



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON YODO  
MOLECULAR EN LA INVASIÓN Y METÁSTASIS DE  
CÉLULAS TRONCALES EN XENOTRASPLANTES DE  
NEUROBLASTOMA HUMANO”**

**TESIS INDIVIDUAL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**JOSÉ URIEL RANGEL CHÁVEZ**

DIRIGIDA POR

**DRA. ALICIA IRASEMA MENDIETA TREJO**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2023.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Efecto de la suplementación con yodo molecular en la  
invasión y metástasis de células troncales en  
xenotrasplantes de neuroblastoma humano

**por**

José Uriel Rangel Chávez

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

**Clave RI:** FQLIN-272421



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON YODO  
MOLECULAR EN LA INVASIÓN Y METÁSTASIS DE  
CÉLULAS TRONCALES EN XENOTRASPLANTES DE  
NEUROBLASTOMA HUMANO”**

**TESIS INDIVIDUAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**JOSÉ URIEL RANGEL CHÁVEZ**

**DIRIGIDA POR**

**DRA. ALICIA IRASEMA MENDIETA TREJO**

**SINODALES**

**DRA. ALICIA IRASEMA MENDIETA TREJO**  
DIRECTORA

\_\_\_\_\_

**DRA. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

**DRA. CARMEN YOLANDA ACEVES**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

**M. en C. ALMA DELIA BERTADILLO JILOTE**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

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

Financiado por el Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría 2021 (FOPER-FQU02382) de la Universidad Autónoma de Querétaro, así como del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-202322 y 205920) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco el apoyo técnico recibido de: MVZ. José Martín García Servín, Dra. Alejandra Castilla León y Dra. María A. Carbajo Mata encargados de la Unidad de Laboratorio Universitario de Bioterio. Así como, de la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos y Erika de los Cobos de la Unidad de Microscopía (INB-UNAM) y del técnico laboratorista de la Unidad de Metabolismo Energético Laura Inés García.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Dra. Carmen Aceves y Dra. Brenda Anguiano por la oportunidad recibida para trabajar dentro del Instituto de Neurobiología, por la confianza brindada y por las sugerencias o comentarios recibidos durante la realización de este trabajo. Así mismo, agradezco al Dr. Fernando Montes, a la Dra. Evangelina Delgado González y el resto de los colaboradores del laboratorio de Metabolismo Energético por las asesorías recibidas.

Agradezco a la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos de la Unidad de Microscopía (INB-UNAM) por el apoyo técnico recibido. Así como, a los encargados de la unidad de Laboratorio Universitario de Bioterio: MVZ. José Martín García Servín, Dra. Alejandra Castilla León y Dra. María A. Carbajo Mata por las capacitaciones sobre el manejo animales de experimentación y por el permiso brindado para el uso de las instalaciones del bioterio.

Finalmente, pero no menos importante agradezco a los integrantes de mi sínodo: Dra. Laura Cristina Berumen Segura, Dra. Alma Delia Bertadillo Jilote, Dra. Carmen Aceves y de manera especial a mi directora de tesis la Dra. Alicia Irasema Mendieta Trejo por la paciencia, dedicación y asistencia recibida durante el desarrollo de mi tesis de licenciatura.

## **DEDICATORIA**

Con mucha alegría dedico este trabajo a todas aquellas personas que han estado presente durante mi desarrollo personal y académico. Principalmente haciendo mención de mis padres: José Luis Rangel Meza y Olgaldia Chávez Reséndiz, a mi hermano Víctor Jesús Rangel Chávez, a mis tíos: Valentín Chávez, Helida Trejo, Ana Bertha Rangel, Julia Torres, a mis abuelos: Félix Rangel, Paulina Meza, Marcelina Reséndiz y Cayetano Chávez y al resto de mi familia que no mencione, por los consejos, los recuerdos, las enseñanzas, el apoyo emocional y económico que he recibido de ustedes. Siempre estaré inmensamente agradecido por lo que han hecho por mí.

De manera especial, hago mención de mis compañeros de carrera y amigos de vida: Juan Pablo, Juan Jesús, Valeria Jacqueline, Leonela Sofía, Abigail, Camila y Jazmín Lizeth, agradezco los buenos recuerdos que he vivido a su lado, así como, su apoyo incondicional durante gran parte de la carrera. Finalmente, me gustaría hacer mención de Denis por mostrarme la importancia del esfuerzo constante y por estar en momentos difíciles de mi vida.

## RESUMEN

El neuroblastoma (NB) es un tumor sólido extracraneal, con alta heterogeneidad celular, resistencia, reincidencia y progresión metastásica. La suplementación con dosis micromolares de yodo molecular ( $I_2$ ) ha demostrado ejercer efectos antiproliferativos y apoptóticos en células tumorales en diferentes tipos de cáncer como mama, ovario, próstata y neuroblastoma. En este trabajo, se evaluó el efecto del  $I_2$  en la capacidad de formación de tumores y el potencial de invasión y metástasis a partir de xenotrasplantes de células SK-N-BE(2) generados con células en monocapa (m) y/o neuroesfera (n) (enriquecidas de células troncales). Los resultados mostraron que la suplementación de  $I_2$  disminuyó el volumen de tumores monocapa ( $3505 \pm 310.6$  vs  $2090 \pm 580.6$  mm<sup>3</sup>) y de tumores neuroesfera ( $9268 \pm 1036$  vs  $2972 \pm 658.1$  mm<sup>3</sup>). Además, disminuyó la expresión del marcador de troncalidad CD44 en 29%, así como, la expresión de VEGF ( $0.1416 \pm 0.03201$  vs  $0.04977 \pm 0.01092$ ) y los eritrocitos extravasculares ( $397 \pm 17$  vs  $159 \pm 17$ ) en tumores neuroesfera. También, se observó un aumento en la expresión de los receptores PPAR $\gamma$  en monocapa ( $0.001037 \pm 0.0004$  vs  $0.00594 \pm 0.0011$ ) y en neuroesfera ( $0.000182 \pm 0.00006565$  vs  $0.0066 \pm 0.0001927$ ); así como, la disminución de la expresión de genes asociados a mal pronóstico y potencial invasivo (WNT, MMP9 y VIM). Estos resultados sugieren que el  $I_2$  favorece la diferenciación de células madre y disminuye la capacidad de invasión y metástasis en tumores SK-N-BE(2) generados con células en monocapa y neuroesfera.

# ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
<b>RESUMEN</b>	
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	I
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	III
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	IV
<b>I. ANTECEDENTES</b>	1
I.1 Formación de la cresta neural	1
I.1.1 Transición epitelial mesenquimal	2
I.1.2 Migración de las células de la cresta neural	4
I.2 Neuroblastoma	6
I.2.1 Características moleculares del neuroblastoma	8
I.3 Células madre	10
I.3.1 Células madre cancerosas	11
I.4 Metástasis	12
I.5 Yodo	16
I.5.1 Metabolismo del yodo	17
I.5.2 Propiedades del yodo	18
<b>II. HIPÓTESIS</b>	22
<b>III. OBJETIVOS</b>	23
III.1 Objetivo general	23
III.2 Objetivos específicos	23
<b>IV. METODOLOGÍA</b>	24
IV.1 Materiales	24
IV.1.1 Material biológico	24
IV.2 Métodos	24
IV.2.1 Establecimiento de xenotrasplantes y tratamiento	24
IV.2.2 Progresión tumoral	25
IV.2.3 Sacrificio y extracción de tumores	26



IV.2.4 Inclusión de tejidos	26
IV.2.5 Tinción de hematoxilina y eosina	27
IV.2.6 Deconvolución	28
IV.2.7 Inmunofluorescencia	28
IV.2.8 Extracción de ADN	29
IV 2.9 Retrotranscripción	30
IV.2.10 PCR en tiempo real	30
IV. 2.11 Análisis estadístico	30
IV.3 Diseño experimental	32
<b>V. RESULTADOS</b>	34
V.1 Efecto antitumoral del I <sub>2</sub> en xenotrasplantes de neuroblastoma humano	34
V.2 Disminución del volumen tumoral en xenotrasplantes formados con células troncales de SK-N-BE(2)	36
V.3 Evaluación de marcadores de troncalidad en células de neuroblastoma humano	39
V.4 Evaluación del potencial de invasión en tumores de neuroblastoma enriquecidos con células troncales	41
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	44
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	51
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	52

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
Cuadro 1. Secuencia y temperaturas de alineación de oligonucleótidos para qPCR	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Formación de la cresta neural durante la neurulación	2
Figura 2. Transición Epitelial Mesenquimal	3
Figura 3. Migración de los precursores de la Cresta Neural	6
Figura 4. Microambiente tumoral	12
Figura 5. Proceso general de la metástasis	16
Figura 6. Síntesis de las hormonas tiroideas T3 y T4	18
Figura 7. Mecanismos propuestos de acción del I <sub>2</sub>	21
Figura 8. Grupos de xenotrasplantes generados con células SK-N-BE(2)	25
Figura 9. Diseño experimental	33
Figura 10. Porcentaje de peso corporal en ratones con xenotrasplantes SK-N-BE(2)	35
Figura 11. Incidencia de xenotrasplantes de neuroblastoma humano	36
Figura 12. Volumen tumoral de xenotrasplantes SK-N-BE(2)	37
Figura 13. Efecto del I <sub>2</sub> en la formación de vasculatura aberrante e infiltración de eritrocitos extravasales	39
Figura 14. Efecto el I <sub>2</sub> en la diferenciación de células troncales	40
Figura 15. Efecto del I <sub>2</sub> en la potencialidad de invasión y diferenciación de células troncales	43

## I. ANTECEDENTES

### I.1 Formación de la cresta neural

Durante el desarrollo embrionario (embriogénesis) ocurre la formación de la cresta neural (NC), una estructura transitoria constituida por un grupo de células migratorias llamadas células de la cresta neural (NCC). Las NCC son una población embrionaria transitoria exclusiva de embriones vertebrados y de carácter multipotente que migran grandes distancias en distintos flujos dependiente de su posición a lo largo del eje anteroposterior (AP) dentro del embrión (Szabó y Mayor, 2018; Tomolonis y col., 2018).

