



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

“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE MIGRACIÓN E INVASIVIDAD DE
CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA TRATADAS CON CASIOPEÍNA III^a”

Tesis

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

Presenta:

Psic. Lizbeth Karina Avalos Velázquez

Dirigido por:

Dra. María del Carmen Mejía Vázquez

Dra. María del Carmen Mejía Vázquez

Presidente

Dra. Haydé Vergara Castañeda

Secretario

Dr. Pablo García Solís

Vocal

Dra. Nancy Hernández Chan

Suplente

Dr. José Guadalupe Gómez Soto

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Fecha de aprobación por el Consejo Universitario Octubre, 2019.

México

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por el FOPER-UAQ-2019-01268 y la beca de Maestría de CONACYT que me fue otorgada con el CVU-859555; además quiero hacer un agradecimiento a la M.C. Adriana González, así como a la ISC. Nydia Hernández de la Unidad de Microscopía de la UNAM Campus Juriquilla, por su apoyo técnico.

Agradezco a la Dra. Carmen Mejía por permitirme integrarme a su grupo de trabajo y por su apoyo brindado a lo largo de estos dos años, a mis compañeros del grupo de Cáncer y Casiopeínas ya que gracias a sus aportaciones en nuestros seminarios internos, mi proyecto se enriqueció además de favorecer a mi crecimiento profesional y personal. Gracias a la Dra. Lena Ruiz por su apoyo para la adquisición de reactivos para mi proyecto y al encargado de la síntesis de Casiopeínas, el M.C. Adrián Espinoza Guillén.

También agradezco a mi Comité Tutoral por el tiempo dedicado, ya que cada una de sus aportaciones a mi tesis favoreció el trabajo que se realizó y sumó a mi desarrollo como profesionista.

De igual manera quiero agradecer a Joss, a Dena y a Mayra por su valioso apoyo dentro de la parte experimental. Y no podía olvidar a quienes se convirtieron en mis grandes amigos de laboratorio gracias Lau por todos esos fines de semana que gracias a tus conversaciones perdíamos la noción del tiempo sin importar lo tarde que termináramos los experimentos y a Raúl mi compañero de kit mil gracias por tu paciencia, tu disposición para enseñarme cada una de las técnicas y sobre todo por escucharme en los momentos más difíciles y siempre dar una solución a cada uno de los problemas que se nos presentaron.

Y por último a mis padres que son mis pilares y que siempre me han apoyado en cada una de mis decisiones sin dudar y que sin importar el lugar siempre estaban a una llamada de distancia para brindarme palabras de aliento y amor. También agradezco a Fernando que me acompañó en esta aventura, que nunca dudó en apoyarme y en enseñarme que a veces la solución está en lo más simple y a Evelyn por su complicidad y apoyo ya que siempre me sacó una sonrisa sin importar lo difícil de la situación.

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
1.- INTRODUCCIÓN.....	7
2.- ANTECEDENTES	7
2.1 Neuroblastoma.....	7
2.2 Metástasis	9
2.2.1 Transición epitelio-mesénquima.....	10
2.2.2 Migración.....	13
2.2.3 Invasividad.....	14
2.3 Tratamientos.....	15
2.3.1 Cisplatino	16
2.3.2 Casiopeínas.....	16
3.-HIPÓTESIS.....	18
4.-OBJETIVOS.....	18
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos.....	18
5.- MATERIAL Y MÉTODOS	19
5.1 Descripción del sujeto experimental.....	19
5.2 Mediciones y análisis	20
5.2.1 Cultivo celular	20
5.2.2 Determinación de CL ₅₀ de la línea celular 3T3-L1	20
5.2.3 Conteo de viabilidad celular.....	21

5.2.4. Análisis de proteínas mediante inmunofluorescencia.	21
5.2.5 Determinación de la capacidad de migración por medio del ensayo de cierre de la herida.	22
5.2.6 Evaluación de PCNA por inmunocitoquímica como complemento del ensayo de la herida.	22
5.2.7. Evaluación de la capacidad de invasividad por medio del ensayo de Transwell	23
5.2.8 Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo.	24
5.3 Análisis estadístico	24
6.- RESULTADOS	24
7.- DISCUSIÓN.....	39
8.- CONCLUSIONES.....	41
8.- REFERENCIAS	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de carcinogénesis.....	10
Figura 2.- Fenotipo epitelial.....	11
Figura 3.- TEM.....	12
Figura 4. Fases de la migración celular.....	14
Figura 5.- Ciclo celular.....	15
Figura 6.- Casiopeína IIIa.....	17
Figura 7.- Muerte de células de NB tratadas con Casiopeínas.....	18
Figura 8.- Concentración letal 50 (CL₅₀) de la línea 3T3-L1 con Cas IIIa y Cisplatino.....	25
Figura 9.-Gráfica de viabilidad celular post-tratamiento línea celular SK-N-SH.....	26
Figura 10.- Gráfica de viabilidad celular post-tratamiento línea celular 3T3-L1.....	26
Figura 11.- Presencia de E-cadherina en la línea celular SK-N-SH.....	28
Figura 12.- Presencia de E-cadherina en la línea celular 3T3-L1.....	28
Figura 13.- Presencia de N-cadherina en la línea celular SK-N-SH.....	29
Figura 14.- Presencia de N-cadherina en la línea celular 3T3-L1.....	29
Figura 15a.- Dinámica de cierre de la herida.....	30
Figura 15b.- Gráfica de células que cruzan la herida.....	31
Figura 16.- Presencia de PCNA en el ensayo de la herida	32
Figura 17a.- Dinámica de invasividad.....	34
Figura 17b.-Dinámica de invasividad gráfica.....	34
Figura 18.- Traslocación nuclear de β-catenina en la línea celular SK-N-SH..	35
Figura 19.- Traslocación nuclear de β-cateninaA en la línea celular 3T3-L1....	35
Figura 20.- Gráfica de ciclo celular 24 h.....	36
Figura 21.- Gráfica de ciclo celular 48 h.....	36
Figura 21.- Gráfica de ciclo celular 72 h.....	37
Figura 23.- Gráfica de ciclo celular 96 h.....	37
Figura 24.- Gráfica de ciclo celular 120 h.....	38
Figura 25.- Gráfica de ciclo celular 144 h.....	38

RESUMEN

El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido extracraneal más frecuente en la infancia (8-10 %), con alta capacidad de metástasis y resistencia a fármacos. Lo que ha conducido a la investigación de nuevos tratamientos con mayor efectividad como las Casiopeínas® (Cas), que son compuestos que han mostrado efectos citostáticos y citotóxicos en diversos tumores. En líneas de NB se comprobó su actividad apoptótica (2-4 h), autofágica (10 h) y de supervivencia (24 h), pero se desconocían sus efectos después de las 24 h, tiempo en el cual las células podrían metastatizar. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue analizar la transición epitelio-mesénquima, migración e invasividad celular, en la línea de neuroblastoma SK-N-SH, tratada con la CL₅₀ de Cisplatino o CasIIIa. La transición epitelio-mesénquima se midió por inmunofluorescencia a través de las proteínas E-cadherina y N-cadherina, la migración celular se evaluó con el ensayo de la herida y se realizó inmunocitoquímica para ver la presencia de PCNA; mientras que la invasividad celular se determinó empleando el ensayo de *transwell*, inmunofluorescencia para identificar la traslocación de β -catenina y el análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron que no hay cambios significativos en el proceso de transición epitelio-mesénquima, sin embargo, los tratamientos disminuyen la capacidad de migración y a partir de las 48 h, se observa la pérdida celular total. También se encontró que las células tratadas con CasIIIa no son capaces de atravesar la membrana del *transwell*, así mismo no se identificó traslocación de β -catenina y las células permanecen entre las fases G₀/G₁ y la fase S del ciclo celular. En conclusión, la administración de CasIIIa inhibe la capacidad de migración e invasividad en células de NB.

Palabras clave: Neuroblastoma, Casiopeína IIIa, migración celular, invasividad celular, ciclo celular.

ABSTRACT

Neuroblastoma (NB) is the most common extracranial solid tumor in childhood (8-10%), with a high capacity for metastasis and drug resistance. This has led to the investigation of new treatments with greater effectiveness such as Casiopeínas® (Cas), which are compounds that have shown cytostatic and cytotoxic effects in various tumors. In NB lines, its apoptotic (2-4 h), autophagic (10 h) and survival (24 h) activity were verified, but its effects were unknown after 24 h, at which time the cells could metastasize. For this reason, the objective of this work was to analyze the epithelial-mesenchymal transition, migration and cell invasiveness, in the SK-N-SH neuroblastoma line, treated with the LC50 of Cisplatin or CasIIIa. The epithelial-mesenchymal transition was measured by immunofluorescence through the E-cadherin and N-cadherin proteins, cell migration was evaluated with the wound assay and immunocytochemical was performed to see the presence of PCNA; while cell invasiveness was determined using the transwell assay, immunofluorescence to identify β -catenin translocation and cell cycle analysis by flow cytometry. The results showed that there are no significant changes in the epithelial-mesenchymal transition process, however, the treatments decrease the migration capacity and after 48 h, the total cell loss is observed. It was also found that the cells treated with CasIIIa are not able to cross the transwell membrane, likewise not identified translocation of β -catenin and the cells remain between the G0 / G1 phases and the S phase of the cell cycle. In conclusion, the administration of CasIIIa inhibits the ability of migration and invasiveness in NB cells.

Keywords: Neuroblastoma, Casiopeína IIIa, cell migration, cell invasiveness, cell cycle

1.- INTRODUCCIÓN

El Neuroblastoma (NB) es el tumor sólido extracraneal más frecuente en infantes (1); representa el 15% de la mortalidad infantil; su tasa de supervivencia en tumores metastásicos es considerablemente baja (21%) durante los primeros 5 años de vida (2).

Debido a su complejidad el tratamiento administrado para el NB de alto riesgo con metástasis, consiste en terapias multimodales intensivas. Los quimioterapéuticos comúnmente administrados son agentes alquilantes siendo el más utilizado el cisplatino (3). Sin embargo se asocia a una deficiente calidad de vida por sus efectos adversos (4,5).

Por lo anterior, se trabaja en la investigación de nuevos anticancerígenos más efectivos y con menores efectos adversos entre los que se encuentra la familia de las Casiopeínas® (Cas) (6–8); que han demostrado que a menores concentraciones que el cisplatino, producen efectos antiproliferativos, citotóxicos y genotóxicos (9–11). En células de NB tratadas con Cas se han analizado los procesos de apoptosis, autofagia y supervivencia. Sin embargo, es importante ahondar en el mecanismo de acción en etapas tumorales tardías debido a que la CasIIIa actualmente se encuentra en Fase Clínica I.

2.- ANTECEDENTES

2.1 Neuroblastoma

El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido extracraneal más frecuente de la infancia (12), con una incidencia anual de 10.5 por cada millón de niños menores de 15 años en Estados Unidos (13), ubicando al NB como el tumor más diagnosticado en el primer año de vida (14). Se caracteriza por ser un tumor maligno embrionario de

células pluripotentes que derivan de la cresta neural para dar origen al Sistema Nervioso Simpático (SNS) (15).

Los sitios en los que se ubica el NB están correlacionados con tejidos del SNS, incluyendo los ganglios simpáticos espinales y su blanco principal que son las células cromafines de las glándulas suprarrenales (16). Las características del neuroblastoma son variables dependiendo de la edad del paciente a la hora del diagnóstico, la histopatología tumoral, el estado de amplificación del oncogen N-Myc y el estadio en el cual se encuentre clasificado el tumor (Tabla 1).

Tabla 1. Sistema Internacional de Estadificación del NB (Maris, 2013).

Estadio	Características
Estadio 1	Tumor localizado con resección macroscópica completa, con o sin enfermedad residual microscópica; ganglios linfáticos ipsilaterales representativos, negativos para el tumor microscópicamente (los nódulos adheridos al tumor primario y que fueron extirpados junto con éste, pueden ser positivos).
Estadio 2	Tumor localizado con resección macroscópica incompleta; ganglios linfáticos ipsilaterales representativos, negativos para el tumor microscópicamente.
Estadio 3	Tumor irreseccable unilateral, infiltrante más allá de la línea media, con o sin afectación de los ganglios linfáticos regionales; o tumor unilateral localizado con compromiso de los ganglios linfáticos regionales contralaterales; o tumor en la línea media con extensión bilateral por infiltración (irreseccable) o por afectación del ganglio linfático. La línea media está determinada por la columna vertebral. Los tumores que se originan en un lado y cruzan la línea media deben infiltrarse sobre ésta, o hacia el lado opuesto de la columna vertebral.
Estadio 4	Cualquier tumor primario con diseminación a los ganglios linfáticos distantes, huesos, médula ósea, hígado, piel u otros órganos (excepto los definidos para la etapa 4S).
Estadio 4S	Tumor primario localizado (como se define en etapa 1 o 2), con diseminación limitada a piel, hígado o médula ósea (circunscrito a lactantes menores de un año). La afectación medular debe ser mínima (o sea <10% de células nucleadas totales identificadas como malignas por biopsia de hueso o por aspirado de médula ósea).

Molecularmente, el NB presenta delección del cromosoma 1p y ganancia del 17q, así como amplificación del oncogen N-Myc (15). Dicha amplificación se presenta aproximadamente en el 25% de los casos de NB e indica el nivel de gravedad con el que se presenta el tumor, siendo el principal factor independiente de mal

pronóstico. Además, está estrechamente relacionado con una rápida progresión del tumoral, inhibición de apoptosis y alta capacidad de metástasis (3).

La metástasis está presente al momento del diagnóstico aproximadamente en el 50% de los pacientes teniendo como sitios más comunes la médula ósea, el hueso y ganglios linfáticos; a su vez en el 5% de los menores se puede presentar afectación en el sistema nervioso central y pulmones (17).

2.2 Metástasis

La metástasis es un proceso presente en el desarrollo tumoral que se define como la formación de tumores en tejidos y órganos lejanos al sitio de origen (Fig. 1); además es un factor importante para identificar la malignidad y el pronóstico del paciente y se asocia con el 90% de muertes por cáncer (18), Es un proceso que forma parte de la carcinogénesis y está asociado con la malignidad y mal pronóstico.

