros resultados, ya que no se encontró una disminución significativa en el porcentaje de  $mCa^{2+}$ . En nuestro ensayo obtuvimos un mayor porcentaje de  $mCa^{2+}$  en las células con Casiopeína® IIIa en comparación con el Cisplatino ( $p<0.05$ ). Por otra parte, se puede observar una diferencia significativa en la capacidad de retención de  $mCa^{2+}$  en las células con Cisplatino en relación al grupo con DIDS+Cisplatino ( $p<0.0001$ ). Algo similar sucede con las células a las que se les añadió Casiopeína® IIIa, donde se logra observar una disminución de  $mCa^{2+}$  en relación a las células a las que se les agregó el inhibidor DIDS+Casiopeína® IIIa. Aquí la diferencia observada es significativa ( $p<0.0001$ ), lo que indica que el inhibidor es suficiente para evitar la salida de  $mCa^{2+}$  independientemente de los tratamientos.

**Figura 15**

*Retención de mCa<sup>2+</sup> en células de NB tratadas con Cisplatino, Casiopeína® IIIia y con el inhibidor DIDS*



*Nota.* En el eje de las "X" se muestran las diferentes condiciones experimentales y en el eje de las "Y" el porcentaje de fluorescencia. N=3, prueba de t. \*p<0.05, \*\*p<0.001

## 6.- CONCLUSIONES

Con los ensayos realizados, se determinó la expresión de *VDAC1*, *VDAC2* y *VDAC3* en células de SK-N-SH. Cabe resaltar que dicho resultado es muy importante, ya que hasta la fecha no se ha reportado la expresión de *VDAC2* y *VDAC3* en neuroblastoma. También se demostró que la Casiopeína® IIIa provoca la sobreexpresión de *VDAC1* induciendo la apoptosis, lo que indica que esta isoforma es un componente importante del mPTP. Referente a *VDAC2*, cuya función es antiapoptótica, los resultados muestran que la Casiopeína® IIIa provoca la subexpresión de esta isoforma por lo que su ausencia podría contribuir al proceso apoptótico.

También se comprobó que la expresión de *VDAC3* se ve disminuida cuando las células son tratadas con Casiopeína® IIIa, por lo que su acción puede darse mediante la inducción de estrés oxidativo y, con ello, conducir a apoptosis.

En conclusión, esta investigación arroja datos que afirman que la Casiopeína® IIIa tiene un impacto diferencial en la expresión de las isoformas de *VDAC*, lo que podría inducir la apoptosis, lo que representa un nuevo enfoque terapéutico para el neuroblastoma más efectivo y menos tóxico que el Cisplatino.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alemón, R., Breña, M., Muñoz, J., Gracia, M., & Ruiz, L. (2007). Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas). *Cancer Chemother Pharmacol*, *60*, 219-228. doi:10.1007 / s00280-006-0364-9
- Amodeo, G., Scorciapino, M., Messina, Á., De Pinto, V., & Ceccarelli, M. (2014). Charged Residues Distribution Modulates Selectivity of the Open State of Human Isoforms of the Voltage Dpendent Anion-selectiveChannel. *Plos one*, *9*(8). doi: 10.1371 / journal.pone.0103879
- Baines, C., Kaiser, R., Sheiko , T., Craigen, W., & Molkenin, J. (2007). Voltage dependent anion channels are dispensable for mitochondrial dependent cell death. *Nature cell biology*, *9*(5), 550-561. doi:10.1038 / ncb1575
- 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. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.04.002
- Camara, A., Zhou, Y., Wen, P.-C., Takhorshid, E., & Kwok, W.-M. (2017). Mitochondrial VDAC1: A Key Gatekeeper as Potential Therapeutic Target. *Frontiers in Physiology*, *8*(460). doi:https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00460
- Carvallo, F., Trejo, C., Gómez, C., Rodríguez , E., Macías, L., Cortés, E., . . . Constantino, F. (2008). Casiopeina III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *Biometals*, *21*, 17-28. doi:10.1007/s10534-007-9089-4
- Chin, H., Li, M., Ninnis, R., Reljic , B., Scicluna, K., Dagley, L., . . . Dewson, G. (2018). VDAC2 enables BAX to mediate apoptosis and limit tumor development. *Nat Commun*, *9*(4976). doi:https://doi.org/10.1038/s41467-018-07309-4
- Cohn, S. L., Pearson, A., London, W. B., Monclair, T., Ambros, P. F., Brodeur, G. M., . . . Matthay, K. (2009). The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System: An INRG Task Force Report. *Journal of clinical Oncology*, *27*(2), 289-297. doi:10.1200/JCO.2008.16.6785
- Dasari, S., & Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, *740*, 364-378. doi:10.1016 / j.ejphar.2014.07.025
- De pinto, V., Guarino, F., Guarnera, A., Messina, A., Reina, S., Tomasello, F., . . . Mazzoni, C. (2010). Characterization of human VDAC isoforms: A peculiar