La formación de la NC inicia entre la placa neural (NP) una estructura diferenciada del ectodermo situada detrás de la estructura de la notocorda que se convertirá en el sistema nervioso central y el ectodermo no neural (NNE), que posteriormente dará paso a la epidermis; todo esto ocurre en una región denominada Borde de la Placa Neural (NPB). A medida que avanza el proceso de neurulación, la NP se invagina de manera que los pliegues neurales en elevación que contienen precursores de la cresta neural forman los bordes neurales (ver Figura 1). Como consecuencia las células premigratorias de la cresta se encuentran inicialmente dentro del neuroepitelio. Una vez que ocurre la elevación y cierre del tubo neural, los precursores se sitúan en la cara dorsal del tubo neural y es en donde se ven involucradas interacciones complejas entre vías de señalización y factores de transcripción como: Wingless/Int (Wnt), la vía de señalización de proteína morfogénica ósea (BMP), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), la señalización de ácido retinoico (RA) y la señalización Notch que permiten la expresión de genes especificadores de NC que inducen a las células que residen en el NPB a convertirse en NCC al unirse al receptor tirosina quinasa TGF $\beta$  tipo 2 y receptores acoplados a proteínas G que regulan los genes diana aguas abajo (Stuhlmiller y García-Castro, 2012; Bronner y LeDouarin, 2012; Roth y col., 2021; Zhang y col., 2019).

Cuando las células precursoras salen del tubo neural, es el momento en el que se vuelven reconocibles como auténticas células de la cresta neural con características migratorias y de carácter multipotente (Lumb y Schwarz, 2015).

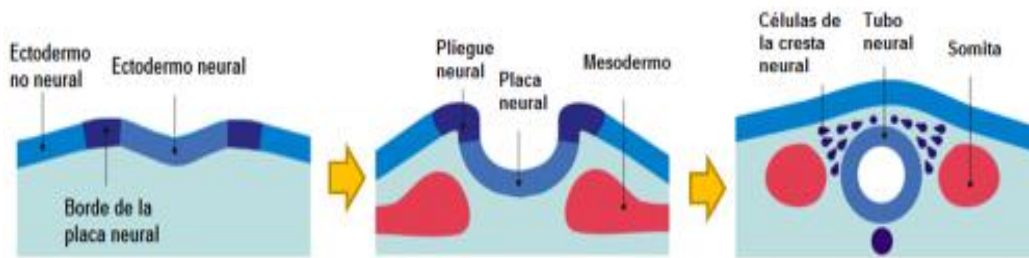


Figura 1. Formación de la cresta neural durante la neurulación (editado de Bronner y LeDouarin, 2012).

### I.1.1 Transición epitelial a mesenquimatosa

La transición epitelial mesenquimal (EMT) es un proceso que ocurre en múltiples etapas durante la embriogénesis temprana y es clave para que las NCC puedan abandonar el neuroepitelio y comenzar la migración como células mesenquimatosas individuales y dar paso a una amplia variedad de células y tejidos que incluyen células musculares lisas, hueso, neuronas o ganglios (Delloye-Bourgeois y Castellani, 2019; Chen y col., 2017).

La EMT se entiende como un programa multifacético de cambios fenotípicos que permite que una célula epitelial polarizada que se caracteriza por estar conectada entre sí con otras células por uniones estrechas, gap y adherentes, consiga experimentar múltiples cambios bioquímicos que le permitan asumir un fenotipo de célula mesenquimatosa con áreas muy reducidas de contacto célula-célula, sin la polarización del citoesqueleto de actina, con morfología en forma de huso y que se encuentra incrustada en una matriz extracelular tridimensional (Dongre y col., 2019; Kalcheim, 2015; Mittal, 2018).

La inducción de las células a un fenotipo mesenquimatoso (ver Figura 2) puede ser activada por diversos estímulos inflamatorios que incluyen factores de crecimiento como: el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), el factor de crecimiento hepatocitario (HGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), otros estímulos son la presencia de un ambiente hipóxico o componentes de la matriz extracelular como el colágeno I, que actúan a través de factores de transcripción del desarrollo como SNAIL, SLUG, TWIST o ZEB1/2 (Zhang y col., 2019).

Durante el proceso del EMT, a medida que las células cambian de fenotipo, la expresión de E-cadherina se reprime y se expresan marcadores que están asociados con el estado de las células mesenquimales, en particular cadherina neural (N-cadherina), vimentina y fibronectina (Ahlstrom y col., 2009; Dongre y col., 2019) provocando que la arquitectura de actina epitelial se reorganice y las células adquieran motilidad y capacidades de migración como la sobreexpresión de metaloproteinasas de matriz (MMP) que pueden degradar las proteínas de matriz extracelular como MMP2 y MMP9 (Huang y col., 2022; Kalluri y Weinberg, 2009; Mittal, 2018).

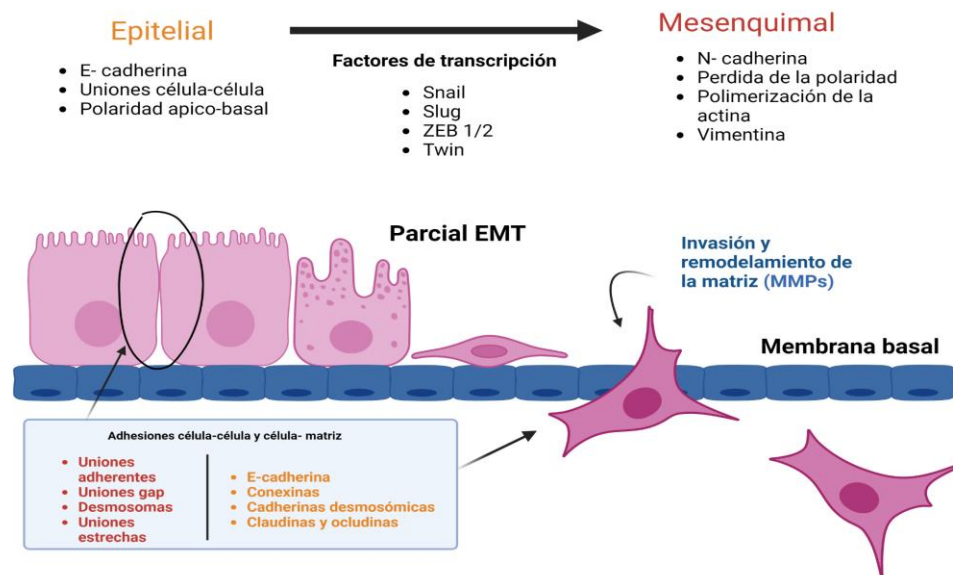


Figura 2. Transición epitelial mesenquimal (editado de Leggett y col., 2021).

Aunque la transición epitelial a mesenquimal es un proceso fundamental en el desarrollo multicelular normal, su uso por las células tumorales para movilizarse e invadir es un modelo de estudio complejo y fundamental que se abordará en posteriores subtemas de este trabajo.

### I.1.2 Migración de las células de la cresta neural

Las NCC se suelen clasificar en 4 subpoblaciones distintas que, a la vez, permiten definir cuatro dominios funcionales principales de la migración y diferenciación de la cresta neural;

- 1) Cresta neural cefálica: Se trata de NCC que migran dorso lateralmente para producir la mesénquima craneofacial que se diferencia en cartílago, hueso, neuronas craneales, glía y tejidos conectivos de la cara.
- 2) Cresta neural sacra y vagal: Son NCC que generan los ganglios parasimpáticos (entéricos) del intestino.
- 3) Cresta neural cardíaca: Constituyen un grupo de NCC dan lugar a la formación de melanocitos, neuronas, cartílago o tejido conectivo.
- 4) Cresta neural del tronco: Este grupo de NCC pueden tomar dos vías principales durante su migración; la vía dorsolateral hacia el ectodermo y la vía ventrolateral a través de la mitad anterior de cada esclerotomo.

Es de particular importancia centrar la atención en la región del tronco de la cresta neural, en concreto con la migración del grupo de NCC conocido como precursores simpatoadrenales (ver Figura 3), un grupo de NCC que migra de manera ventrolateral hacia la aorta dorsal (Szabó y Mayor, 2018).

Esta población surge entre las somitas 18-24 y una vez que alcanzan la aorta dorsal, un subgrupo llamado precursores simpáticos permanecen cerca de la aorta mientras que un segundo grupo de precursores llamados cromafines suprarrenales migran más ventralmente para asociarse con las células de la corteza suprarrenal que se originan en el mesodermo de la placa lateral (Tsubota y Kadomatsu, 2018; Weigele

y Bohnsack, 2020). La diferenciación de los precursores simpatoadrenales permite la aparición de neuronas simpáticas, neuronas parasimpáticas, neuronas entéricas, neuronas sensoriales, células de Schwann y melanocitos (Yang y col., 2020).

La migración de las NCC está regulada por una cooperativa red de factores extrínsecos e intrínsecos entre los que destacan el gen SOX10 un miembro de la familia de factores de transcripción HMB-box relacionados con SRY (Lai y col., 2021) que regula el desarrollo de la NC y determina el destino celular. Otro factor importante son las proteínas BMP, en particular BMP-4 y BMP-7, factores secretados por la aorta dorsal, esenciales para la generación del linaje simpaticoadrenal y la segregación de los progenitores (Tsubota y Kadomatsu, 2018). Otros factores que también se ven implicados en el destino celular, son un grupo de oncogenes entre los que se encuentran MYCN, ALK y PHOX2B (Johnsen y col., 2019).