Para llevarse a cabo la metástasis, primero requiere que las células tumorales pierdan la adherencia célula-célula mediante la transición epitelio-mesénquima (TEM), posteriormente se presenta la degradación de la matriz extracelular y la invasión en la membrana basal, para dar paso a la migración celular. Este punto incluye la extravasación de las células tumorales hacia el torrente sanguíneo para favorecer la circulación de las células hasta la identificación del tejido de crecimiento secundario en el cual se llevará a cabo la extravasación del torrente sanguíneo (19).

Finalmente ocurre la invasión de las células tumorales en el tejido, a partir de un proceso inverso a la transición epitelio-mesénquima el cual se ve favorecido por la angiogénesis (19,20). Para analizar el proceso de metástasis de forma detallada a continuación se desglosan 3 puntos clave: la TEM, la migración y la invasividad celular (21).

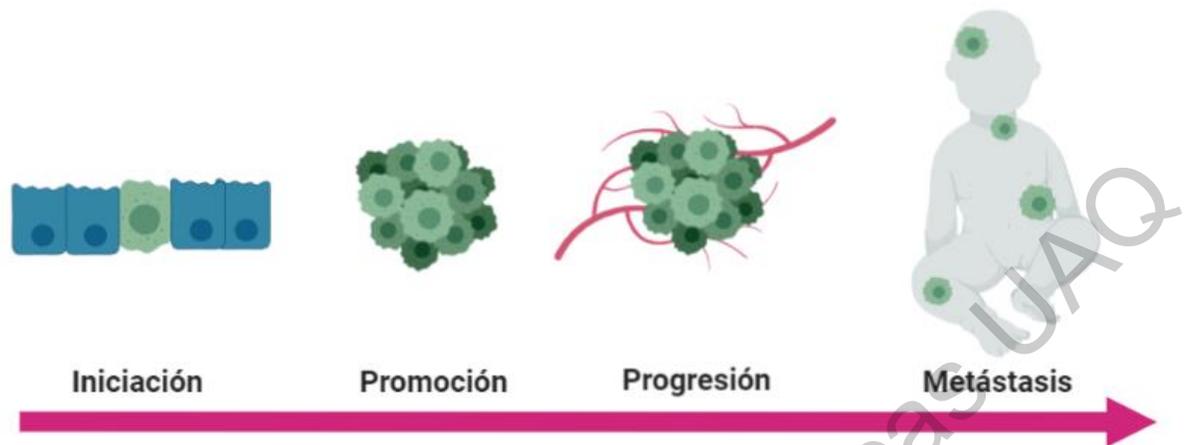


Figura 1. Proceso de carcinogénesis. La carcinogénesis es un proceso en el cual se desarrolla un tumor, no necesariamente es un proceso lineal o en el cual se pase por todas las etapas. Comienza con la fase de iniciación donde la célula presenta una o varias mutaciones a nivel celular, después se encuentra la fase de promoción en la cual la capacidad de apoptosis disminuye y la proliferación de las células mutadas aumenta, posteriormente en la fase de progresión en la cual la angiogénesis juega un papel importante formando vasos sanguíneos a partir de los ya existentes favoreciendo el microambiente tumoral; por último esta la metástasis en la cual el microambiente tumoral ya no es suficientemente rico para las células del tumor primario por lo cual se lleva a cabo la TEM, lo que le confiere características mesénquimales a las células epiteliales, favoreciendo su motilidad, permitiéndoles migrar e invadir tejidos lejanos al sitio primario (18).

2.2.1 Transición epitelio-mesénquima

El principio de la TEM consiste en el cambio fenotípico de las células epiteliales (Fig.2) hacia un fenotipo mesenquimal, favoreciendo la motilidad y proliferación celular debido a la pérdida de adhesión y degradación de la matriz extracelular la cual está relacionada con la familia de cadherinas (22).

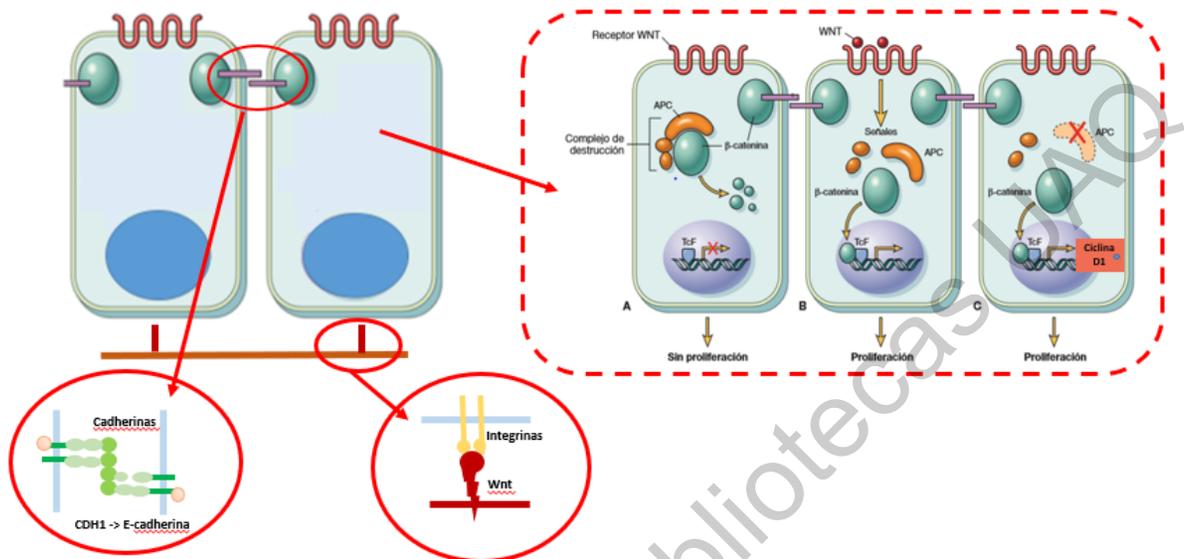


Figura 2. Fenotipo epitelial. En este fenotipo las células se encuentran unidas entre sí por cadherinas (específicamente E-cadherina) que se encuentran ancladas a la membrana extracelular por medio de las integrinas y la proteína Wnt. (A) Cuando Wnt está unida a las integrinas, el complejo de destrucción de APC (poliposis adenomatosa coli) que se ubica en el citoplasma de la célula, destruye a β -catenina y no le permite trasladarse al núcleo impidiendo así la proliferación celular. (B) Cuando Wnt se une a su receptor ubicado en la membrana celular, impide que el complejo de destrucción se forme y de esta manera β -catenina puede trasladarse al núcleo y activar factores de transcripción como los de ciclina D1, que activan el ciclo celular promoviendo la proliferación. (C) Si APC no se encuentra presente en el citoplasma de la célula, no es posible la formación del complejo de destrucción lo cual permite la traslocación nuclear de β -catenina y con esto, la proliferación celular(22).

Las cadherinas son una familia de moléculas de adhesión célula-célula dependientes de calcio; las cadherinas clásicas tipo I, epitelial (E), neural (N) y placentaria (P) y tipo II cadherinas de la 6 a la 12, además de la 18, 20, 22, 24 y la cadherina VE (Vascular Endotelial) (23). En este proyecto nos vamos a centrar en las cadherinas E y N.

La E-cadherina está codificada por el gen CDH1 y promueve la asociación célula-célula, lo que constituye un importante factor antitumoral; mientras que la N-cadherina (gen CDH2) se expresa cuando hay pérdida de E-cadherina, permitiendo

que las células cancerosas crucen la membrana basal e invadan los tejidos circundantes (Fig. 3) (19). En este proceso intervienen otras moléculas como β -catenina (β -cat), que se encuentra unida a la E-cadherina actuando como un intermediario en la unión de moléculas de adhesión del citoesqueleto, con las uniones celulares (24).

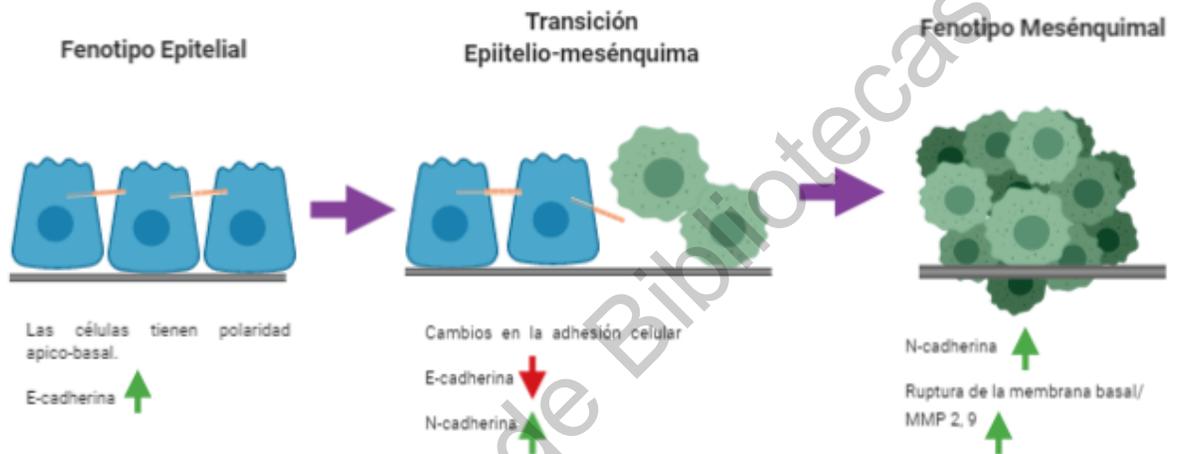


Figura 3. TEM. La transición epitelio-mesénquima consiste en un cambio fenotípico en las células cancerígenas conferido por la expresión de las proteínas E-Cadherina (la cual promueve la unión célula-célula) y N-Cadherina (favorece la pérdida de adhesión) el cual ayuda en la motilidad celular (19).

La principal función con la que se asociaba a β -cat era con el control de la función adhesiva de las cadherinas, aunque posteriormente se estableció que también participa en la vía de señalización intracelular de Wnt. En dicha vía β -cat debe translocar hacia el núcleo (Fig. 2), lo cual depende de los niveles de la proteína no-asociada a la cadherina o que se encuentra libre en el citosol. Cuando β -cat no está unida a la cadherina en los complejos de adhesión, se encuentra formando un complejo con proteínas como GSK3 (la cinasa de glucógeno sintasa 3) asociada a la activación del ciclo celular y APC que es un gen responsable de la supresión tumoral, encargado de los efectos antiproliferativos (24).

Una vez ocurrido este proceso inicia la fase pre-invasiva, en la cual las células disminuyen el contacto entre sí por la pérdida de función de E-cadherina, el aumento de N-cadherina y la activación de β -catenina (22). Esto provoca la separación celular de la membrana basal e inicia lo que se conoce como invasión local en la que se infiltran las células tumorales en los tejidos adyacentes (25). Por último las células tumorales pueden migrar para colonizar tejidos distantes y formar focos secundarios de crecimiento (21).

2.2.2 Migración

La migración celular tiene una función importante dentro del crecimiento embrionario y en etapas posteriores a la embriogénesis, es auxiliar en la reparación y regeneración celular. Además, tiene un mecanismo implicado con la motilidad activa de la célula mediante la regulación decreciente de E-cadherina (durante el proceso de TEM), dando como resultado la disminución de la fuerza de adhesión celular dentro de tejidos. Lo anterior, permite cambios en el citoesqueleto, entre los cuales se encuentran la modificación de la polaridad en las células, lo que favorece el desplazamiento celular en procesos cancerígenos (Fig. 4). Este mecanismo está relacionado con la degradación de la matriz extracelular, otras células como las del sistema inmune y el torrente sanguíneo (22).

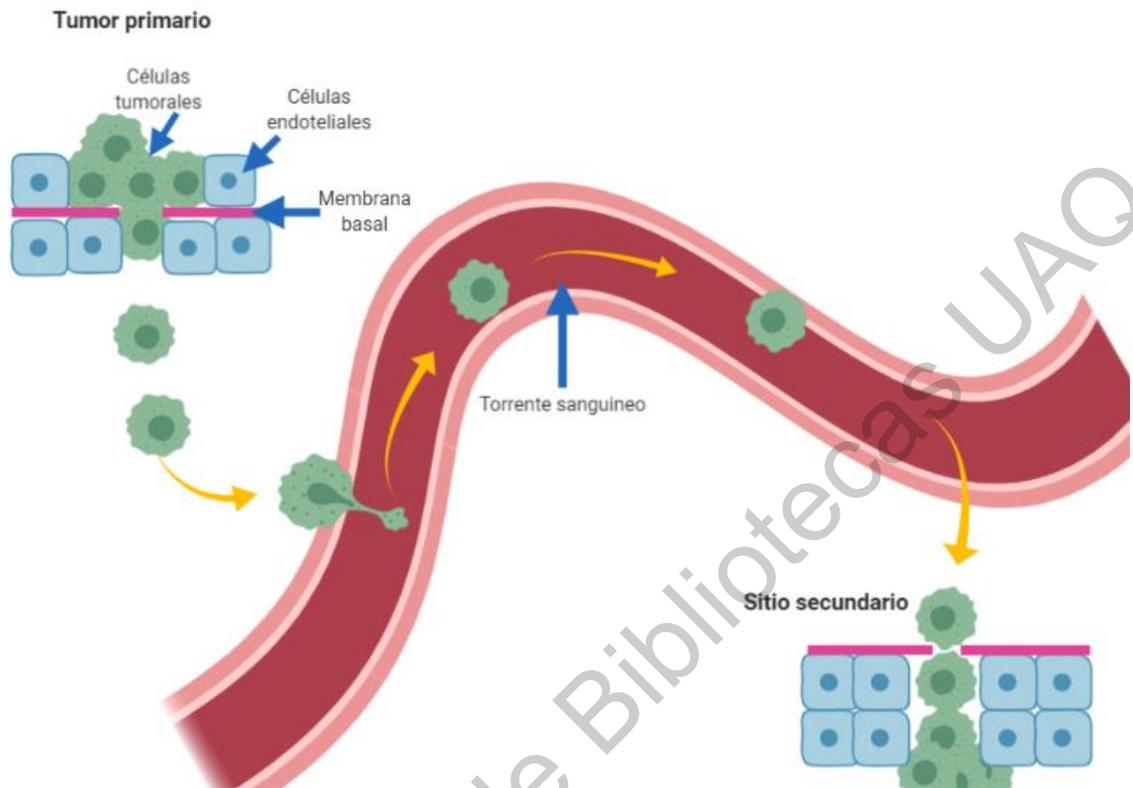


Figura 4. Fases de la migración. La migración celular inicia con el proceso de degradación de la matriz extracelular (MEC), posteriormente se presenta falta de adhesión celular debido a la pérdida de E-cadherina y aumento de N-cadherina, aunado a esto se reorganiza el citoesqueleto, para finalmente llegar a la migración de las células tumorales mediante factores de motilidad autócrinos como HGF (Factor de crecimiento de hepatocitos) (26)

2.2.3 Invasividad

La invasividad en el proceso de metástasis se presenta posterior a la migración. Una vez que la célula llega a su blanco, surge un proceso inverso a la TEM en el cual las células mesenquimales cambian su fenotipo a epiteliales, con lo cual se favorece la adhesión celular así como la angiogénesis (25).