function for VDAC3? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797, 1268-1275.  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabbio.2010.01.031>

- Erturgrul, M. S., Nadaroglu, H., Nalci, O. B., Hacimuftuoglu, A., & Alayli, A. (2020). Preparation of CoS nanoparticles-cisplatin bio-conjugates and investigation of their effects on SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Cytotechnology*, 72(6), 885-896. doi:10.1007/s10616-020-00432-5
- Galindo-Murillo, R., García-Ramos, J., Ruiz-Azuara, L., Cheatham, T., & Cortés-Guzmán, F. (2015). Intercalation processes of copper complexes in DNA. *Nucleic Acids Research*, 11, 5364-5376. doi:10.1093/nar/gkv467
- García-Ramos, J. C., Gutiérrez, G. A., Vázquez-Aguirre, A., Toledano-Magaña, Y., Alonso-Sáenz, A. L., Gómez-Vidales, V., . . . Ruíz-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. doi:10.1007/s10534-016-9983-8
- Gracia, I., Ruíz, L., Gómez, C., Tinoco, M., Márquez, A., Romero, L., . . . Bravo, M. (2001). Knighth's move in the periodic table, from copper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, Casiopeínas, evaluated by an in vitro human and murine cancer cell line panel. *Metal based drugs*, 8(1), 19-28. doi:10.1155 / mbd.2001.19
- Gutiérrez, A., Vázquez, A., García, J., Flores, M., Hernández, E., Ruiz, L., & Mejía, C. (2013). Copper (II) mixed chelate compounds induce apoptosis through reactive oxygen species in neuroblastoma cell line CHP-212. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 126, 17-25.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.05.001>
- Jaime-Martínez, L., Martínez-Pacheco, M. L., Ruiz-Azuara, L., & Mejía, C. (2022). BAX But Not BCL2 Is Necessary for Apoptosis in Neuroblastoma Cells Treated With Casiopeína® IIIa. *Anticancer Research*, 42(2), 885-892. doi:10.21873/anticancer.15546
- Kachadourian, R., Brechbuhl, H., Ruiz-Azuara, L., Gracia-Mora, L., & Day, B. J. (2010). Casiopeína II-gly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. *Toxicology*, 3, 176-183. doi:10.1016/j.tox.2009.12.010
- Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *American Physiological Society*, 87, 99-163. doi:10.1152/physrev.00013.2006.
- Marín, Á., Gallardo, J., López, S., Donato, J., Rodríguez, J., Ruíz, L., . . . Rodríguez, S. (2012). Casiopeína II-gly and bromo-pyruvate inhibition of tumor hexokinase, glycolysis, and oxidative phosphorylation. *Cellular and*

*Molecular Life Sciences*, 83, 753-766. doi:<https://doi.org/10.1007/s00204-012-0809-3>