La expresión de MYCN durante la diferenciación se regula a la baja y las células precursoras simpatoadrenales o células progenitoras maduran en diferentes tipos de células del linaje celular neural (Otte y col., 2021). Por su parte no se comprende del todo bien el papel fisiológico de ALK aunque su patrón de expresión durante la embriogénesis se encuentra elevada y apunta a una función en el desarrollo del sistema nervioso (Du y col., 2018; Holla y col., 2017). Se sabe que el agotamiento de ALK conduce a cambios en la neurogénesis y la proliferación neuronal en varios modelos animales (Borenäs y col., 2021; Palmer y col., 2009). Finalmente, PHOX2B es considerado un controlador que regula la maduración neuronal, su patrón de expresión se ha asociado a la baja como un indicador de diferenciación celular (Yang y col., 2016).

Cuando estas señales se encuentran alteradas debido a varios factores como anomalías cromosómicas que incluyen la ganancia segmentaria adquirida somáticamente de 17q, las deleciones homocigotas de 1p y 11q, la mutación puntual de ALK F1174L o la amplificación del gen MYCN que se piensa ocurre en etapas tempranas de la migración de las NCC, puede llevar a la proliferación desregulada, desdiferenciación y posterior formación de tumores sólidos derivados de



neuroblastos, conocidos como neuroblastomas (Cohen y col., 2020; Zafar y col., 2021).

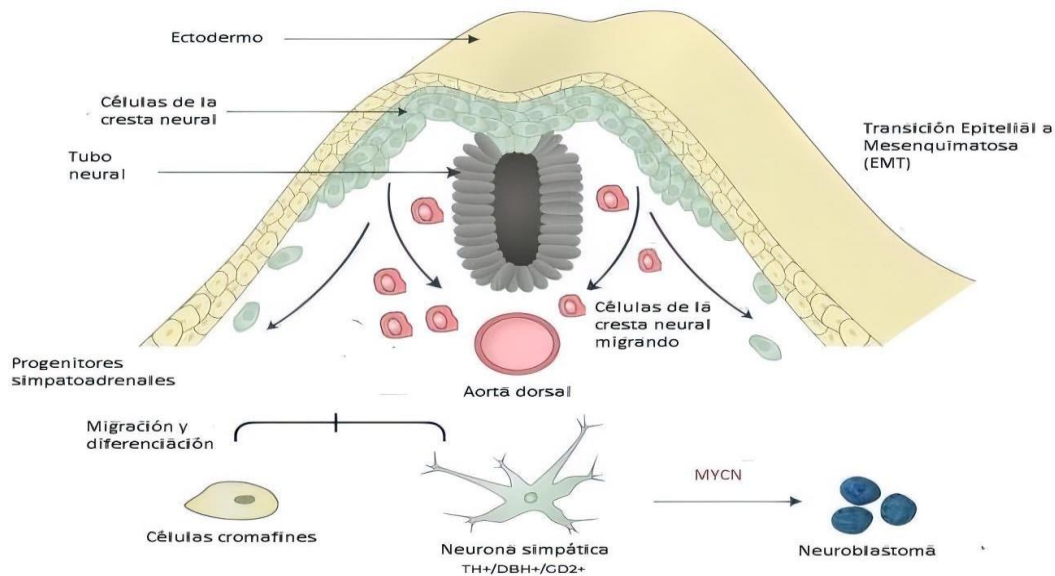


Figura 3. Migración de los precursores de la Cresta Neural (editado de Johnsen y col., 2019).

## 1.2 Neuroblastoma

El neuroblastoma (NB) es un tumor embrionario del sistema nervioso periférico. Se trata del tumor sólido extracraneal más común en la infancia y es la neoplasia más frecuente diagnosticada durante el primer año de vida. Representa el 6% de todos los tumores infantiles (Smith y Foster, 2018). Se forma durante la diferenciación de los precursores simpatoadrenales que migran ventralmente hacia la aorta dorsal (Tsubota y Kadomatsu, 2018). La patogénesis de NB se ha asociado con frecuencia con la desregulación epigenética de miRNAs hipermetilados y regulados a la baja (miRNA 34b-3p, miRNA 34b-5p) implicados en la regulación del ciclo celular, la

apoptosis y en el control de la expresión de MYCN, o a la interrupción de un programa de diferenciación de genes que ya se mencionaron anteriormente como: MYCN, PHOX2B, ALK, y vías de señalización que incluyen Wnt/ $\beta$ -Catenina o NOTCH (Barr, y Applebaum, 2018; Parodi y col., 2016). Se manifiesta frecuentemente como un tumor en las glándulas suprarrenales, sin embargo, los tumores de neuroblastoma también pueden presentarse en otras áreas del abdomen, el cuello y cerca de la columna vertebral, donde existen grupos de células nerviosas (Tolbert y Matthey, 2018).

Una característica distintiva del neuroblastoma debido a que provienen de progenitores pluripotentes o células madre fetales que adquieren propiedades de células madre cancerosas, es su alta heterogeneidad celular que se ve reflejada en el grado de agresividad, la resistencia a tratamientos o inclusive en una posible regresión espontánea (Gupta y col., 2021). Las combinaciones de estos factores pronósticos se utilizan para estratificar el riesgo de los pacientes e informar la asignación del tratamiento. Sin embargo, en todo el mundo se utilizan muchos sistemas de estadificación NB y clasificadores de riesgo diferentes. Una de las primeras clasificaciones la brindó el Sistema Nacional de Estadificación del Neuroblastoma (INSS) que definió 4 estadios con base en procedimientos quirúrgicos. En los primeros 3 estadios, el neuroblastoma se encuentra en el sitio primario donde apareció, la diseminación a ganglios linfáticos cercanos se puede o no presentar y es posible su extirpación total o parcial mediante cirugía. Por el contrario, en la etapa 4, el cáncer se ha diseminado a sitios distantes, como ganglios linfáticos, huesos, hígado, piel, médula ósea u otros órganos (Brodeur y col., 1993; Cangelosi y col., 2022). Recientemente el International Neuroblastoma Risk Group (INRG) introdujo una nueva clasificación (INRGSS) con dos etapas de enfermedad localizada (L1 y L2) y dos etapas de enfermedad metastásica (M y MS) que a diferencia del INSS es un sistema de clasificación clínica que se determina antes de cualquier tratamiento, incluida la cirugía. El INRGSS se basa en imágenes preoperatorias, prestando atención a si el tumor primario está afectado por uno o

más de los 20 factores de riesgo ya definidos por imágenes específicas (Irwin y col., 2021).

### I.2.1 Características moleculares del neuroblastoma

Para efectos de investigación se puede generalizar en 3 tipos de neuroblastoma (bajo, mediano y alto riesgo) en donde se toma relevancia la edad, las características genómicas como la amplificación de MYCN, la ploidía y las aberraciones cromosómicas segmentarias, así como la respuesta a la terapia convencional. Los neuroblastomas que suelen clasificarse o considerarse como tumores de bajo y mediano riesgo a menudo presenta remisión espontánea de la enfermedad o entran en esta clasificación cuando carecen de factores de riesgo adicionales como la amplificación del oncogén MYCN (Hero y col., 2008; Marrano y col., 2017). Recientemente, se ha descubierto que el factor de escisión y poliadenilación PCF11 influye en la poliadenilación alternativa y su regulación posnatal a la baja induce diferenciación en neuroblastos simpatoadrenales y se correlaciona con regresión espontánea y pronóstico favorable (Ogorodnikov y col., 2018).

Por otra parte, el neuroblastoma de riesgo alto posee características moleculares y citogenéticas como la amplificación del gen c-myc que ha demostrado generar resistencia al tratamiento con retinoides (Reynolds y col., 2000; Tan y col., 2021). El aumento de la fluidez de la matriz extracelular (ligado a la actividad de las metaloproteinasas MMP2 y MMP9 en la disolución de la membrana basal compuesta de colágeno tipo IV, laminina, entactina y proteoglicano BM1) ha demostrado incrementar la proliferación de células de neuroblastoma y la capacidad de invasión. La expresión de MYCN, un controlador maestro de la proliferación está fuertemente relacionado con el crecimiento, la diferenciación y supervivencia de las células del sistema nervioso central durante el desarrollo (Lam y col., 2010). Otras características que se han asociado con el grado de riesgo del neuroblastoma son las ya mencionadas ganancia del cromosoma 17q, las deleciones de los cromosomas 1p y 11q que se encuentran comúnmente dentro de las alteraciones

genéticas que se asocian con pronósticos poco favorables, así como la hiperploidía, las alteraciones genéticas de pérdida de función (mutaciones somáticas y variaciones de nucleótido único) de ATRX, que codifica proteínas de remodelación de la cromatina en la región telomérica o la hipermetilación del promotor de la HOXA9 relacionada con la mortalidad en pacientes mayores en comparación con los bebés y la hipermetilación del gen proapoptótico TMS1, y el gen relacionado con el ciclo celular CCND2 que se ha correlacionado con tumores en estadio avanzado (Alaminos y col., 2004; Takita, 2021). Otros factores como la vascularización aumentan significativamente la posibilidad de metástasis en comparación con tumores en estadios 1 y 2 con menor presencia de vasos sanguíneos (Meitar y col., 1996).