La invasividad incluye la proliferación celular descontrolada, proceso en el cual nuevamente se ve vinculada β -catenina, ya que su translocación hacia el núcleo

promueve la hiperactivación de TCF1 (factor de células T1) el cual se encuentra relacionado con la transcripción de proteínas como la ciclina D1 implicada en la multiplicación y el crecimiento celular (Fig. 5) (27)

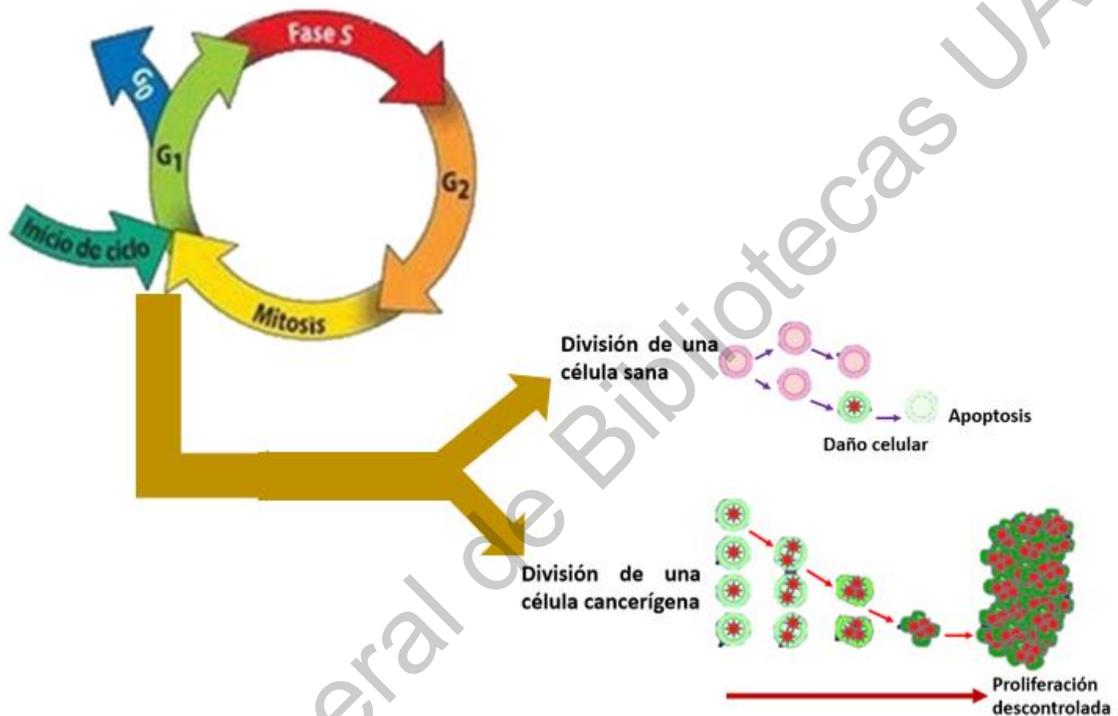


Figura 5. Ciclo celular. En la imagen se pueden observar cada una de las fases del ciclo celular, así como la diferencia en el proceso de división celular de una sana y de una cancerígena, para lo cual es importante señalar que las células con mutaciones evaden los puntos de control lo cual evita su muerte y favorece su proliferación (27).

2.3 Tratamientos

Actualmente los tratamientos recomendados para combatir el NB consisten en terapias multimodales intensivas las cuales suelen ser ineficientes, especialmente en pacientes de alto riesgo con metástasis y/o con amplificación del oncogen N-Myc. Entre los quimioterapéuticos más utilizados se encuentran agentes alquilantes

como: ciclofosfamida, melfalan, carboplatino, o el más comúnmente administrado cisplatino (28,29).

2.3.1 Cisplatino

El cisplatino inhibe la síntesis de DNA y proteínas produciendo enlaces cruzados dentro y entre las cadenas del DNA, al unirse al N-7 de la guanina. Sin embargo, su administración está asociada a una deficiente calidad de vida en los pacientes debido a su alto nivel de toxicidad en diversos órganos (29); por lo cual su uso se asocia con nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, trastornos gastrointestinales, ototoxicidad e inmunosupresión entre otros (4).

2.3.2 Casiopeínas

En la búsqueda de nuevos anticancerígenos surgen las Casiopeínas® (Cas) que pertenecen a una familia de compuestos de coordinación de cobre(II) cuya fórmula general es $[Cu(N-N)(N-O)]NO_3$ y $[Cu(N-N)(O-O)]NO_3$ (6–8) (Fig. 6). Estos compuestos han demostrado que a menores concentraciones que el cisplatino, producen efectos antiproliferativos, citotóxicos y genotóxicos (9,11) en modelos *in vivo* (30) e *in vitro* (31–33).

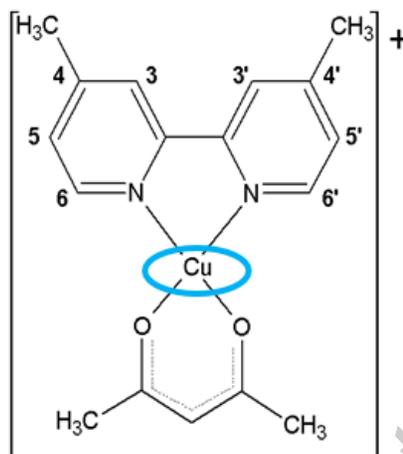


Figura 6. Casiopeína IIIa. La imagen muestra el complejo de coordinación de cobre(II) el cual contiene dimetilbipiridina y acetilacetonato (Tomada de García-Ramos et al., 2017).

Además, se ha observado una fuerte actividad antitumoral en líneas celulares de carcinomas humanos (32) y caninos (datos no publicados) y bajos efectos tóxicos en corazón de rata (34), linfocitos y macrófagos humanos (33), evitando así la presencia de leucopenias. En comparación con otros tratamientos antineoplásicos, las Cas presentan una capacidad tóxica menor, debido a que el cobre es un oligoelemento que participa en las reacciones normales metabólicas del organismo (29, 34).

En células de NB tratadas con Cas IIgly, IIIa y IIIEa, nuestro grupo ha analizado los procesos de apoptosis, autofagia y supervivencia a diferentes tiempos (2, 10 y 24 h) (33) (Fig.7). Se observaron los fenómenos de apoptosis y autofagia a tiempos cortos (2 h); mientras que a las 10 h solo se encontró autofagia y finalmente la supervivencia fue el proceso observado a las 24 h (36); sin embargo, aún no se conocen los efectos de estos compuestos en tiempos posteriores, donde se pueden presentar la migración y la invasividad.

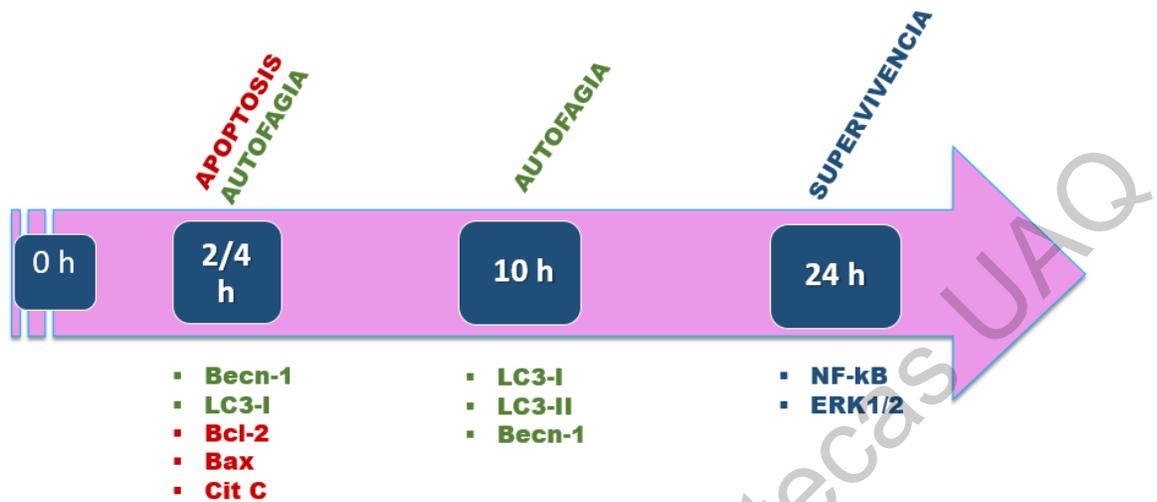


Figura 7. Muerte de células de NB tratadas con Casiopeínas. La imagen muestra cinética de tiempo de 2/4, 10 y 24h donde se observaron tres procesos distintos: la apoptosis, autofagia y supervivencia. Encontrando que el tratamiento con Casiopeínas tiene su principal efecto como antineoplásico en tiempos cortos(32, 35).

3.-HIPÓTESIS

El tratamiento con Casiopeína® IIIia inhibirá los procesos de la transición epitelio-mesénquima, migración e invasividad en células de neuroblastoma.

4.-OBJETIVOS

Objetivo general.

Analizar los procesos de la transición epitelio-mesénquima, migración e invasividad, en células de neuroblastoma tratadas con Casiopeína® IIIia.

Objetivos específicos.

- 1) Analizar la transición epitelio-mesénquima en células de NB tratadas con CasIIIia.

- 2) Evaluar la capacidad de migración de la línea celular SK-N-SH debida al tratamiento con Casiopeína IIIa.
- 3) Determinar la capacidad de invasividad de la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH tratada con CasIIIa.
- 4) Identificar la translocación de β -catenina de la línea celular SK-N-SH bajo tratamiento con CasIIIa.
- 5) Analizar el porcentaje de distribución celular dentro de las fases del ciclo celular de la línea celular SK-N-SH debida al tratamiento con Casiopeína IIIa.

5.- MATERIAL Y MÉTODOS

Se trabajó en un modelo *in vitro* con una línea celular de neuroblastoma, bajo un diseño experimental-longitudinal.

5.1 Descripción del sujeto experimental

La línea celular SK-N-SH (ATCC®, No. Cat. HTB-11™) proveniente de un neuroblastoma humano, se caracteriza por tener una morfología epitelial, su modelo de crecimiento es adherente y su tiempo de proliferación es de 43 h aproximadamente, no tiene amplificación del oncogen N-Myc pero se ha reportado que presenta una alta capacidad invasiva.

La línea celular 3T3-L1 (ATCC®, No. Cat. CL-173™) proviene de fibroblastos de ratón, tiene un modelo de crecimiento adherente y su tiempo de proliferación es de 48 h aproximadamente; por tal motivo son consideradas como células de crecimiento acelerado no-tumorales.

5.2 Mediciones y análisis

A partir de las 24 h post-tratamiento, todas las mediciones se realizaron cada 24 h hasta las 120 h. Las condiciones fueron células control sin-tratamiento y células tratadas con su respectiva CL_{50} de Casiopeína IIIa o Cisplatino.

5.2.1 Cultivo celular

Cultivo de dos líneas celulares (SK-N-SH y 3T3-L1) bajo los siguientes lineamientos: se utilizó como medio base una mezcla 1:1 de Medio Eagle Modificado (EMEM, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO USA), se complementó con Suero Fetal Bovino (SFB) (No. Cat. P30-3306; PanBiotech) hasta una concentración final del 10% y con Antibiotic-Antimycotic 100X (No. Cat. 15240062; Gibco™) al 1%. Se incubaron a 37°C, con atmósfera de 95% aire y 5% dióxido de carbono (CO_2), manteniendo la humedad constante y renovando el medio cada 2 días. Cuando los cultivos alcanzaron una confluencia >80% se pasó a la siguiente etapa.

5.2.2 Determinación de CL_{50} de la línea celular 3T3-L1

Fueron sembradas 1×10^5 células en placas de 24 pozos, las cuales se incubaron durante 24 h bajo las condiciones de cultivo previamente reportadas para permitir la adhesión celular; posteriormente se agregaron concentraciones crecientes del tratamiento (Cisplatino o CasIIIa: 1, 10, 25, 50, 100, 200 $\mu g/ml$) y nuevamente se incubaron las placas durante 24 h. Para finalizar, se realizó el conteo celular con azul de tripano como indicador de viabilidad celular (No. Cat. 25-900-CI; Corning™) en cámara de Neubauer, y posteriormente se graficaron los resultados, sacando el promedio de tres experimentos independientes, hasta obtener la CL_{50} .

5.2.3 Conteo de viabilidad celular

Fueron sembradas 1×10^5 células en placas de 24 pozos, las cuales fueron tratadas con su CL_{50} por 24 h y posteriormente se realizó cambio de medio (SFB 10%) y se procedió al conteo en tiempos discretos (24, 48, 72, 96 y 120 h) por medio de azul de tripano en cámara de Neubauer.