- Marín, A., García, J., Ruíz, L., & Carrillo, E. (2016). Investigation on the self-association of an inorganic coordination compound with biological activity (Casiopeína III-a in aqueous solution. *Chemistry Central Journal*, 10(65). doi:10.1186/s13065-016-0213-9
- Maris, J. (2012). Recent Advances in Neuroblastoma. *New England Journal of Medicine*, 362(23), 2202-2211. doi:10.1056 / NEJMra0804577
- Mazure, N. (2017). VDAC in cancer. *Bioenergetics*, 665-673. Obtenido de 10.1016/j.bbabbio.2017.03.002
- Mazure, N. M. (2017). VDAC in cancer. *Bioenergetics*, 1858, 665-673. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabbio.2017.03.002>
- Messina, Á., Reina, S., Guarino, F., & De Pinto, V. (2012). VDAC isoforms in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1818(6), 1466-1476. doi:10.1016/j.bbammem.2011.10.005
- Messina, A., Reina, S., Guarino, F., & De Pinto, V. (2012). VDAC isoforms in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1466-1476. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbammem.2011.10.005>
- Mueller, S., & Matthay, K. (2009). Neuroblastoma: Biology and Staging. *Current Oncology Reports*, 11(6), 431-438. doi:10.1007/s11912-009-0059-6
- Naghdi, S., & Hajnóczky, G. (2016). VDAC2-specific cellular functions and the underlying structure. *Biochimica et biophysica acta*, 1863(10), 2503-2514. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbammcr.2016.04.020>
- Pistrutto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D'orazzi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutics strategies. *Open access Impact Journal on Aging*, 8(4), 603-619. doi:10.18632/aging.100934
- Reina, S., & Checchetto, V. (2022). Voltage-Dependent Anion Selective Channel 3: Unraveling Structural and Functional Features of the Least Known Porin Isoform. *Frontiers in physiology*, 12(784867). doi:10.3389/fphys.2021.784867
- Reina, S., Conti Nibali, S., Flora Tomasello, M., Magri, A., Messina, A., & De Pinto, V. (2022). Voltage Dependent Anion Channel 3 (VDAC3) protects mitochondria from oxidative stress. *Redox biology*, 51(102264). doi:10.1016/j.redox.2022.102264
- Ruggiero, A., Trombatore, G., Triarico, S., Arena, R., Ferrara, P., Scalzone, M., . . . Ricardi, R. (2013). Platinum compounds in children with cancer: toxicity and

- clinical management. *Anti-Cáncer drugs*, 24(10).  
doi:10.1097/CAD.0b013e3283650bda
- Ruiz, L., & Bravo, M. (2010). Copper compounds in cancer chemotherapy. *Current Medicinal Chemistry*, 17(31), 3606-3615.  
doi:10.2174/092986710793213751
- Ruiz, L., de la Rosa, M., Gracia, I., Mendoza, A., Pérez, G., Ferrer, G., . . . Natarajan, A. (1995). Casiopeína, metal based drugs a new class of antineoplastic and genotoxic compounds. *Metals in medicine*, 59(2-3), 207.  
doi:10.1016/0162-0134(95)97313-F
- Sánchez, B., Gracia, M., Roldan, R., & Ruíz, L. (2006). *Determinación de la capacidad genotóxica, citotóxica y citostática de las Casiopeína IGLI, IICLI y III-ia en linfocitos humanos en cultivo, médula ósea y linfocitos de sangre periférica de ratón*. Obtenido de Facultad de Química de la UNAM.
- Santucci, R., Sinibaldi, F., Cozza, P., Polticelli, F., & Fiorucci, L. (2019). Cytochrome c: An extreme multifunctional protein with a key role in cell fate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 1237-1246.  
doi:10.1016 / j.ijbiomac.2019.06.180
- Shoshan, V., De Pinto, V., Zweckstetter, M., Raviv, Z., Keinan, N., & Arbel, N. (2010). VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Molecular aspects of Medicine*, 31, 227-285.  
doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2010.03.002
- Shoshan-Barmatz, V., Shteinfer-Kuzmine, A., & Verma, A. (2020). VDAC1 at the Intersection of Cell Metabolism, Apoptosis, and Diseases. *Biomolecules*, 10(11), 1485. doi:10.3390/biom10111485
- Shoshan-Barmatz, V., Shteinfer-Kuzmine, A., & Verma, A. (2020). VDAC1 at the Intersection of Cell Metabolism, Apoptosis, and Diseases. *Biomolecules*, 10(11). doi:10.3390/biom10111485
- Silva-Platas, C., Villegas, C., Oropeza-Almazán, Y., Carrancá, M., Torres-Quintanilla, A., Lozano, O., . . . García-Rivas, G. (2018). Ex Vivo Cardiotoxicity of Antineoplastic Casiopeinas Is Mediated through Energetic Dysfunction and Triggered Mitochondrial-Dependent Apoptosis. *Oxidative medicine and cellular longevity*. doi:10.1155/2018/8949450
- Sokol, E., & Desai, A. V. (2019). The Evolution of Risk Classification for Neuroblastoma. *Children (Basel)*, 6(2). doi:10.3390/children6020027.
- Swift, C., Eklund, M., Kravka, J., & Alazraki, A. (2018). Update in Diagnosis, Management and Treatment of Neuroblastoma. *RadioGraphics*, 38(2), 566-580. doi:10.1148 / rg.2018170132