A nivel fenotípico es frecuente identificar 3 variantes celulares presentes en las líneas de neuroblastoma humano (Croteau y col., 2021; Ross y col., 2003). Los más comunes son los neuroblastos simpatoadrenales (N), que forman agregados mal unidos de células pequeñas y redondeadas con procesos neuríticos cortos. El segundo tipo de neuroblastos son conocidos como precursores no neuronales sustrato-adherentes (S), se caracterizan por adherirse firmemente al sustrato y aparecen como células grandes y aplanadas con un núcleo prominente y abundante citoplasma. Finalmente, el tercer tipo de neuroblasto se denomina (I) porque su morfología es intermedia entre N y S, son células pequeñas, aplanadas y moderadamente adherentes con o sin procesos neuríticos, que forman agregados celulares que parece representar una célula madre más primitiva, un progenitor de células de tipo N o S, capaces tanto de autorrenovación como de diferenciación bidireccional (Ross y col., 2003; Ross y col., 2015).

Se ha demostrado previamente que el fenotipo celular es un determinante importante del potencial maligno en las células de neuroblastoma humano y los tumores (Bumpous y col., 2023; Walton y col., 2004). Dentro de esta clasificación las líneas celulares de neuroblastoma se han agrupado de la siguiente manera: tipo I: SK-N-BE(2)-C, SK-N-MM, SK-N-HM; tipo N: SK-N-BE(2)-M17, SH-SY5Y, KCN-69n, SK-N-BE(1)n; y tipo S: SH-EP1, LA1-5s, SMS-KCN y SK-N-BE(2)s en donde se ha

identificado que el fenotipo de células madre es al menos 5 veces más tumorigénico que cualquiera de los otros dos tipos mencionados (Ross y col., 2015; Chung y col., 2021).

### I.3 Células Madre

Inicialmente, muchos progenitores de la cresta neural tienen propiedades similares a las de las células madre, es decir se trata de células multipotentes, indiferenciadas, inmaduras, con capacidad de autorrenovación, pérdida de la adherencia celular, presentan marcadores de troncalidad como CD49, o la expresión de factores de transcripción como SOX2, NANOG y OCT4 (Liu y Cheung, 2016; Stemple y Anderson, 1992; Thomas y col., 2008;) pero se restringen progresivamente para formar diversos linajes celulares dependiendo, en gran medida, del lugar al que migran y se asientan como: en derivados del sistema nervioso periférico (SNP), derivados endócrinos, células de pigmento, tejido conectivo, cartílago y hueso facial (Bronner y LeDouarin, 2012; Dupin y col., 2018).

Las células madre o troncales se definen como aquellas células con una alta capacidad de renovación, es decir; se trata de células multipotentes indiferenciadas, capaces de dar lugar a todas las células de un tejido, órgano u organismo en particular (Reya y col., 2001). Pueden ser pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales (dependiendo el grado de indiferenciación). Lo que restringe su capacidad endógena de diferenciarse durante el desarrollo o después de una lesión a células completamente funcionales (Bahmad y col., 2021).

Inicialmente se clasificaron en 2 tipos de células madre; embrionarias pluripotentes y células madre adultas. El primero surge de un óvulo fertilizado y da lugar a organismos completos, mientras que el segundo representa células multipotentes específicas de tejido que residen en tejidos adultos y mantienen su equilibrio homeostático, mientras que actualmente se sigue un tercer tipo conocido como células madre cancerosas (CMC), células iniciadoras del cáncer (CIC) o células

troncales cancerosas (CTC), causantes de la heterogeneidad fenotípica y funcional (Tume, 2014; Walcher y col., 2020).

### I.3.1 Células Madre Cancerosas

Las CMC son un tipo de células quiescentes autorrenovables y de diferenciación indefinida que se identifican en la mayoría de los tipos de cánceres líquidos y sólidos, preexisten en cánceres primarios y se localizan dentro de los nichos tumorales que tienen un potencial para impulsar el crecimiento del cáncer, para reconstruir su heterogeneidad y contribuir a la aparición, expansión, recurrencia y metástasis de cualquier tumor después de someterse a un tratamiento (Marquardt y col., 2018; Walcher y col., 2020).

Las CMC se caracterizan por una división asimétrica: un CMC se divide en dos células hijas, de las cuales una seguirá siendo una célula de autorrenovación, mientras que la otra es competente para convertirse en una célula neoplásica diferenciada. Suelen compartir muchas de sus características definitorias con las células madre normales, incluida la inactividad relativa, los sistemas activos de reparación del ADN, la proliferación agresiva y la resistencia a los fármacos. Además, la frecuencia de las CMC aumenta con la progresión del tumor y puede variar entre un tipo de cáncer y otro (Visvader y Lindeman, 2008; Zhang y col., 2018).

El origen de las CMC se ha sugerido de tres maneras: en la primera su origen se debe a posibles cambios epigenéticos como metilaciones y desmetilaciones en el grupo de células madre/progenitoras (nicho) o incluso en las células diferenciadas; En el segundo caso, la aparición se debe a una reprogramación oncogénica espontánea en células somáticas; y por último, en la tercera situación, la activación del microambiente tumoral (ver Figura 4), células, moléculas y vasos sanguíneos que rodean y alimenta el tumor, proporcionan señales extracelulares que dan paso a su aparición (Dianat y col., 2018).

En el NB, la existencia de CMC se ha relacionado con la presencia de metástasis, resistencia al tratamiento quimioterápico y recidiva (Chang, 2016). Esta función se atribuye a la posesión de múltiples mecanismos, incluida la represión de la apoptosis, el aumento de la reparación del daño del ADN, la latencia conservada y la respuesta alterada a los fármacos. Las células madre cancerosas de neuroblastoma (NB-CMC) se suelen identificar en función de la morfología y los marcadores de superficie celular; en donde destacan los marcadores CD133, Nestina y CD44 (Walton y col., 2004; Chang, 2016).

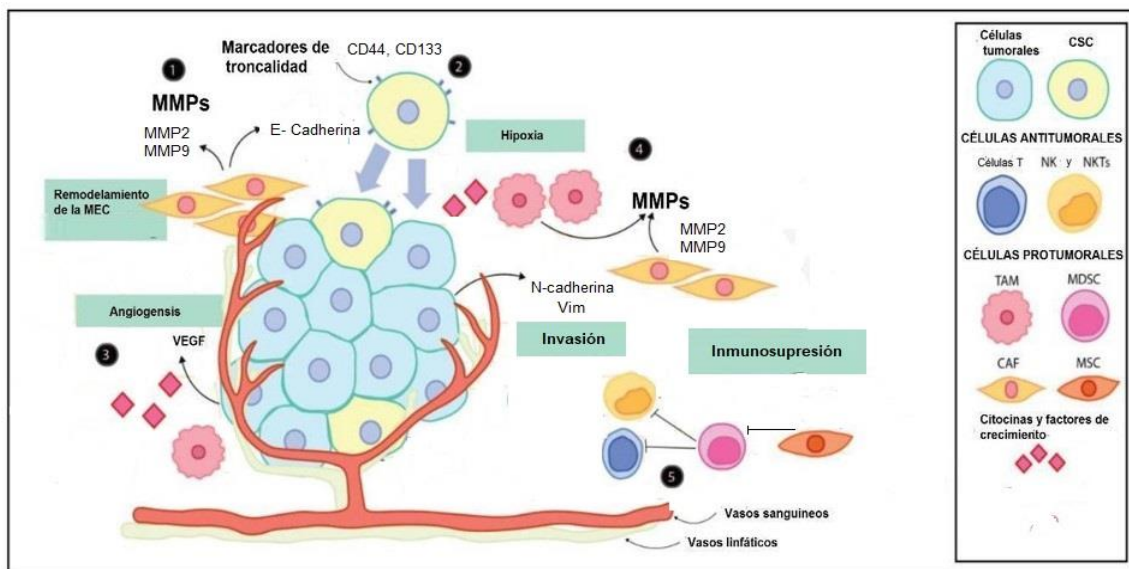


Figura 4. Microambiente tumoral (editado de Garner y Beierle, 2015). 1) Remodelamiento de la matriz extracelular (MMP2, MMP9, E-Cadherina). 2) Marcadores de superficie de células madre cancerosas (CD133, CD44, nestina). 3) Angiogénesis, VEGF/VEGFR implicada en supervivencia celular. 4) Microambiente estromal de apoyo para la colonización y el crecimiento de células tumorales metastásicas. 5) inmunosupresión mediante el reclutamiento de Treg, Breg, o TAM implicados en la promoción de la metástasis.

#### 1.4 Metástasis

Aproximadamente el 60% de los pacientes con neuroblastoma tienen enfermedad metastásica (Cohn y col., 2009; Taggart y col., 2011), que comúnmente involucra

médula ósea o hueso cortical, aunque también suele presentarse en tejido blando (Bhoopathi y col., 2019; Maris y col., 2007). Se ha reportado que los pacientes con neuroblastoma metastásico que tienen más de 1 año en el momento del diagnóstico tienen mayor riesgo de progresión de la enfermedad, debido a la presencia de marcadores de agresividad, presencia de células tumorales circulantes, tumores recidivantes y muerte (Liu y col., 2023). La metástasis es una de las principales causas de muerte a nivel mundial (Majidpoor y Mortezaee, 2021). Se define como el proceso de diseminación de las células cancerosas desde su origen a un órgano distante (Bakir y col., 2020; Lugassy y Escande, 1997), e involucra 6 pasos principales:

I) La invasión y migración donde las células cancerosas penetran la membrana basal y se disocian como células individuales o a través del microambiente estromal; durante esta etapa ocurre la activación del proceso de EMT adquiriendo así un fenotipo celular con la capacidad de moverse (Hapach y col., 2019).

II) El segundo paso importante es la degradación de la matriz extracelular donde las células malignas remodelan mecánicamente la ECM a través de un ciclo de protrusión, contracción celular, y degradación química utilizando metaloproteinasas a medida que migran (Wisdom y col., 2018).