5.2.4. Análisis de proteínas mediante inmunofluorescencia.

Para el análisis de proteínas, en placas de 24 pozos se colocaron cubre-objetos redondos tratados con Poli-L-lisina (No. Cat. A-005-C; Merck Millipore), en los cuales fueron sembradas 1×10^5 células, y una vez aplicado el tratamiento (CasIIIa o Cis) se procedió a fijarlas con paraformaldehído (No. Cat. P6148-500G; Sigma Aldrich) al 4%. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS 1X por 5 min cada uno y las membranas celulares se permeabilizaron con Triton™ (No. Cat. T8787; Sigma-Aldrich) por 15 min. Después se realizaron 3 lavados más con PBS-Tween-20 (No. Cat. P9416; Sigma-Aldrich) al 0.05% y las uniones celulares inespecíficas, se bloquearon con albumina al 1% durante 1 h a 4°C. Se aplicaron los anticuerpos primarios correspondientes: E-cadherina (No. Cat. 14472; CellSignaling), N-cadherina (No. Cat. 14215, CellSignaling) o β -catenina (No. Cat. sc-7963; Santa Cruz Biotechnology) dil. 1:500, dejándose incubar durante toda la noche.

Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS- Tween-20, se agregó el anticuerpo secundario (Donkey anti Mouse Alexa Fluor 488; No. Cat. R37114; ThermoFisher) dil. 1:1000 + 0.5 μ l de Faloidina (No. Cat. P5282; Sigma-Aldrich) como contraste citoplásmico para marcar la actina y DAPI (No. Cat. D9542; Sigma-Aldrich) como marcador nuclear. Las muestras se incubaron durante 2 h, se lavaron 3X con PBS-Tween-20 y se montaron en portaobjetos con gel revelador. Se mantuvieron en oscuridad hasta la lectura en el microscopio confocal (Zeiss Axiovert 200 LSM 510 Meta– Multifotónico), en el cual se eligieron 3 campos al azar en cada una de las muestras y se procedió a tomar las fotografías.

5.2.5 Determinación de la capacidad de migración por medio del ensayo de cierre de la herida.

El ensayo consistió en seguir el comportamiento de una monocapa celular confluyente luego de realizar una brecha o “herida”; para determinar el contacto célula-célula, cerrando así la “herida”.

En placas de 24 pozos se cultivaron 1×10^5 células en condiciones bajas de SFB (5%) y al alcanzar una confluencia $>80\%$, se realizó la “herida” con puntas estériles de micropipeta amarillas (P200). Posteriormente se procedió a lavar las placas dos veces con PBS para eliminar los restos celulares desprendidos de la zona de la “herida”. Se aplicaron los tratamientos (CL_{50}) dejándose actuar durante 24 h, en este punto se retiraron los tratamientos y se agregó medio fresco con SFB al 5%. Se observó en microscopio óptico con aumento 4X, enfocado ligeramente por encima del punto del foco y dejando las imágenes un poco sobre-iluminadas. Se utilizó un barrido de tiempos discretos donde se midió el cierre de la herida a las 24, 48, 72, 96 y 120 h; se tomaron fotografías de tres campos elegidos al azar en los diferentes tiempos y se procedió al conteo de células que migraron hacia la herida, asignando un valor arbitrario de 100 a la muestra control. Los resultados se presentan en un gráfico en el cual se muestra el promedio de células que cruzaron la línea de la herida en cada tiempo.

5.2.6 Evaluación de PCNA por inmunocitoquímica como complemento del ensayo de la herida.

Para realizar este protocolo, en placas de 24 pozos se sembraron 1×10^5 células tratadas bajo las mismas condiciones del ensayo de la herida. Posteriormente se retiró el medio (DMEM), se procedió a realizar un lavado con PBS y se fijaron en paraformaldehído al 0.4%. Una vez fijado el cultivo, las membranas celulares se

permeabilizaron añadiendo 2 ml de Tritón-100X™ al 1% y se mantuvieron durante 10 min en agitación. A continuación, se hicieron 3 lavados con PBS y uno con PBS-Tween al 0,5%. Las uniones inespecíficas se bloquearon con 400µl de solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente, se retiró la solución de bloqueo y se añadieron 200 µl del anticuerpo primario PCNA (No. Cat. SC-9857, Santa Cruz Biotechnology) en una dil. 1.500, incubándose toda la noche a 4°C en ambiente húmedo. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS y uno con PBS-Tween al 0,5%. Se agregó el anticuerpo secundario (Mouse anti Goat; No. Cat. SC-2354, Santa Cruz Biotechnology) a una dil. 1:1000, incubándose durante 2 h, y posteriormente se realizaron tres lavados con PBS. El revelado se llevó a cabo con Diaminobencidina (No. Cat. 91-95-2; Sigma Aldrich) y como contraste se utilizó hematoxilina (No. Cat. 14166; Sigma Aldrich). Para finalizar, las muestras se cubrieron con medio de montaje, se sellaron con esmalte y se dejaron secar para su análisis por microscopia óptica para lo cual se eligieron 3 campos al azar en cada una de las muestras y se procedió a tomar las fotografías

5.2.7. Evaluación de la capacidad de invasividad por medio del ensayo de Transwell

Las células previamente tratadas durante 24 h con Cas o Cis, fueron privadas de SFB durante otras 24 h. Posteriormente se sembraron 4×10^5 células en los insertos del Transwell (No. Cat. CLS3464; Sigma Aldrich), se añadió medio con suero al 10% en el compartimento inferior del Transwell y se dejaron incubar durante 48 h para permitir la migración de las células desde la cara apical hacia la cara basal del Transwell. Las células que lograron migrar, se fijaron en paraformaldehído al 0.4% y se procedió a su análisis en el microscopio óptico para lo cual fueron seleccionados al azar tres campos y se realizó el conteo celular para su posterior análisis estadístico.

5.2.8 Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo.

El análisis del ciclo celular se realizó con el analizador celular Muse™ (No. Cat. 64271; Merck Millipore; Alemania), utilizando el kit Cell Cycle (No. Cat. MCH100106; Merck Millipore; Alemania) que tiñe con yoduro de propidio las células íntegras. El analizador celular detecta en qué fase del ciclo celular se encuentra la célula (G0/G1, S, G2/M). Partiendo de 1×10^5 células, se realizaron dos lavados con PBS 1X y se procedió a fijarlas con etanol al 70%, incubando la muestra durante 3 h a -20°C . Se centrifugaron a 3000 rpm, se retiró el etanol y se realizaron dos lavados con PBS 1X. En un tubo eppendorf se depositaron 200 μl del pellet y se agregaron 200 μl del reactivo Cell Cycle en oscuridad. Las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente y se procedió a analizarlas con el software correspondiente al kit Cell Cycle en el analizador celular Muse™.

5.3 Análisis estadístico

Las metodologías detalladas se efectuaron por triplicado y los datos se analizaron mediante ANOVA. Los resultados se presentan como la Media \pm Desviación estándar con una $P \leq 0.05$. Se empleó el programa *GraphPad Prism* en su versión 7.00.

6.- RESULTADOS

Determinación de CL_{50} de la línea celular 3T3-L1.- Después de tratar la línea celular 3T3-L1 durante 24 h con CasIIIa (Fig. 8) se encontró que en comparación con el Cisplatino se requiere de una dosis mayor para llegar a su CL_{50} , contrario a lo que sucede en las células tumorales en las cuales es necesaria una dosis mayor de Cisplatino.

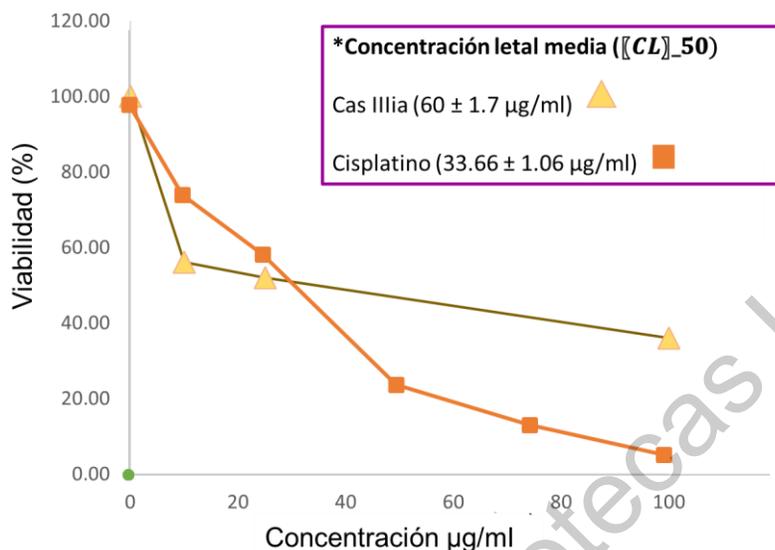


Figura 8. Concentración letal 50 (CL₅₀) de la línea 3T3-L1 con Cas IIIia y Cisplatino. La gráfica representa el promedio de tres experimentos independientes.

Viabilidad celular post-tratamiento.- En las Figuras 9 y 10 se observa una tendencia a la baja en la viabilidad celular entre las 24 y 48 h post-tratamiento en ambas líneas celulares; sin embargo en el caso de la línea celular SK-N-SH que fue tratada con cisplatino a las 120 h se comporta de una forma similar a las células control; por otra parte, la misma línea celular al ser tratada con CasIIIia tiene un descenso en la viabilidad celular del cual no se recupera a las 120 h. En el caso de la línea 3T3-L1 podemos observar que los resultados obtenidos en las tres condiciones (control, CasIIIia y Cis) tienen valores similares. Sin embargo, se puede observar como las células que fueron tratadas con CasIIIia tienen un comportamiento con mayor similitud a los controles, que las tratadas con Cisplatino ya que éstas muestran una supervivencia ligeramente menor.

**Viabilidad celular post-tratamiento
Línea celular SK-N-SH**

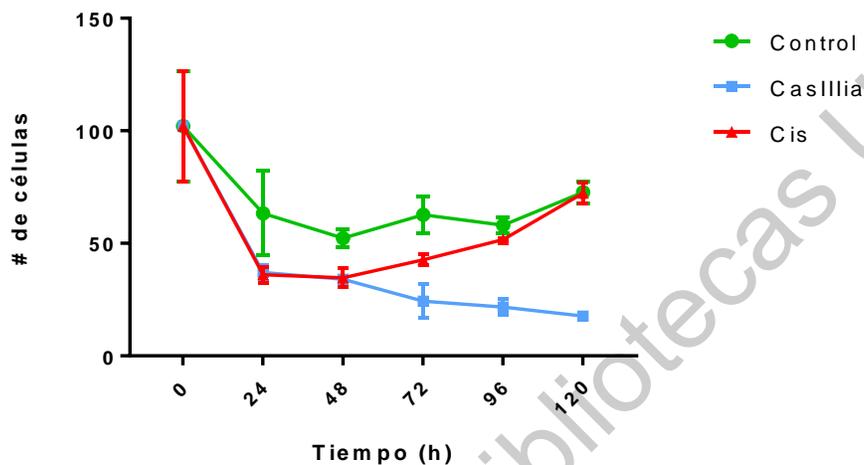


Figura 9.- Gráfica de viabilidad celular post-tratamiento/línea celular SK-N-SH. - La gráfica muestra el resultado obtenido del conteo celular después de tratar las células con la CL₅₀ de CasIIIa o Cisplatino durante 24 h. El conteo se realizó en tiempos discretos cada 24 h.

**Viabilidad celular post-tratamiento
Línea celular 3T3-L1**

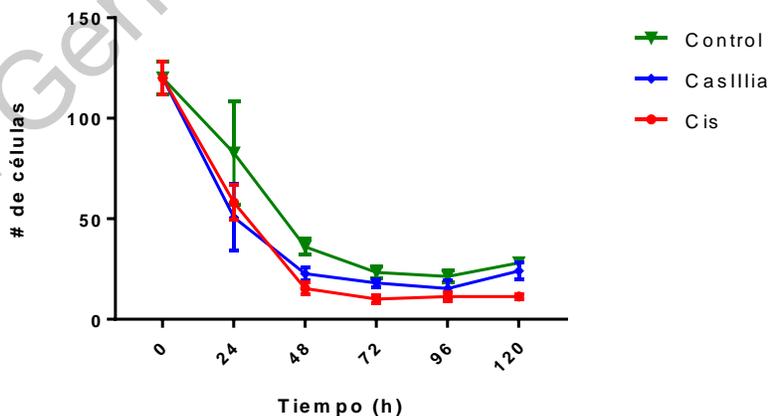


Figura 10.- Gráfica de viabilidad celular post-tratamiento/línea celular 3T3-L1. La gráfica muestra el resultado obtenido del conteo celular después de tratar las células con la CL₅₀ de CasIIIa o Cisplatino durante 24 h. El conteo se realizó en tiempos discretos cada 24 h.

Transición epitelio-mesénquima. – La presencia de E-cadherina en la línea celular SK-N-SH se puede observar en la Figura 11, en la cual las imágenes correspondientes a los controles muestran ausencia de la proteína de interés; mientras que las células tratadas con CasIIIa muestran co-localización de Faloidina y de E-cadherina a partir de las 24 h post-tratamiento y hasta las 120 h, además de un cambio morfológico con el cual las células toman una forma redondeada. Por último, las células tratadas con Cis muestran una baja señal a las 48 y 72 h tanto para Faloidina como para E-cadherina; sin embargo, la intensidad de la fluorescencia aumenta hacia las 96 y 120 h. Por otra parte, en la Figura 12 en la cual se muestran los resultados obtenidos al evaluar la presencia de E-cadherina en la línea celular 3T3-L1, se puede observar la presencia mínima de la proteína de interés (E-cadherina) a las 48 h y la ausencia total en los siguientes tiempos, a pesar del aumento en la expresión del marcador del citoesqueleto. Sin embargo, en las células tratadas con CasIIIa se puede ver la presencia de Faloidina y de E-cadherina co-localizadas y su aumento con respecto al tiempo, además se observa un cambio morfológico con el cual las células adquieren una forma redondeada. Por último, las células tratadas con Cisplatino muestran señal de Faloidina a las 24h de forma similar a la encontrada en las células controles entre las 72 y 120 h, pero a partir de las 48 h no se ve señal para ninguno de los marcadores.

Por otra parte al evaluar la presencia de N-cadherina en la línea celular SK-N-SH (Fig. 13), se puede observar que en las imágenes correspondientes a la condición control hay una disminución de la intensidad en la Faloidina entre las 72 y 96 h y a su vez se observa a las 96 h la presencia de N-cadherina, la cual se ve asociada a un cambio morfológico en las células que presentan la proteína; mientras que en las células que recibieron tratamiento, no se observa señal para ninguno de los marcadores. En la figura 14 en la cual también se evaluó la presencia de N-cadherina en la línea celular 3T3-L1, se observó disminución en la intensidad de la Faloidina entre las 96 y 120 h; sin embargo, en esta línea celular no se identificó presencia de N-cadherina. Mientras que en las células que recibieron tratamiento no se observa señal para ninguno de los marcadores.