- Tajedidine, N., Galluzi, L., Kepp, O., Hangen, E., Morselli, E., Senovilla, L., . . . Kroemer, G. (2008). Hierarchical involvement of Bak, VDAC1 and Baxin cisplatin-induced cell death. *Oncogene*, *27*, 4221-4232. doi:10.1038/onc.2008.63
- Valencia, A., Uribe, L., Galindo, R., Baca, K., Gutiérrez, A., Vázquez, A., . . . Mejía, C. (2013). Whole Genome Gene Expression Analysis Reveals Casiopeína-Induced Apoptosis Pathways. *PLOS ONE*, *8*(1). doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054664
- Vervliet, T., Parys, J., & Bultynck, G. (2016). Bcl-2 proteins and calcium signaling: complexity beneath the surface. *Oncogene*, *35*(39), 1-14. doi:10.1038/onc.2016.31
- Yalamanchili, K., Afzal, N., Boyman, L., Manella, C. A., Lederer, W. J., & Jafri, M. S. (2022). Understanding the Dynamics of the Transient and Permanent Opening Events of the Mitochondrial Permeability Transition Pore with a Novel Stochastic Model. *Membrane (Basel)*, *12*(5), 494. doi:10.3390/membranes12050494
- Yu, Y., Zeng, Y., Xia, X., Zhou, J.-G., & Cao, F. (2021). Establishment and Validation of a Prognostic Immune Signature in Neuroblastoma. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center*, *28*. doi: 10.1177/10732748211033751
- Yuan, Z., Dewson, G., Czabotar, P., & Birkinshaw, R. (2021). VDAC2 and the BCL-2 family of proteins. *Biochemical Society transactions*, 2787-2795. doi:10.1042/BST20210753
- Zafar, A., Wang, W., Liu, G., Wang, X., Xian, W., McKeon, F., . . . Zhang, R. (2021). Molecular targeting therapies for neuroblastoma: Progress and challenges. *Medicinal research reviews*, *41*(2), 961-1021. doi:10.1002/med.21750
- Zinghirino, F., Pappalardo, X. G., Messina, Á., Guarino, F., & De Pinto, V. (2020). Is the Secret of VDAC Isoforms in Their Gene Regulation? Characterization of Human VDAC Genes Expression Profile, Promoter Activity, and Transcriptional Regulators. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(19), 7388. doi:10.3390/ijms21197388
- Zinghirino, F., Pappalardo, X. G., Messina, A., Nicosia, G., De Pinto, V., & Guarino, F. (2021). VDAC Genes Expression and Regulation in Mammals. *Front Physiol*. doi:10.3389/fphys.2021.708695.
- Zorov, D., Juhaszova, M., Yaniv, Y., Nuss, B., Wang, S., & Sollot, S. (2009). Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition

pore. *European Society of Cardiology*, 83, 213-225. doi:10.1093 / cvr /  
cvp151