III) En el tercer paso se ven involucrados dos procesos, la angiogénesis y la intravasación donde mediante la activación de factores como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor 1 inducible por hipoxia (HIF1) se forma vasculatura naciente durante la progresión del tumor, lo que permite el suministro de nutrientes y oxígeno, así como la eliminación de desechos (Ghouse y col., 2020). Debido a que la vasculatura tumoral recién formada es inmadura e hiperpermeable a causa de la falta de cobertura perivascular y de la membrana basal, provoca una fuga de proteínas plasmáticas que facilitan aún más la formación de nuevos vasos y facilita la metástasis al permitir el transporte de células tumorales a sitios distantes a través de los sistemas vascular y linfático durante la cual las células tumorales



atravesan las paredes de los vasos sanguíneos y entran en el torrente sanguíneo (Hapach y col., 2019).

IV) El cuarto paso consiste en la capacidad de las células tumorales para sobrevivir en el torrente sanguíneo, mejor conocidas en esta etapa como células tumorales circulantes (CTC). Estas células se detienen por oclusión física o adhesión rodante en sitios específicos de la microvasculatura para posteriormente extravasarse.

V) El quinto paso consiste en la extravasación, un proceso mediante el cual las células tumorales que salen del torrente sanguíneo atraviesan las paredes de los vasos sanguíneos hacia el tejido de un órgano en particular.

VI) Finalmente el último paso consiste en el establecimiento de células tumorales en los tejidos del órgano donde se llevará a cabo la formación de un nicho premetastásico para crear un entorno favorable para el crecimiento de células cancerosas (Brabletz y col., 2018).

El nicho premetastásico se puede definir como un microambiente tisular de apoyo y que experimenta una serie de cambios moleculares y celulares, apoyando así el asentamiento tumoral y promoviendo la metástasis tumoral (Liu y Cao, 2016; Luo y Xiao, 2023). Para que se pueda lograr la formación de un nicho premetastásico se ha sugerido la participación de tres factores cruciales los cuales se describen a continuación:

I) Los componentes primarios derivados del tumor: estos juegan un papel crucial en la preparación de los sitios distantes donde se desarrollará el tumor, como por ejemplo los factores secretados derivados del tumor (TDSF) como VEGF, HIF1 $\alpha$ , el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) o TGF- $\beta$  que permiten aumentar la actividad del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) en las células mieloides CD11b en tumores primarios y mejorar su capacidad de intravasación o

activar el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) que impulsa la movilización de células supresoras granulocíticas (Li y col., 2023).

II) Las células derivadas de la médula ósea movilizadas por el tumor (BMDC): se trata de células que remodelan el microambiente local secretando citoquinas inflamatorias, factores de crecimiento y moléculas proangiogénicas, que permiten la colonización y proliferación de células tumorales (Chen y col., 2022). En este grupo se pueden mencionar células inmunes como los linfocitos T (Treg), los neutrófilos, los linfocitos B (Breg) o los macrófagos asociados a tumores (TAM). Se ha reportado que la acumulación de células Treg en el nicho puede ser promovida por los TAM a través de la producción de la quimiocina derivada de macrófagos (CCL22) y por células Breg a través de la secreción de TGF- $\beta$  (Li y col., 2021). En el caso de los neutrófilos apoyan la extravasación y proliferación de células tumorales (Lee y col., 2019). Además, la producción de IL-1 $\beta$  provocada por la interleucina-17 $\beta$  liberada por células T y  $\delta$  favorece la expansión sistémica y la polarización de los neutrófilos para formar un nicho premetastásico e impulsar de esta forma la metástasis en el cáncer de mama (Coffelt y col., 2015; Fares y col., 2020).

III) El microambiente estromal local del huésped: Consiste en los elementos estructurales de las células y sus componentes moleculares, incluidos fibroblastos, células endoteliales, matriz extracelular y vasculatura, que son necesarios para la arquitectura del tejido conectivo y la homeostasis (Coffelt y col., 2015; Mhaidly y Mechta-Grigoriou, 2020).

Ante la latente necesidad de desarrollar nuevas terapias para el tratamiento de tumores agresivos de neuroblastoma que generalmente terminan en metástasis, la evidencia reciente pone en relevancia el uso del yodo en dosis micromolares (200  $\mu$ m), en particular su forma diatómica (I<sub>2</sub>), en el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Sus propiedades reportadas son de gran interés en la búsqueda de nuevos fármacos que permitan incrementar la tasa de éxito de las terapias convencionales y que se abordaran en los siguientes subtemas.

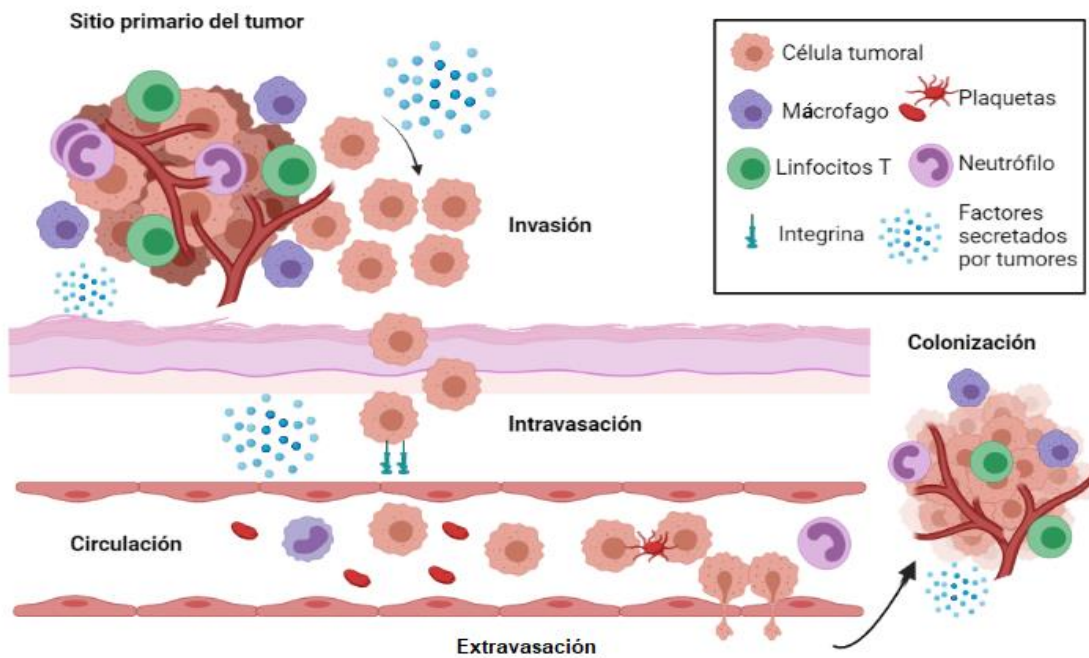


Figura 5. Proceso general de la metástasis (editado de Van Zijl y col., 2011).

### 1.5 Yodo

El yodo está clasificado como un sólido no metálico, pertenece a la familia de los halógenos; debido a sus números de oxidación se puede presentar en varias formas entre las que se incluyen: el yodo molecular ( $I_2$ ), las sales de yoduro (NaI o KI), los yodatos como NaIO y asociado a proteínas y lípidos (Dhaar y Robbani, 2008; Gärtner y col., 2010). A nivel biológico, se trata de un micronutriente esencial que, junto con el tungsteno son los dos elementos naturales más pesados que los sistemas vivos metabolizan (Lossow y col., 2021). En la naturaleza, los océanos son el principal depósito de yodo del mundo en donde suelen ser los yoduros ( $I^-$ ) y yodatos ( $IO_3^-$ ) las formas químicas de mayor abundancia (Duborská y col., 2021). La concentración de yodo varía entre los tipos de suelo, lugares y estaciones, debido a la aplicación de fertilizantes y otras preparaciones (como compuestos que contienen yodo utilizados como desinfectantes); así como, debido a la presencia de animales y a la

volatilización del agua del océano, un proceso ayudado por la radiación ultravioleta (Duborská y col., 2021; Zbigniew, 2017). Otras formas como el yodometano ( $\text{CH}_3\text{I}$ ), el ácido hipoyodoso ( $\text{HIO}$ ) y el ya mencionado  $\text{I}_2$  se encuentran en forma gaseosa presentes en la atmósfera (Nedić, 2023).

### 1.5.1 Metabolismo del yodo

La obtención de yodo por parte de los vertebrados es a través de la ingesta de alimentos ricos en yodo como pescado, algas y leche (Ahad y Ganie, 2010; Nedić, 2023). En humanos las cantidades de yodo requeridas van desde los  $150 \mu\text{g}$  / día, con variaciones más altas durante el embarazo y la lactancia (Ahad y Ganie, 2010). El yodo en forma de  $\text{I}^-$ ,  $\text{IO}_3^-$  o  $\text{I}_2$  se absorbe por el tracto intestinal (Iannuzzo y col., 2022). El proceso celular de captación del yoduro se produce a través del simportador sodio/yodo (NIS) que se encuentra en la membrana basolateral de las células foliculares de la tiroides y en la membrana de células epiteliales de diversos órganos (Tutter y col., 2020). En los últimos años, se ha reportado otros transportadores y canales de  $\text{I}^-$  con diferente selectividad aniónica y afinidad que incluyen canales de  $\text{Cl}^-$ , el regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR), el transportador multivitamínico de sodio (SMVT), la anoctamina 1 (ANO1) y el intercambiador electroneutro Pendrina (De la vieja y Santisteban, 2018; Riesco-Eizaguirre y col., 2021; Aceves y col., 2021).