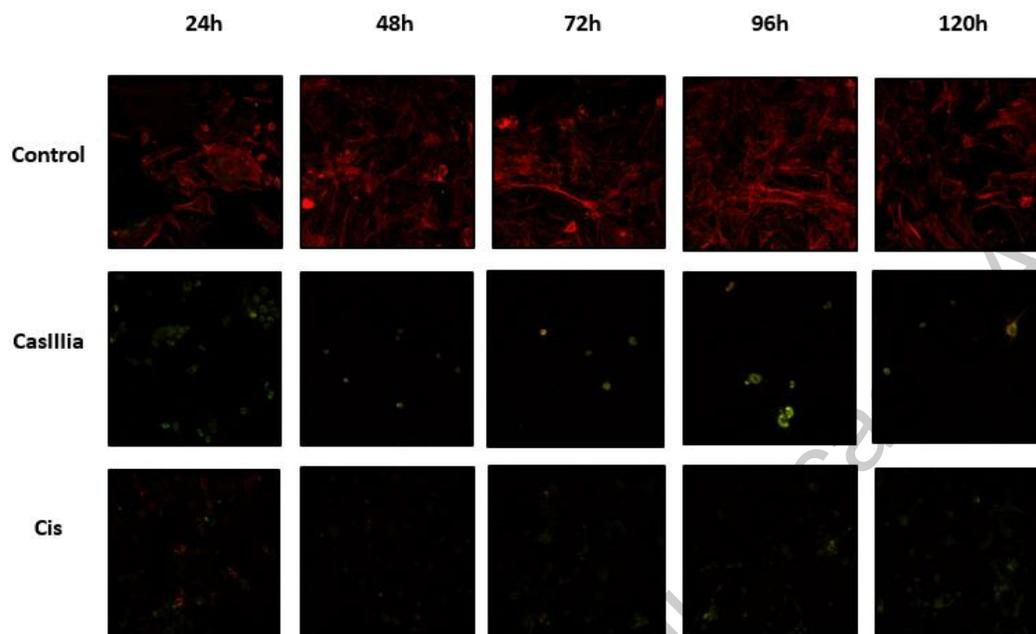


Figura 11. Presencia de E-cadherina en la Línea celular SK-N-SH. Las imágenes muestran los resultados de la fluorescencia en los cuales se aprecia en color rojo la Faloidina como marcador de citoesqueleto y en color verde, la E-cadherina (20x).

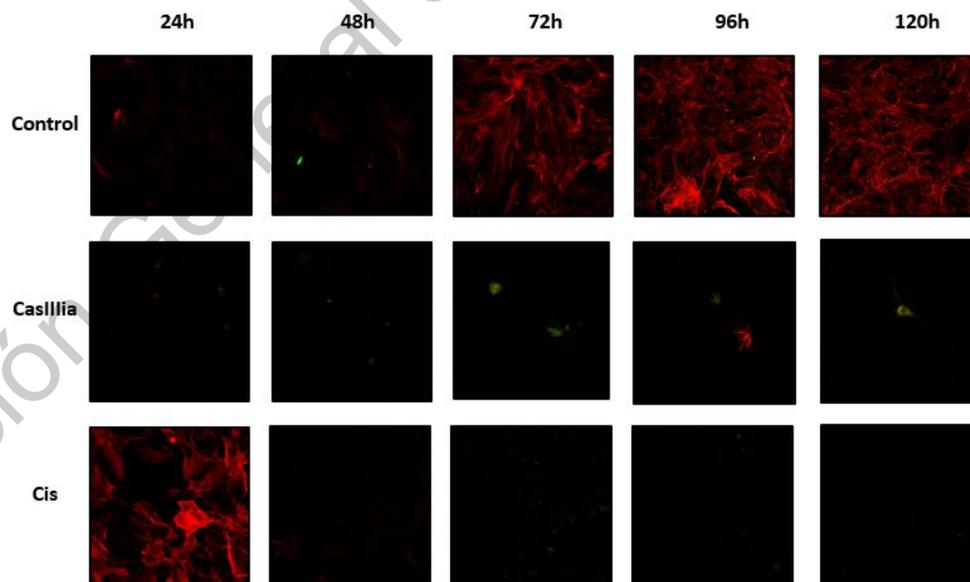


Figura 12. Presencia de E-cadherina en la Línea celular 3T3-L1. Las imágenes muestran la presencia inmunofluorescente de Faloidina (rojo) como marcador de citoesqueleto y en color verde la proteína de interés (E-cadherina) (20x).

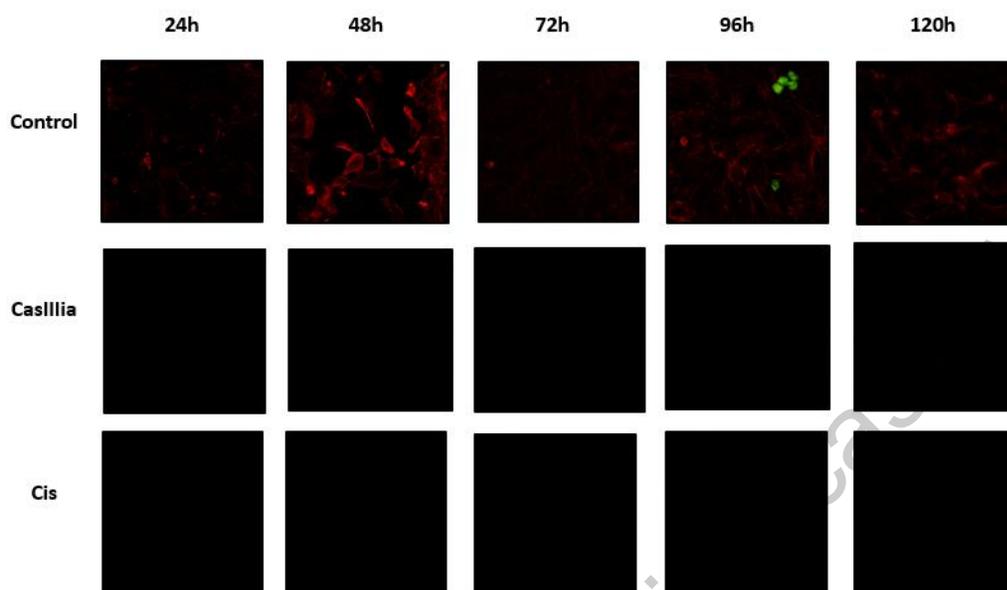


Figura 13. Presencia de N-cadherina en la línea celular SK-N-SH. Las imágenes muestran los resultados de la fluorescencia en los cuales se aprecia en color rojo la Faloidina como marcador de citoesqueleto y en color verde, la N-cadherina (20x).

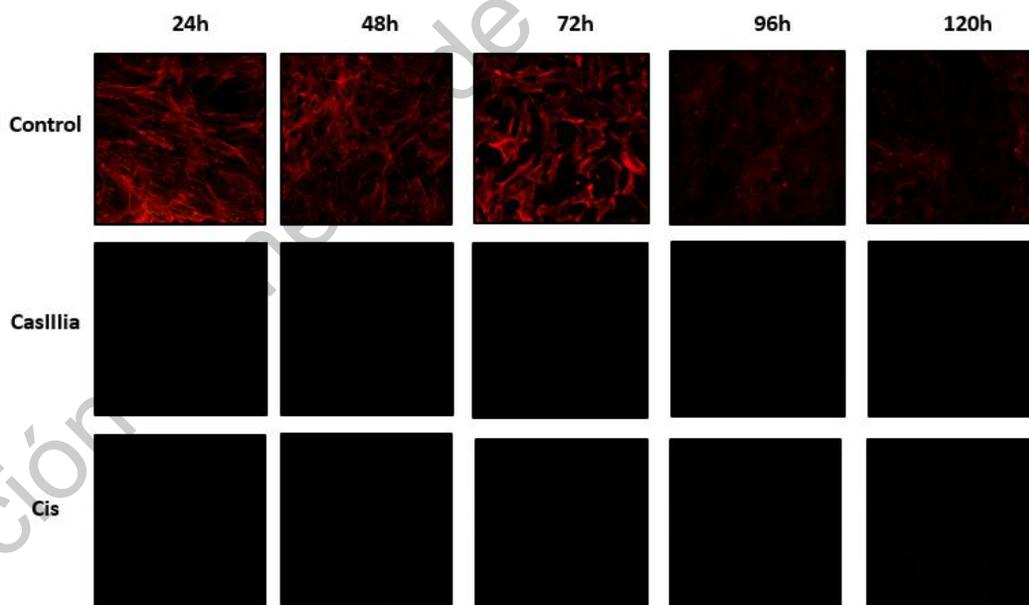


Figura 14. Presencia de N-cadherina en la línea celular 3T3-L1. Las imágenes muestran la presencia inmunofluorescente de Faloidina (rojo) como marcador de citoesqueleto y en color verde la proteína de interés (N-cadherina) (20x).

Capacidad de migración. - Los resultados arrojados por el ensayo de la herida (Fig. 15a y b) muestran que las células control en ambas líneas tuvieron un cierre total de la herida a las 96 h. Por su parte, el tratamiento con CasIllia fue incompatible con la supervivencia celular y por lo tanto con la migración en la línea SK-N-SH, compartiendo características con lo sucedido en la línea celular 3T3-L1 al ser tratada con Cisplatino, la cual mostró un menor número de células respecto al control y a partir de las 96 h se observó una tendencia a cruzar la línea de cierre de la herida sin lograr completarse a las 120 h. A su vez, la línea 3T3-L1 tratada con CasIllia cruza la línea media a las 72 h, y a partir de las 96 h logra el cierre de la herida.

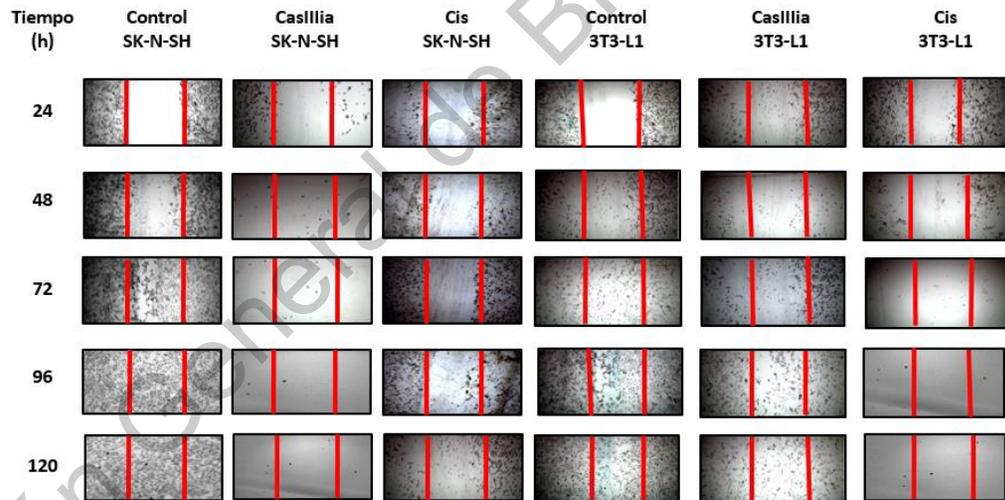


Figura 15 a. Dinámica de cierre de la herida. Esta figura muestra las imágenes tomadas en tiempos discretos (24, 48, 72, 96 y 120 h) para el análisis de la migración celular, las líneas rojas delimitan la zona en la cual se hizo la herida. (4x).

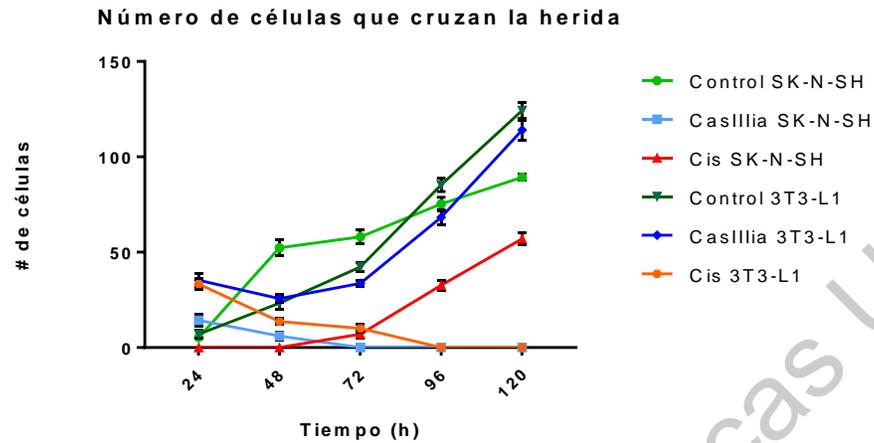


Figura 15 b. Células que cruzan la herida. La gráfica muestra los resultados obtenidos del conteo de células que cruzaron la a la zona de la herida Los resultados se presentan como Media \pm SD; *P < 0.0001.

Por otra parte, la Figura 16 muestra los resultados de la presencia de PCNA como marcador de inicio de proliferación celular. Se puede observar que en ambas líneas hay presencia de PCNA en las células control; en la línea celular SK-N-SH tratada con CasIIIa no se observa presencia de PCNA a las 24 h y a partir de las 48 h ya no hay células. También se observa un aumento de la proteína mencionada en las células tratadas con cisplatino y en el caso de la línea celular 3T3-L1, a partir de las 72 h ya que no se observan las células; por otra parte, la línea 3T3-L1 con CasIIIa muestra aumento en la presencia de PCNA a las 72 h y disminuye a las 96 y 120 h.