Aproximadamente el 60% del yodo presente en el cuerpo humano se almacena en la glándula tiroides como hormona tiroidea. El proceso de la organificación del yodo se inicia con la oxidación del  $\text{I}^-$  por la peroxidasa tiroidea para incorporarlo a los residuos de tirosina (Tyr) dentro de la tiroglobulina (Babiker y col., 2020). La yodación ocurre primero en la posición 3 para formar la monoyodotirosina (MIT) y luego en la posición 5 para formar la diyodotirosina (DIT). Este proceso de yodación es seguido por una reacción de acoplamiento, en donde dos moléculas de DIT se acoplan para formar la hormona tiroxina o T4; y una molécula del MIT se acopla con una molécula de DIT para formar la hormona triyodotironina o T3 (Ahad y Ganie, 2010; De la vieja

y Santisteban, 2018;). Estas hormonas son parte esencial de la regulación metabólica y diferenciadora de todos los vertebrados

Se conoce que una cantidad significativa de yodo se acumula en tejidos extratiroideos como las glándulas salivales, la mucosa gástrica, la glándula mamaria lactante, el sistema nervioso, el útero, la próstata y el páncreas, y su función biológica empieza a conocerse (Aceves y col., 2021; Riesco-Eizaguirre y col., 2021). La tiroides, la glándula mamaria y la próstata pueden acumular ambos tipos de yodo ( $I^-$  y  $I_2$ ), pero cada uno capturado por diferentes mecanismos (Anguiano y Aceves, 2011). En el caso de la captación de  $I_2$  se ha reportado que es capturado por un mecanismo independiente de NIS, Pendrina o SMVT, pero es saturable y depende de la síntesis de proteínas, lo que sugiere un sistema de difusión facilitado (Arroyo-Helguera y col., 2006).

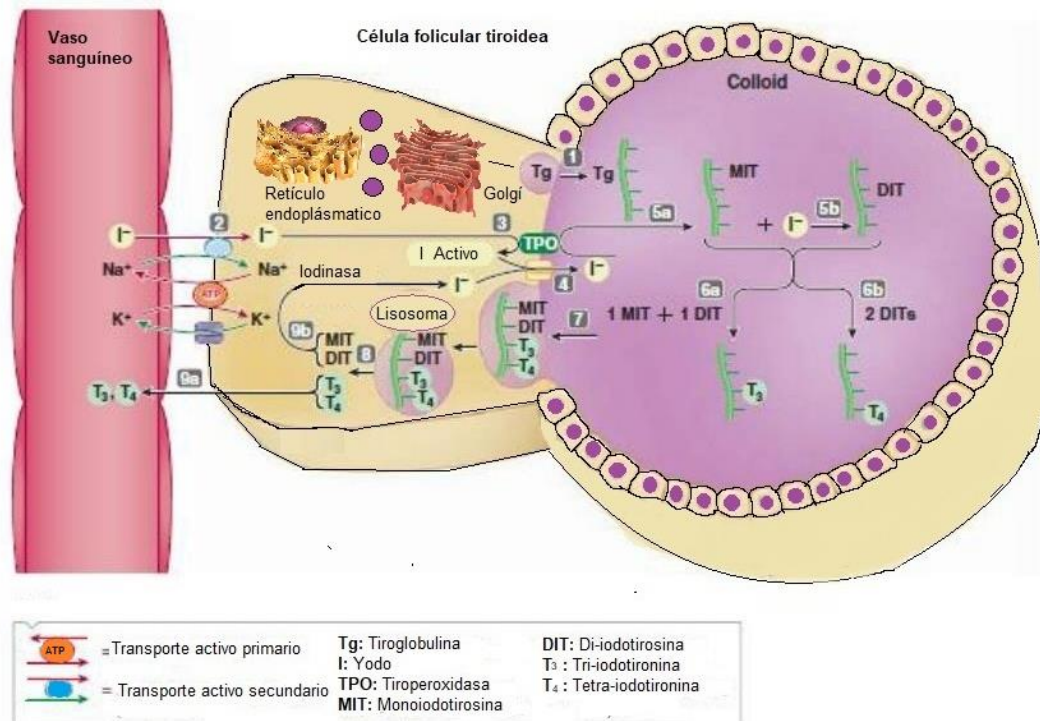


Figura 6. Síntesis de las hormonas tiroideas T3 y T4 (editado de Sherwood, 2013).

### I.5.2 Propiedades del Yodo

El yodo se ha propuesto como un agente antioxidante ancestral de acción conservada a lo largo de la filogenia (De la Vieja y Santisteban, 2018). Algunos estudios sugieren que el yodo funciona neutralizando especies reactivas de oxígeno (ROS) ya que tiene la capacidad de actuar como un donador de electrones, generando compuestos no reactivos como el ácido hipoyodoso (HIO) o el ácido yodhídrico (HI). También, se puede incorporar a compuestos orgánicos en los residuos de tirosina o histidina y a dobles enlaces de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares, haciéndolos menos reactivos a ROS (Aceves y col., 2021; Srivastava y col., 2022). Adicionalmente, diversos estudios han propuesto que el efecto antioxidante del yodo podría ser más complejo e incluir varios mecanismos (Aceves y col., 2021). En un modelo de hiperplasia prostática se demostró que el I<sub>2</sub> previene el estrés oxidativo inducido por la testosterona. Este mecanismo puede incluir la inhibición de la formación de prostaglandinas yodando el ácido araquidónico (AA; precursor de las prostaglandinas) o directamente actuar como un inhibidor de la enzima encargada de generarlas: la ciclooxigenasa tipo 2 (Cox2) (Quintero-Gracia y col., 2018). También se ha sugerido que el I<sub>2</sub> interactúa con la vía del Factor nuclear eritroide similar al factor 2 (Nrf2) (Greenwald y col., 2017). El Nrf2 es un factor de transcripción de la expresión de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (Cat) (Aceves y col., 2021). En condiciones basales, Nrf2 se ancla al citoplasma a través de la proteína 2 de unión al citoesqueleto de actina (Keap1) y la yodación de Keap1 provoca la liberación y translocación al núcleo de Nrf2 (Greenwald y col., 2017; Paunkov y col., 2019).

Así mismo, se ha reportado que el I<sub>2</sub> ejerce un efecto antiproliferativo y antineoplásico, desencadenando mecanismos apoptóticos en varias células cancerosas como SK-N-BE(2), MDA-MB-231, DU-145 (Mendieta y col.; 2019; Mendieta y col., 2020; Aranda y col., 2013). Se han propuesto dos mecanismos moleculares que podrían desencadenar este efecto proapoptótico. En el primero el I<sub>2</sub> ejerce un efecto directo relacionado con sus propiedades antioxidantes y prooxidantes, que pueden disipar el potencial de la membrana mitocondrial

induciendo la liberación del factor inductor de apoptosis (Shrivastava, 2006, Rösner H. y col., 2010). El segundo mecanismo propuesto se ha asociado a la formación de lípidos yodados, por su acoplamiento al AA o al ácido eicosapentaenoico. El lípido generado del AA + I<sub>2</sub> es la 6-yodolactona la cual es un ligando activador de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas tipo gamma (PPAR $\gamma$ ) (Aceves y col., 2021; Nava-Villalba y Aceves 2014;). Estos receptores se han descritos inicialmente como reguladores moleculares del metabolismo de los lípidos, sin embargo, recientemente se ha demostrado que PPAR $\gamma$  juega un papel significativo en la disminución de la proliferación de células tumorales (Nava-Villalba y col., 2015). En xenotrasplantes de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB231), se demostró una disminución significativa en la expresión de CD44, VEGF, el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) y su receptor (uPAR), Bcl2 y SVV, todos ellos relacionados con procesos de quimiorresistencia e invasión cancerígena (Mendieta y col., 2019). Se ha reportado que las células normales son menos sensibles a los efectos del I<sub>2</sub>, requiriéndose hasta 4-6 veces más concentración de este halógeno para disminuir su viabilidad. La posible explicación es que las células cancerosas contienen hasta 6 veces más AA que las células normales (Arroyo-Helguera y col., 2008).

Otro posible efecto del yodo es la inducción de la diferenciación celular. En el cáncer de tiroides se ha reportado que suplementos moderados de yodo previenen la transformación del cáncer de tiroides diferenciado al anaplásico (Kermoison y Draganescu, 2022; Zhang y col., 2022). En cáncer de mama se ha demostrado que el tratamiento de I<sub>2</sub> aumenta la expresión de NIS y receptores de estrógeno alfa (ER $\alpha$ ) y estudios relacionados con los marcadores de troncalidad en células de cáncer de mama y cuello uterino indicaron que la suplementación de I<sub>2</sub> disminuyó la población similar a las células madre, transformando las células de supervivencia en células de tipo no invasivo incapaces de generar xenoinjertos (Aceves y col., 2021; Anguiano y col., 2007; Bigoni-Ordóñez y col., 2018; Mendieta y col.; 2019; Zambrano- Estrada y col., 2018).