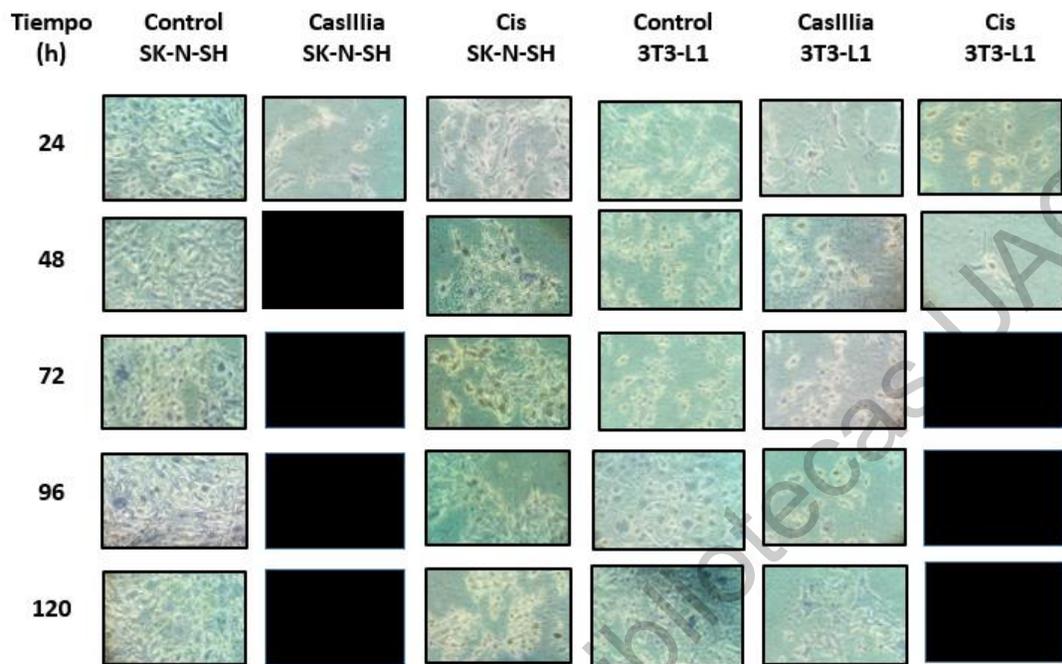


Figura 16.- Presencia de PCNA en el ensayo de la herida. Se observa en color marrón la presencia de PCNA y como contraste en morado (hematoxilina) el citoplasma; los rectángulos negros corresponden a los tiempos en los cuales ya no hay población celular para evaluar (40x).

Capacidad de invasividad.- En cuanto a la acción invasiva (Fig. 17) se observó un aumento progresivo en el número de células en relación con el tiempo; a sus vez que las células que recibieron tratamiento con CasIIIa o Cisplatino no cruzaron la membrana del transwell. Otro de los factores importantes en la invasividad celular es la vía Wnt/ β -catenina de acuerdo a los resultados encontrados (Figs. 18 y 19). En las condiciones control se ve como a las 24 h, β -catenina tiene una localización perinuclear y a partir de las 48 h no hay presencia de la proteína de interés. En las células tratadas con CasIIIa, a las 24 h observamos características similares a las encontradas en las células control; sin embargo, a las 48 h las células tienen un cambio morfológico y se observa co-localización de Faloidina y β -catenina, y a partir de las 72 h, se ve una reducción significativa del número celular y únicamente se observa presencia de β -catenina. Por otra parte, en las células tratadas con cisplatino se puede observar la presencia de Faloidina y DAPI a las 24h y a partir

de las 48 h, únicamente se identifica β -catenina; sin embargo, la proteína va disminuyendo su presencia de forma dependiente del tiempo.

Por último, en la evaluación del ciclo celular se observa en las Figuras 20 a 25, una tendencia en ambas líneas celulares a permanecer en la fase G0-G1 del ciclo celular. De forma específica, a las 24 y 48 h (Figs. 20 y 21), se observa en las gráficas que la cantidad de células que pasan a G2-M es similar en la línea celular 3T3-L1 en condiciones control y en las tratadas con Cis. A las 72 h (Fig. 22) ambas líneas celulares tratadas con CasIIIa, mantienen el 100% de su población en la fase Go-G1, y en el caso de la línea celular 3T3-L1 tratada con Cis se observó una drástica reducción de la población celular la cual no pudo ser detectada por el equipo. Por otra parte, a las 96 h (Fig 23) se observó que en la línea celular 3T3-L1 la población control y la tratada con CasIIIa están pasando a G2-M en un número similar. A las 120 h (Fig. 24) se observa que la línea celular 3T3-L1 tratada con CasIIIa mantiene el 100% de su población en la fase G0-G1, y en el caso de la línea SK-N-SH tratada con Cis, podemos observar como su población se ubica en la fase G0-G1 y son pocas las células que logran concluir el ciclo celular en comparación con los tiempos anteriores. Por último, a las 144 h (Fig. 25) existe un alza en el número de células que están logrando finalizar el ciclo celular en este tiempo. Por otra parte, cabe señalar que en el caso de la línea celular SK-N-SH tratada con CasIIIa hubo una baja significativa en la población, por lo cual no fue posible la lectura en el equipo

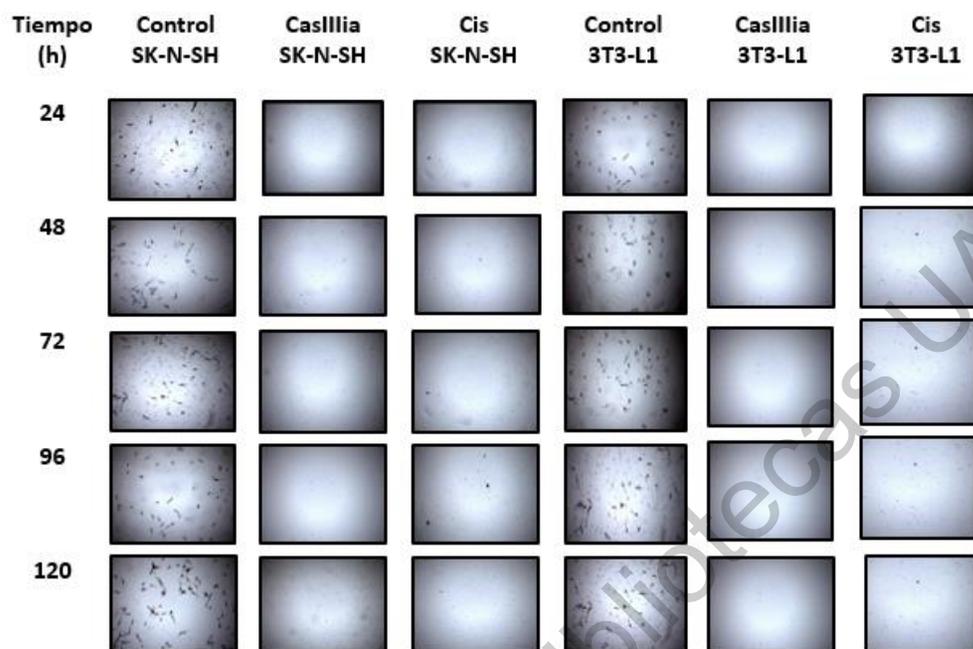


Figura 17 a. Dinámica de invasividad. En las células control en ambas líneas se observa un aumento progresivo de células en relación con el tiempo. Mientras que las células tratadas con CasIIIa o Cisplatino no cruzaron la membrana del transwell. (4x),

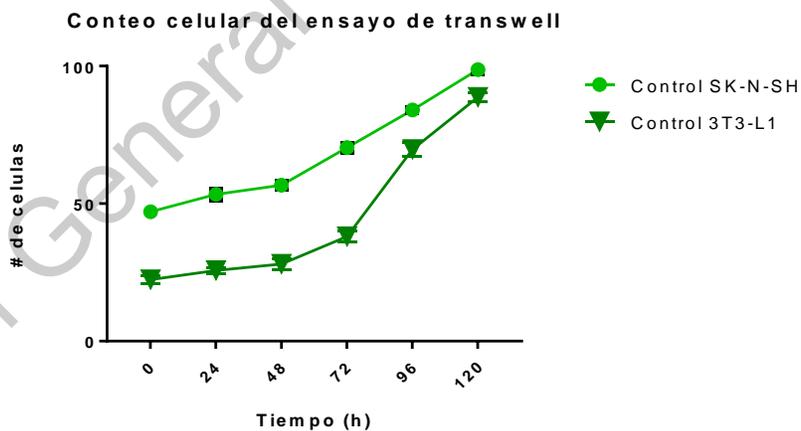


Figura 17 b. Dinámica de invasividad. En la gráfica se encuentran los datos del número de células que atravesaron a membrana (24 h) en relación con el tiempo.

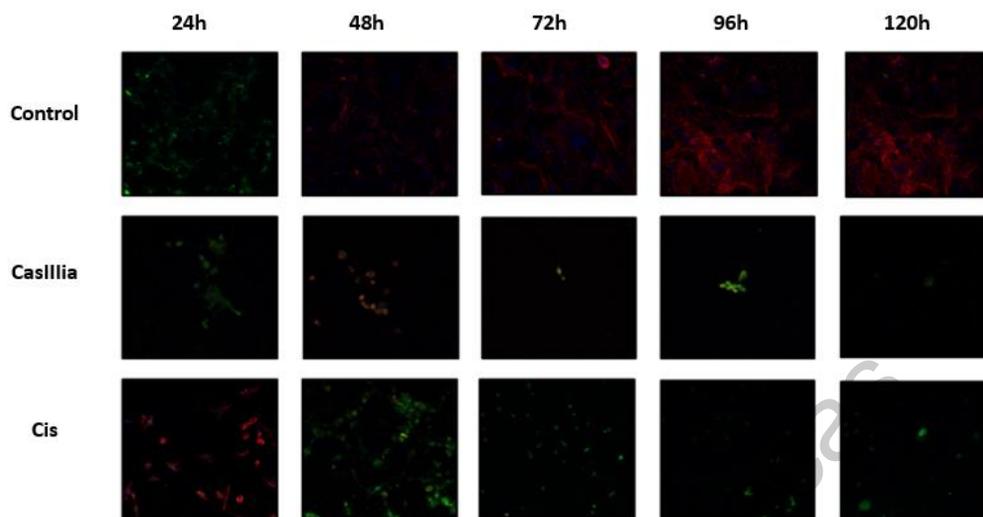


Figura 18.- Translocación nuclear de β -catenina en la línea celular SK-N-SH. En color rojo se observa el marcador del citoplasma (Faloidina), en color azul se observa el núcleo (DAPI) y en verde se observa β -catenina. El análisis de las imágenes en el microscopio de fluorescencia se realizó en un plano x-y por tal motivo no es posible ver los tres marcadores en la misma imagen. (20x).

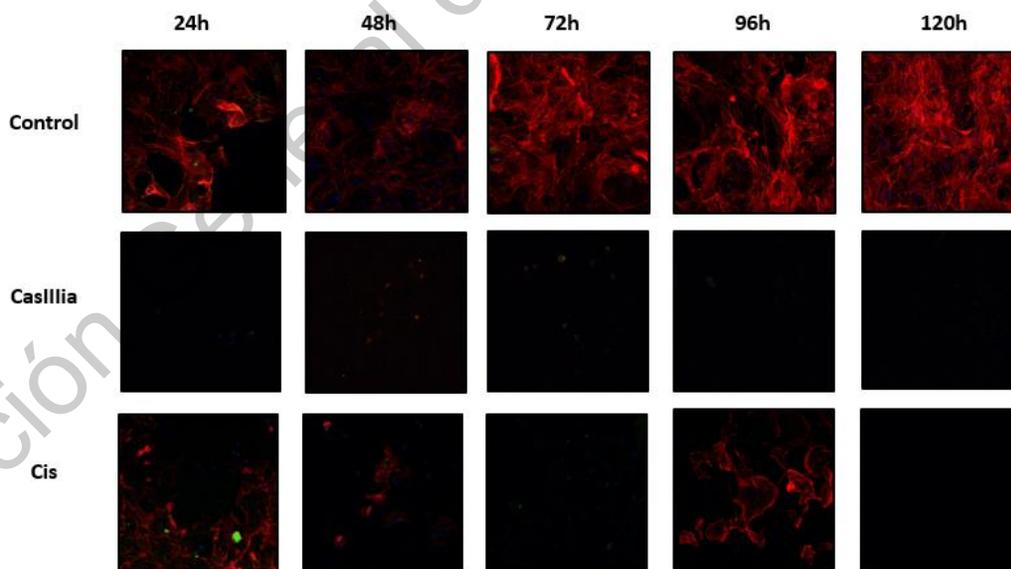


Figura 19.- Translocación nuclear de β -catenina en la línea celular 3T3-L1 En color rojo se observa el marcador del citoplasma (Faloidina), en color azul se observa el núcleo (DAPI) y en verde se observa β -catenina. El análisis de las imágenes en el microscopio de fluorescencia se realizó en un plano x-y por tal motivo no es posible ver los tres marcadores en la misma imagen. (20x).

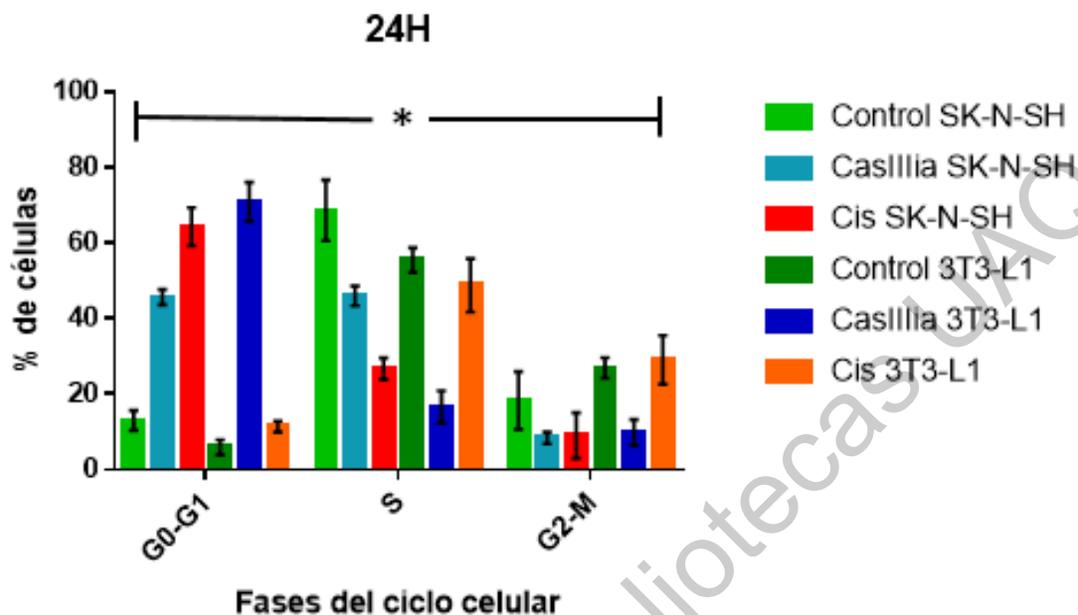


Figura 20.- Gráfica de ciclo celular a las 24 h. En la gráfica se observa la distribución de acuerdo a la línea celular, la fase del ciclo celular y el tratamiento. Los resultados se presentan como Media \pm SD; *P < 0.0001.

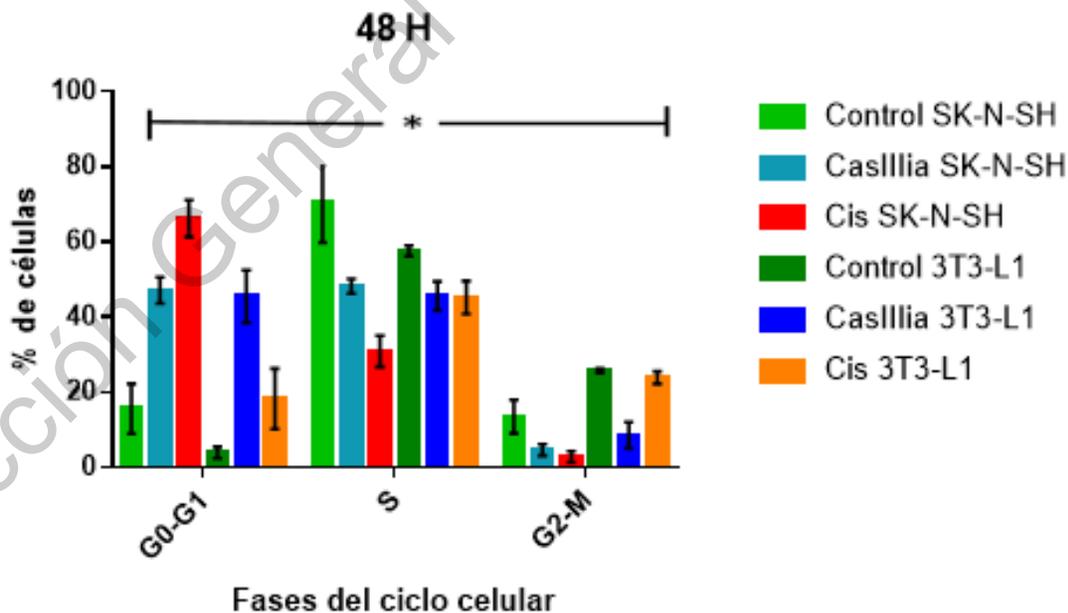


Figura 21.- Gráfica de ciclo celular a las 48 h. En la gráfica se observa la distribución de acuerdo a la línea celular, la fase del ciclo celular y el tratamiento. Los resultados se presentan como Media \pm SD; *P < 0.0001.

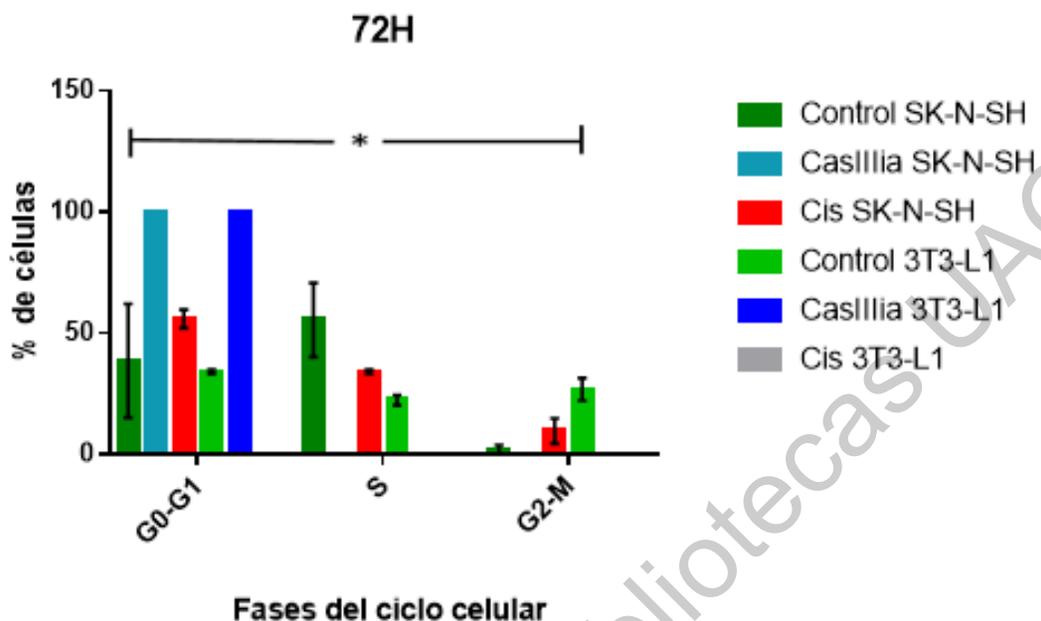


Figura 22.- Gráfica de ciclo celular a las 72 h. En la gráfica se observa la distribución de acuerdo a la línea celular, la fase del ciclo celular y el tratamiento. Los resultados se presentan como Media \pm SD; *P < 0.0001.

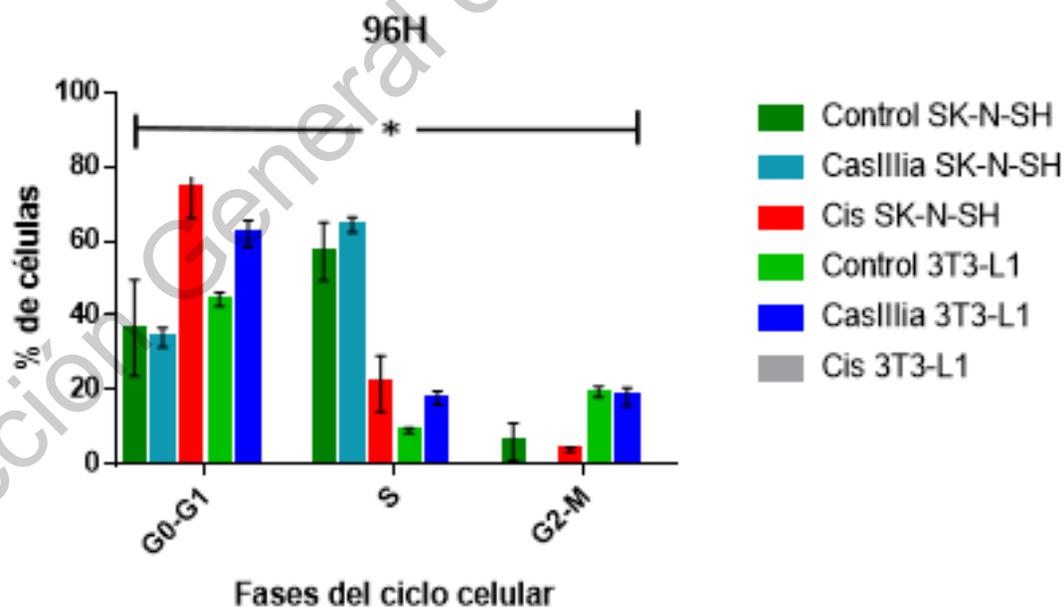


Figura 23.- Gráfica de ciclo celular a las 96 h. En la gráfica se observa la distribución de acuerdo a la línea celular, la fase del ciclo celular y el tratamiento. Los resultados se presentan como Media \pm SD; *P < 0.0001.

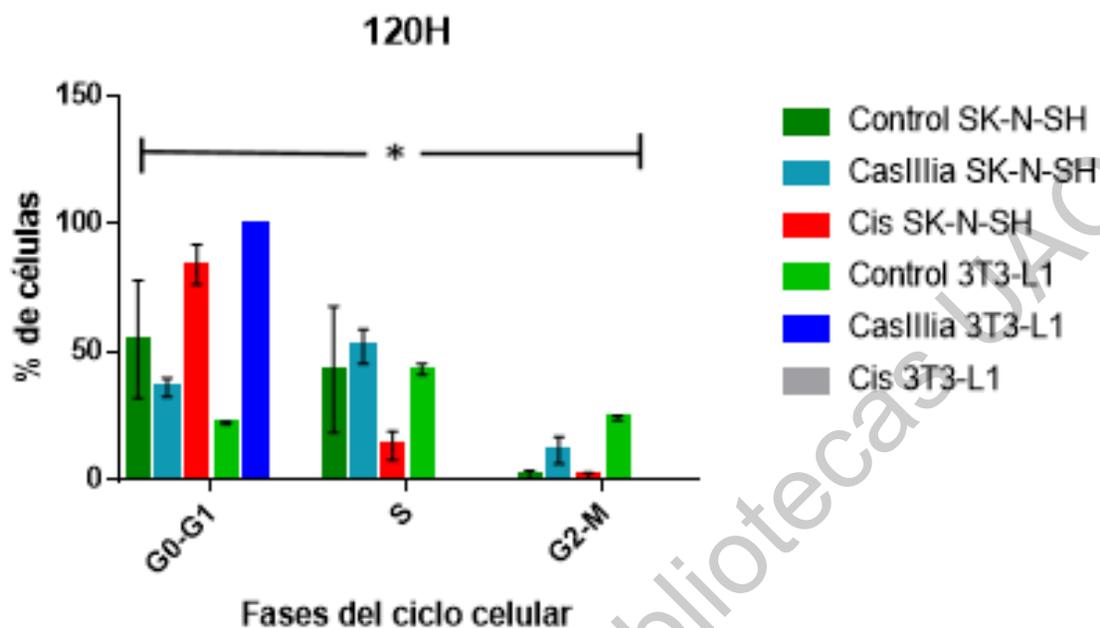


Figura 24.- Gráfica de ciclo celular a las 120 h. En la gráfica se observa la distribución de acuerdo a la línea celular, la fase del ciclo celular y el tratamiento. Los resultados se presentan como Media \pm SD; *P < 0.0001.

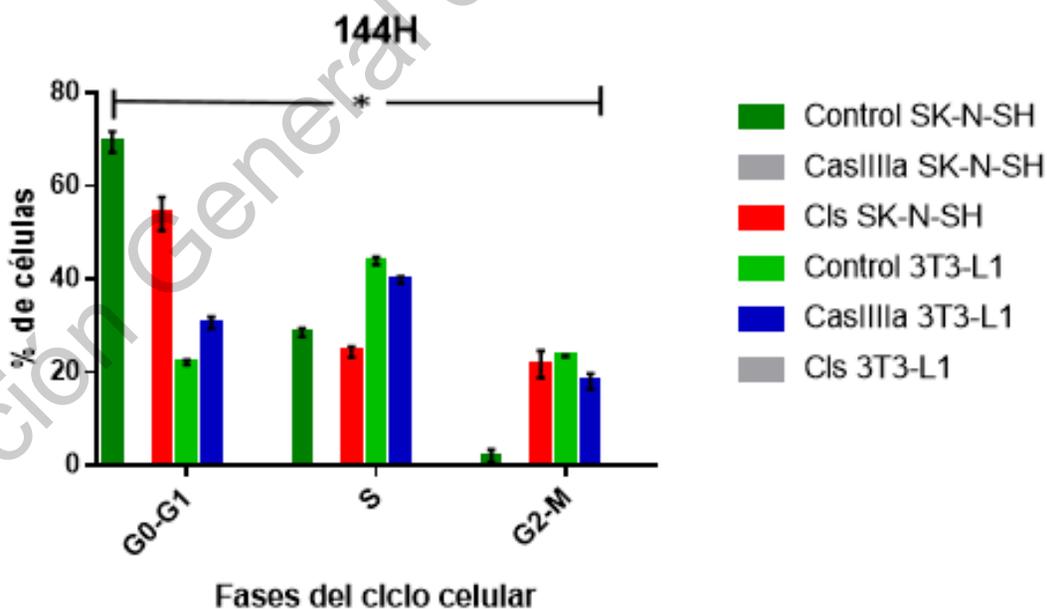


Figura 25.- Gráfica de ciclo celular a las 144 h. En la gráfica se observa la distribución de acuerdo a la línea celular, la fase del ciclo celular y el tratamiento. Los resultados se presentan como Media \pm SD; *P < 0.0001.

7.- DISCUSIÓN

El tratamiento para el Neuroblastoma de alto riesgo ha tenido grandes avances; sin embargo, estos no son suficientes ya que los pacientes que se encuentran dentro de esta clasificación continúan teniendo un pronóstico pobre con una supervivencia a largo plazo menor al 50% (3).

De los pacientes que sobreviven, el 54% presenta reacciones adversas relacionadas con el tratamiento que les fue administrado, y entre los daños se encuentran problemas endócrinos así como daño renal y hepático (29). Por tal motivo, el análisis de los agentes quimioterapéuticos en células sanas además de las células tumorales es importante. Es así que en este proyecto de investigación se trabajó con la línea celular 3T3-L1 de fibroblastos de ratón que son células sanas de crecimiento acelerado, así como con la línea celular tumoral de neuroblastoma SK-N-SH. Entre los resultados obtenidos encontramos que después de 24 h de tratamiento con CasIIIa las células sanas requieren una dosis mayor para llegar a su CL₅₀ en comparación con el Cisplatino. Lo contrario sucede en las células tumorales en las cuales es necesaria una dosis mayor de Cisplatino; por otra parte la CasIIIa tiene un efecto citostático similar en las líneas celulares con las que se trabajó sin embargo la línea 3T3-L1 logra recuperarse del tratamiento esto se observó en el ensayo de la herida y en la evaluación del ciclo celular, lo cual no sucede en las células tratadas con Cisplatino; por lo cual se infiere que hay selectividad tumoral, aunque se desconoce el mecanismo por el cual actúa.