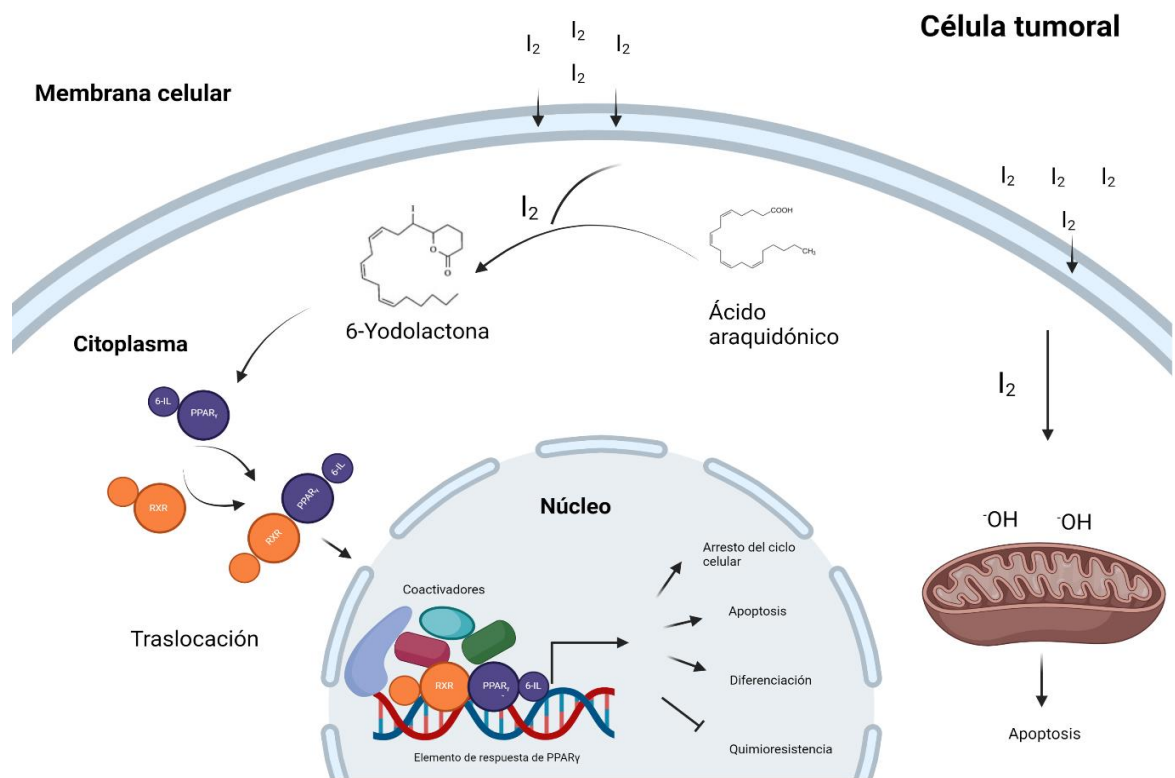


Figura 7. Mecanismos propuestos de acción del I<sub>2</sub> (Editado de Nava-Villalba y Aceves., 2014).



## **II. HIPÓTESIS**

La suplementación de yodo molecular promoverá la disminución de la implantación, crecimiento y potencial invasivo de xenotrasplantes con células troncales de SK-N-BE(2) de neuroblastoma humano.

### **III. OBJETIVOS**

#### III.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del yodo molecular ( $I_2$ ) en la capacidad de formación de tumores, el potencial de invasión en ratones con xenotrasplantes con células troncales de SK-N-BE(2).

#### III.2 Objetivos específicos

- Evaluar la formación, crecimiento y morfología de los xenotrasplantes con células troncales SK-N-BE(2) (peso y volumen tumoral) mediante tinción H & E o inmunofluorescencia de (CD44).
- Evaluar la expresión de genes relacionados con agresividad (WNT, NOTCH), diferenciación (PPAR $\gamma$ , NSE), capacidad invasiva (MMP9, VEGF) y adhesión celular (E-CAD, VIM) en xenotrasplantes de SK-N-BE(2).

## IV. METODOLOGÍA

### IV.1 Materiales

#### IV.1.1 Material biológico

Se utilizó la línea celular de Neuroblastoma SK-N-BE(2) (ATCC: CRL-2271), proporcionada por el Laboratorio de Metabolismo Energético del Instituto de Neurobiología, Universidad Autónoma de México (UNAM) Campus Juriquilla. También se utilizaron 35 ratones macho inmunodeprimidos *Foxn1<sup>nu/nu</sup>* de 6 a 10 semanas de edad, proporcionados por el bioterio del Instituto de Neurobiología, de la Universidad Autónoma de México (UNAM) Campus Juriquilla. Los ratones se mantuvieron en grupos de 3-5 individuos en cajas de polipropileno con medidas: 35 cm (largo) x 18 cm (ancho) x 25 cm (alto), con tapa cerrada de plástico, cama suave de aserrín estéril (la cual se cambió dos veces a la semana) con flujo de aire controlado, humedad relativa de 32%, temperatura de  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y ciclo de luz/oscuridad de 12 h, todo en base a la NOM-062-ZOO-1999. Se utilizó alimento de la marca Purina Rat Chow y agua desionizada para su dieta que fue *ad libitum*. Todos los experimentos se llevaron a cabo dentro de las instalaciones del bioterio de Neurobiología de la UNAM, que cuenta con sistema de aislación de ruido, quirófano. El manejo y los procedimientos experimentales se realizaron conforme al protocolo #35 aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

### IV.2 Métodos

#### IV.2.1 Establecimiento de xenotrasplantes y tratamiento

Para realizar los xenotrasplantes del modelo *in vivo*, los cultivos celulares tanto en monocapa y neuroesfera fueron previamente proporcionados por el laboratorio de metabolismo energético para su posterior inyección.

La manipulación de los ratones *Foxn1<sup>nu/nu</sup>* se realizó dentro de una campana de seguridad de clase I. Previamente a la inoculación se hicieron mediciones del peso

de los individuos utilizando una báscula (escala decimal). A cada ratón le fueron inyectadas de manera subcutánea en los flancos traseros (derecho o izquierdo) 100  $\mu\text{L}$  con  $5 \times 10^5$  células

Los ratones pertenecientes al grupo (I<sub>2</sub>) fueron suplementados con I<sub>2</sub> 0.025% suministrado en el agua de beber *ad libitum*. El yodo se preparó utilizando agua destilada y se dejó en agitación constante por al menos 24 h antes de su uso. Al grupo control se le suministró agua desionizada tratada dentro de las mismas instalaciones del bioterio.

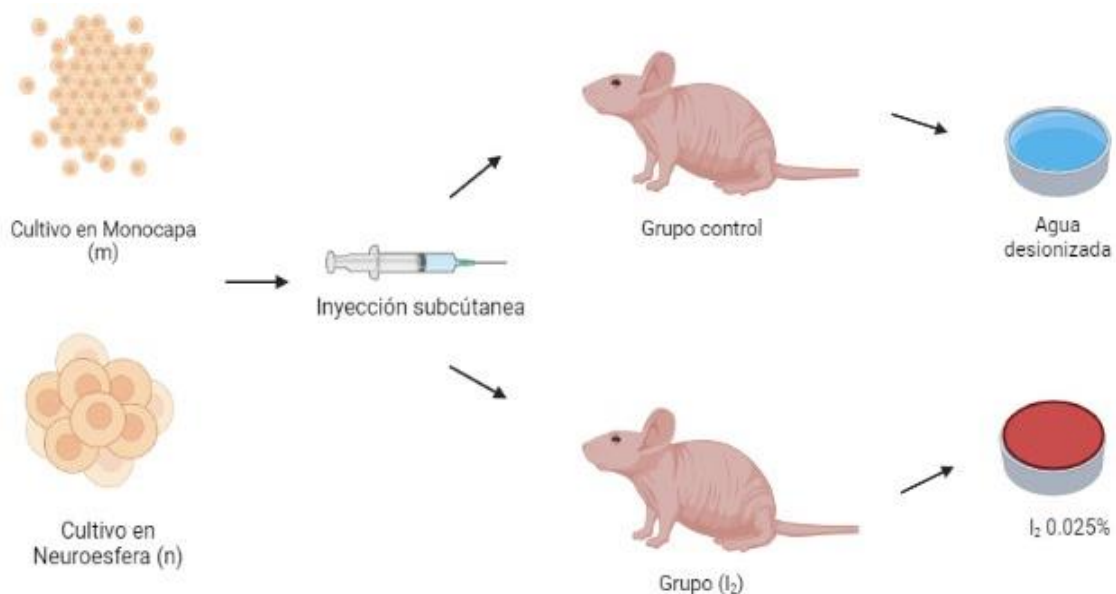


Figura 8. Grupos de xenotrasplantes generados con células SK-N-BE(2).

#### IV.2.2 Progresión tumoral

El sistema de seguimiento para monitoreo y condición de los ratones incluyó observación detallada de la locomoción, tamaño y estado del tumor. Los ratones fueron pesados 1 vez a la semana durante 10 semanas utilizando una báscula (de escala decimal), para observar variaciones en el peso corporal. Los tumores se comenzaron a medir una vez fueron notables a simple vista, la medición se realizó

utilizando un vernier electrónico. Los datos obtenidos se reportaron como: ancho (mm) x largo (mm) x profundidad (mm). Los ratones fueron sacrificados en la semana 10 de tratamiento o antes cuando se observó cambios críticos en el comportamiento, postura o locomoción o cuando el tumor superó 2 cm<sup>3</sup> de diámetro.

#### IV.2.3 Sacrificio y extracción de tumores

El sacrificio se realizó en el quirófano perteneciente a la unidad del bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Los ratones fueron sedados mediante inyección intraperitoneal con 1 mg/kg de una solución de Ketamina/Xilacina. Después de verificar el estado de sedación, se realizó dislocación de la cervical y se fijaron en decúbito supino con puntas de aguja de inyección en los extremos. Utilizando utensilios de disección (pinzas y tijeras), se realizó la extracción de los tumores de los flancos. Los tumores se pesaron utilizando una báscula (escala decimal) y se fraccionaron en dos partes iguales que se manejaron como se describe a continuación: A) Análisis histológico; Los tumores se colocaron en frascos de 5mL con solución de formalina (formaldehído 40%) y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su procesamiento de inclusión en parafina; B) Análisis molecular: El tejido se congeló utilizando hielo seco y se almacenó en tubos Eppendorf de 1.5 mL a -70°C.