Si bien la selectividad tumoral es importante, no se deben perder de vista los efectos que tienen sobre las células tumorales que son el principal foco de atención. La transición epitelio-mesénquima es un proceso importante para la adquisición de la motilidad celular y con ello se favorece la supervivencia celular (37,38). Para que esto sea posible es necesaria la expresión de N-cadherina la cual ya ha sido

reportada en la línea celular SK-N-SH (39) sin embargo de acuerdo a nuestros resultados se encuentra ausente (Figs. 13 y 14) lo cual coincide con lo reportado previamente por nuestro grupo de trabajo respecto a las cadherinas en tiempos cortos, y que se mantiene a largo plazo (40). Aunado a esto, otros grupos de investigación han encontrado cambios significativos en la morfología celular asociados a la disminución en la presencia de proteínas citoesqueléticas y de forma específica en la actina, así como en las uniones epiteliales lo cual relacionaron a una regulación positiva de vimentina, ambas asociadas a una capacidad invasiva significativamente mayor (37,38).

Sin embargo, encontramos aumento en la expresión de E-cadherina en las células tratadas con CasIIIa a pesar del cambio morfológico de las células (indicativo de la pérdida de adhesión). Lo cual indicaría que los factores de transcripción tales como TWIST, ZEB y SNAI que activan la acumulación de marcadores mesenquimales como vimentina y N-Cadherina, a la par que reprimen los marcadores epiteliales como la E-cadherina (37,38) no se están expresando en las células de NB tratadas con CasIIIa lo que puede llevar a las células a la muerte por pérdida de adhesión debido a que no se lleva a cabo la TEM. Esto concuerda con lo identificado en las células tratadas con CasIIIa ya que pierden por completo la capacidad de migración después de 48 h, tiempo en el que ya no se encuentra ninguna célula. Lo cual a su vez podría asociarse con dificultad para generar resistencia a la CasIIIa por parte de las células tumorales, favoreciendo el tratamiento de los pacientes ya que la resistencia a fármacos es uno de los problemas centrales en la administración de tratamientos(4), como lo muestran estudios realizados sobre la resistencia a fármacos y en específico al Cisplatino los cuales reportan que en los casos donde el tumor presenta regresión, este quimioterapéutico pierde efectividad ya que las células generan resistencia asociada con el aumento de mecanismos de reparación del DNA, acumulación celular alterada y aumento de la inactivación del fármaco (5).

Por ultimo un factor importante a evaluar en cuanto a la invasividad celular es la vía Wnt/ β -catenina la cual contribuye a la malignidad de células cancerosas (41) y que al encontrarse bloqueada, compromete la viabilidad celular en líneas de NB (42). De acuerdo a los resultados encontrados, no hay presencia de β -catenina en las células que recibieron tratamiento con CasIIIa, lo cual puede estar relacionado principalmente con dos factores: primero la falta de expresión de la proteína β -catenina puede estar asociada a los tiempos de medición que se tomaron (42) y el segundo factor puede ser la presencia de Gsk3 β , la cual pudo formar el complejo de destrucción y de este modo evitar la presencia de β -catenina, y con ello su traslocación nuclear (41).

Por otra parte, se ha encontrado que TRIM59 es una proteína que regula positivamente la vía de señalización Wnt / β -catenina y al estar inhibida, se favorece la degradación de β -catenina disminuyendo la proliferación celular (42). Si bien TRIM59 no fue evaluada en este proyecto, los resultados obtenidos coinciden con lo encontrado en la evaluación del ciclo celular. Aunado a esto, se pudo observar que las células de NB que recibieron tratamiento con CasIIIa se mantienen principalmente en la fase G0-G1 del ciclo celular lo cual está asociado a la resistencia a los agentes quimioterapéuticos (10). Sin embargo, a pesar de ser un proceso ya reportado en otros tratamientos, lo significativo en el caso de las células tratadas con Casiopeínas es que se presenta a las 72 h, e incluso a las 144 h el volumen celular es tan reducido en las muestras (menos de 500,000 células) que el citómetro de flujo no puede realizar la lectura, lo cual podría indicar que existe cierto mecanismo por el cual la CasIIIa sigue actuando en las células a tiempos prolongados como lo hace a tiempos cortos(33,36).

8.- CONCLUSIONES

La administración de CasIIIa en dosis única, tiene un efecto citostático en tiempos prolongados impidiendo la transición epitelio-mesénquima, y como resultado inhibe la capacidad de migración e invasividad en un modelo *in vitro* de células de neuroblastoma, además de presentar selectividad tumoral respecto a células sanas de crecimiento acelerado, aunque aún se desconoce el mecanismo completo por el cual actúa.

8.- REFERENCIAS

1. Bosse KR, Maris JM. Advances in the translational genomics of neuroblastoma: From improving risk stratification and revealing novel biology to identifying actionable genomic alterations. *Cancer*. 2016;122(1):20–33.
2. Fulda S. Cell death-based treatment of glioblastoma review-Article. *Cell Death Dis* [Internet]. 2018;9(2):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-017-0060-1>
3. Pinto NR, Applebaum MA, Volchenboum SL, Matthay KK, London WB, Ambros PF, et al. Advances in risk classification and treatment strategies for neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 2015;33(27):3008–17.
4. Casinelli G, LaRosa J, Sharma M, Cherok E, Banerjee S, Branca M, et al. N-Myc overexpression increases cisplatin resistance in neuroblastoma via deregulation of mitochondrial dynamics. *Cell Death Discov* [Internet]. 2016;2(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.82>
5. Amable L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacol Res* [Internet]. 2016;106:27–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.001>
6. Ruiz-Azuara L. L. United States Patent. 1992. p. vol. RE 35,458.
7. Ruiz-Azuara L. L. United States Patent. 1996. p. vol. 5, 576, 326.
8. Ruiz-Azuara L. L. Mark Tittle Casiopeína. p. Reg. 407543 SECOFI.
9. Marín-Hernández A, Gracia-Mora I, Ruiz-Ramírez L, Moreno-Sánchez R. Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas®) on mitochondrial functions. *Biochem Pharmacol*. 2003;65(12):1979–89.
10. Lyle S, Moore N. Quiescent, slow-cycling stem cell populations in cancer: A review of the evidence and discussion of significance. *J Oncol*. 2011;2011.
11. Serment-Guerrero J, Cano-Sanchez P, Reyes-Perez E, Velazquez-Garcia F, Bravo-Gomez ME, Ruiz-Azuara L. Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopeínas®. *Toxicol Vitro* [Internet].

- 2011;25(7):1376–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2011.05.008>
12. Maris JM, Hogarty MD BR et al. Neuroblastoma. *Lancet*. 2007;369:2106–20.
 13. Lucena JN, Alves MTS, Abib SCV, De Souza GO, De Castro Neves RP, Caran EMM. Clinical and epidemiological characteristics and survival outcomes of children with neuroblastoma: 21 years of experience at the Instituto de Oncologia Pediátrica, in São Paulo, Brazil | Aspectos clínicos, epidemiológicos e sobrevida de crianças com neuro. *Rev Paul Pediatr*. 2018;36(3):254–60.
 14. Tolbert VP, Coggins GE, Maris JM, Maris JM. Genetic susceptibility to neuroblastoma. *Curr Opin Genet Dev*. 2017;42:81–90.
 15. Zhao Z, Ma X, Shelton SD, Sung DC, Li M, Hernandez D, et al. A combined gene expression and functional study reveals the crosstalk between N-Myc and differentiation-inducing microRNAs in neuroblastoma cells. *Oncotarget*. 2016;7(48).
 16. Guo W, Polich ED, Su J, Gao Y, Christopher DM, Allan AM, et al. HHS Public Access. *Cell Rep*. 2015;11(10):1651–66.
 17. Lingala SM, Ghany MGMMhs. Risk Stratification and Treatment. 2016;25(3):289–313.
 18. Botzer LE, Maman S, Sagi-Assif O, Meshel T, Nevo I, Yron I, et al. Hexokinase 2 is a determinant of neuroblastoma metastasis. *Br J Cancer* [Internet]. 2016;114(7):759–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2016.26>
 19. Wang X-H, Wu H-Y, Gao J, Wang X-H, Gao T-H, Zhang S-F. <p>IGF1R facilitates epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in neuroblastoma via the STAT3/AKT axis</p>. *Cancer Manag Res*. 2019;Volume 11:5459–72.
 20. Zhang Y, Wang LF, Gao JH, Li L, Jiang P, Lv X, et al. Clinical significance of epithelial–mesenchymal transition–related molecules in lung adenocarcinoma. *Curr Oncol* [Internet]. 2019;26(2):121–7. Available from: <https://current-oncology.com/index.php/oncology/article/view/4471>
 21. Hu P, Chu J, Wu Y, Sun L, Lv X, Zhu Y, et al. NBAT1 suppresses breast cancer metastasis by regulating DKK1 via PRC2. *Oncotarget* [Internet]. 2015;6(32):32410–25. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/5609>
 22. Fonseka P, Liem M, Ozcitti C, Adda CG, Ang CS, Mathivanan S. Exosomes from N-Myc amplified neuroblastoma cells induce migration and confer chemoresistance to non-N-Myc amplified cells: implications of intra-tumour heterogeneity. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2019;8(1). Available from: <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1597614>
 23. Brasch J, Katsamba PS, Harrison OJ, Ahlsén G, Troyanovsky B, Indra I, et al. HHS Public Access. 2018;23(6):1840–52.
 24. Becker J, Wilting J. WNT signaling, the development of the sympathoadrenal–paraganglionic system and neuroblastoma. *Cell Mol Life Sci*.

2018;75(6):1057–70.

25. Fabian J, Opitz D, Althoff K, Lodrini M, Hero B, Volland R, et al. MYCN and HDAC5 transcriptionally repress <i>CD9</i> to trigger invasion and metastasis in neuroblastoma. *Oncotarget* [Internet]. 2016;7(41). Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/11662>
26. Schroeder, A., Heller, D., Winslow M et al. Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:39–50.
27. Yunsheng Xu, 1, 2 Qianwen Zhang, 3 Fan Lin, 3 Li Zhu, 4 Fangfang Huang, 4 Liang Zhao 5 and Rongying Ou4. Casiopeina II-gly acts on lncRNA MALAT1 by miR-17-5p to inhibit FZD2 expression via the Wnt signaling pathway during the treatment of cervical carcinoma. *Oncol Rep*. 2019;1365–1379.
28. Berthold F, Spix C, Kaatsch P, Lampert F. Incidence, Survival, and Treatment of Localized and Metastatic Neuroblastoma in Germany 1979–2015. *Pediatr Drugs*. 2017;19(6):577–93.
29. Geurten C, Geurten M, Hoyoux C, Lebrethon MC. Endocrine consequences of neuroblastoma treatment in children: 20 years' experience of a single center. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2019;32(4):347–54.
30. De Vizcaya-Ruiz A, Rivero-Müller A, Ruiz-Ramirez L, Howarth JA, Dobrota M. Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: Casiopeina II. *Toxicology*. 2003;194(1–2):103–13.
31. Carvallo-Chaigneau F, Trejo-Solís C, Gómez-Ruiz C, Rodríguez-Aguilera E, Macías-Rosales L, Cortés-Barberena E, et al. Casiopeina III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *BioMetals*. 2008;21(1):17–28.
32. Valencia-Cruz AI, Uribe-Figueroa LI, Galindo-Murillo R, Baca-López K, Gutiérrez AG, Vázquez-Aguirre A, et al. Whole Genome Gene Expression Analysis Reveals Casiopeína-Induced Apoptosis Pathways. 2013;8(1).
33. García-Ramos JC, Gutiérrez AG, Vázquez-Aguirre A, Toledano-Magaña Y, Alonso-Sáenz AL, Gómez-Vidales V, et al. The mitochondrial apoptotic pathway is induced by Cu(II) antineoplastic compounds (Casiopeínas®) in SK-N-SH neuroblastoma cells after short exposure times. *BioMetals*. 2017;30(1):43–58.
34. Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, López-Ramírez SY, García-García JD, Rodríguez-Zavala JS, Ruiz-Ramírez L, et al. Casiopeina II-gly and bromopyruvate inhibition of tumor hexokinase, glycolysis, and oxidative phosphorylation. *Arch Toxicol*. 2012;86(5):753–66.
35. Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J*. 2007;274(6):1393–418.
36. ADRIANA VÁZQUEZ-AGUIRRE, ANLLELY GRIZETT GUTIÉRREZ RME, ENRIQUE HERNÁNDEZ-LEMUS LR-A and CM. Autophagy Promotes Survival of CHP-212 Neuroblastoma Cells Treated With Casiopeínas®. *Anticancer Res*. 2019;39(7):3687–95.

37. Shao J, Gao Z, Huang W, Lu Z. The mechanism of epithelial-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 in neuroblastoma cells. 2017;(24):1623–33.
38. Piskareva O, Harvey H, Nolan J, Conlon R, Alcock L, Buckley P, et al. The development of cisplatin resistance in neuroblastoma is accompanied by epithelial to mesenchymal transition in vitro. *Cancer Lett* [Internet]. 2015;364(2):142–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.05.004>
39. Lammens T, Swerts K, Derycke L, Craemer A De, Brouwer S De, Benoit Y, et al. N-Cadherin in Neuroblastoma Disease: Expression and Clinical Significance. 2012;7(2):1–8.
40. Alejandra Idan Valencia-Cruz, Laura I. Uribe-Figueroa, Rodrigo Galindo-Murillo, Karol Baca-López, Anllely G. Gutiérrez, Adriana Vázquez-Aguirre, Lena Ruiz-Azuara, Enrique Hernández-Lemus CM. Whole Genome Gene Expression Analysis Reveals Casiopeína-Induced Apoptosis Pathways. *PLoS One*. 2013;
41. Chen J, Wang P, Cai R, Peng H, Zhang C, Zhang M. SLC34A2 promotes neuroblastoma cell stemness via enhancement of miR-25/Gsk3 β -mediated activation of Wnt/ β -catenin signaling. *FEBS Open Bio*. 2019;9(3):527–37.
42. Chen G, Chen W, Ye M, Tan W, Jia B. TRIM59 knockdown inhibits cell proliferation by down-regulating the Wnt / β -catenin signaling pathway in neuroblastoma. 2019;0(November 2018):1–10.