#### IV.2.4 Inclusión de tejidos en parafina

Los tejidos que se almacenaron en solución de formalina neutra (24 h) se lavaron utilizando agua destilada y fueron colocados en cassettes de inclusión para tejido. Los tumores se dejaron reposar en agua destilada durante 1 h y fueron sometidos a un tren de deshidratación (series graduales de etanol desde 30% hasta 100 %) para sustituir el agua. Este procedimiento se realizó en la unidad de microscopía del INB. A continuación, se describe brevemente el procedimiento realizado:

Los tejidos se colocaron en una solución de cloroformo-etanol (50/50) por 30 minutos, junto con posteriores baños de cloroformo 100 % durante 30 minutos para eliminar los restos de solventes presentes. Después los tumores se cambiaron a una solución de cloroformo-parafina (50/50) para favorecer la penetración de la parafina. Finalmente se realizaron baños de parafina (100%) hasta conseguir la penetración en toda la pieza y se dejaron reposar hasta que la parafina condensó. Las muestras se etiquetaron y almacenaron a temperatura ambiente.

#### IV.2.5 Tinción de hematoxilina y eosina (H&E)

Para todas las tinciones realizadas en esta tesis se realizó previamente la fijación de tejido a partir de cortes de 5 µm de tejido usando los bloques de parafina. Los cortes se realizaron en un microtomo, se suspendieron en agua a temperatura ambiente y se recuperaron pescándolos con portaobjetos de vidrio (2-3 cortes por laminilla).

Para la tinción, las laminillas previamente se colocaron en un desecador por 72 horas y después se sometieron a un tren de tinción para la remoción de la parafina con xileno en tres etapas de 2 minutos. Al final del último cambio de xileno, las muestras se rehidrataron utilizando un tren de etanol (100%, 95% y 70%) por 2 minutos entre cada etapa. Antes de agregar la solución de hematoxilina, las muestras se enjuagaron con agua corriente a temperatura ambiente durante 2 minutos y se tiñeron con hematoxilina durante 3 minutos. Terminada la incubación con hematoxilina las muestras se enjuagaron con agua corriente durante 5 minutos y se usó como contratinción Eosina que se incubó durante 2 minutos. Antes de pasar al microscopio, las muestras se limpiaron con xileno (3 veces) durante dos minutos y se sellaron utilizando medio de montaje "Entellan". Para su análisis se tomaron fotos con los objetivos 10x, 20x y 40x por triplicado en microscopio Leica DM 2500. Las imágenes fueron analizadas con el programa Image J y se reportó la morfología celular, poblaciones celulares presentes y la cantidad de eritrocitos por campo.

#### IV.2.6 Deconvolución

Para conocer la cantidad de eritrocitos presentes en el tejido se utilizaron las imágenes tomadas a 20X y 40X de las laminillas que se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (H&E). Para realizar el análisis se utilizó el valor de conversión de píxeles a micrómetros de (1010 píxeles/100  $\mu\text{M}$ ) y utilizando el programa Fiji (image j) se procesaron las imágenes a formato RGB, posteriormente se separaron los canales de color (deconvolución) de la micrografía y para el análisis se utilizó la imagen del canal rosa generada junto con la herramienta de conteo automático de partículas que tuvo las especificaciones de: Conteo de formas ovaladas y de un diámetro de 100 píxeles. Los resultados se reportaron como cantidad de eritrocitos por campo.

#### IV.2.7 Inmunofluorescencia

Se utilizaron 3 laminillas por animal (control monocapa, control neuroesfera, tratamiento monocapa y tratamiento neuroesfera). Todas las laminillas se desecaron durante 72 h y se desparafinaron en estufa a 65 °C durante 30 min para remover la parafina presente en el tejido. Enseguida las muestras se pasaron por un tren de deshidratación con alcohol y xileno (xileno 1 y 2, EtOH 100%, 95% 80%, 70%, 50%) durante 35 min (5 minutos por paso) y se lavó con PBS 1X (3 veces) cada muestra. A continuación, se realizó la recuperación del antígeno utilizando una olla de presión colocando las muestras en vasos Copplin con buffer de citratos pH 6.5 durante 20 min a 100 °C. Después los tejidos se dejaron enfriar por 20 minutos hasta alcanzar temperatura ambiente, se lavaron con PBS 1X y se incubaron con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% durante 30 minutos para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Una vez se terminó la incubación, se lavaron con PBS 1X (3 veces) durante 5 minutos y se agregó etanol-amonio (70%/0.25%) para disminuir la auto fluorescencia durante 1 h y al finalizar se lavaron con PBS 1X (3 veces) y se realizó el bloqueo de unión inespecífica con solución de BSA al 3% durante 30 min. A continuación, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de anticuerpo primario diluido CD44 acoplado a FITC (Pharmigen, cat. 560977) en una relación 1:100 en tampón de BSA albúmina al 0,5% y se dejaron incubar en una

cámara humidificada a temperatura ambiente durante 24h. Finalmente los tejidos se montaron utilizando 1  $\mu$ L de solución de Antifade-DAPI (PBS10X/glicerol 1:10/DMSO 40 $\mu$ L/ DAPI 40  $\mu$ L/mL) para teñir el núcleo de las células y fueron sellados los bordes de los cubreobjetos de la laminilla con esmalte para uñas. Los resultados fueron cuantificados utilizando el programa Image J y se reportaron en unidades de fluorescencia/campo.

#### IV.2.8 Extracción de ARN

Se utilizaron entre 50-100 mg de tejido tumoral que se colocaron en tubos de ensayo, junto con 750  $\mu$ L de TRIzol y se homogeneizaron utilizando un politrón (IKA T10 basic). Enseguida, el contenido de los tubos de ensayo se traspasó a tubos Eppendorf de 1.5 mL junto con 250  $\mu$ L de TRIzol extra y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se adicionaron 200  $\mu$ L de cloroformo y nuevamente se incubó 5 min en hielo y 3 min a temperatura ambiente. Terminada la incubación se centrifugó a 12000 rpm a 4 °C por 20 min y se recuperó la fase acuosa para añadirle isopropanol en relación 1:1. Las muestras posteriormente se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente y nuevamente se centrifugaron a 12000 rpm a 4 °C por 10 min. Al terminar, se descartó el sobrenadante de cada muestra y se lavó el precipitado formado (pellet de ARN) en el fondo del tubo con 1 mL de etanol al 70 % frío. Al final se centrifugaron las muestras a 7500 rpm a 4 °C por 5 min (2 a 3 veces) y se dejó evaporar el etanol durante 30 minutos y se resuspendió en agua inyectable estéril. La concentración de ARN se cuantificó con 1  $\mu$ L de muestra en espectrofotómetro UV a 260 nm/280 nm. Para visualizar la integridad del ARN, se corrió un gel de agarosa al 2 % con tampón Tris-acetato-EDTA (TAE 1X) a 80 V por 60 min. Con una relación 1:2 de muestra y tampón de carga con SYBR green.



#### IV.2.9 Retrotranscripción (ADNc)

En tubos de 600  $\mu\text{L}$  se colocó el volumen equivalente a 2  $\mu\text{g}$  de ARN, 1  $\mu\text{L}$  de Oligo(dT) y se aforó a 15  $\mu\text{L}$  con agua inyectable estéril; después se mezcló e incubó a 65 °C por 5 min y en hielo durante 5 min. Por cada muestra de ARN, se preparó una mezcla de 2  $\mu\text{L}$  de dNTPs 10 mM, 4  $\mu\text{L}$  de tampón para RT 5X, 0.5  $\mu\text{L}$  de RNaseOUT y 2  $\mu\text{L}$  de DTT, se agitó y se colocaron 9  $\mu\text{L}$  de esta solución en cada tubo de muestra. Finalmente se añadió 1  $\mu\text{L}$  de enzima Retrotranscriptasa M-MLV. La reacción retrotranscripción se realizó utilizando un termociclador Perkin Elmer con el programa de incubación: 42 °C por 60 min y 55 °C por 20 min. Una vez concluido el ciclo completo los tubos se almacenaron a -20 °C.

#### IV.2.10 PCR en tiempo real

Para las reacciones de PCR se utilizó el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), empleando, por tubo: 1  $\mu\text{L}$  de plantilla de ADNc, 5  $\mu\text{L}$  del Master Mix, 3.6  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas y 1  $\mu\text{L}$  de cebador (5' y 3'). Los oligonucleótidos específicos de los genes y las temperaturas de alineación ( $T_a$  °C) se enumeran en el Cuadro 1. Las reacciones se hicieron utilizando el sistema detector de secuencias Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia) utilizando como programa: 40 ciclos de amplificación en 3 pasos: 94 °C (durante 30 s),  $T_a$  (ver Cuadro 1) durante 30 s y 72 °C (durante 30 s). Los niveles relativos de ARNm se normalizaron utilizando el gen constitutivo  $\beta$ -actina.

#### IV.2.11 Análisis estadístico

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, reportando los resultados como la media  $\pm$  la desviación estándar o SEM. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido por la prueba *post hoc* de Tukey obtener la diferencia entre grupos. En todos los casos, las diferencias con valores de  $p < 0.05$  se

consideraron estadísticamente significativas, y los análisis se realizaron empleando el software GraphPad Prism V9.5.0

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

<b>Gen</b>	<b>Forward (FW)</b>	<b>Reverse (RV)</b>	<b>Ta(°C)</b>
<b><i>CDH1</i></b>	TGCCCAGAAAATGAAAACG	GTGATGTGGCAATGCGTTC	FW:64.8 RV: 66.7
<b><i>MMP9</i></b>	TGGTCCTGGTGCTCCTGGTG	GCTGCCTGTCCGGTGAGATTG	FW:60 RV: 60
<b><i>NSE</i></b>	AGCTGAGGGATGGAGACAAAC	CATCCAACCTCCAGCATCAGGT	FW:66 RV: 66
<b><i>NOTCH</i></b>	GCCCCTTTGTAACGTGGAGA	CCAGGTTGGTGCAGATACCA	FW:55 RV:55
<b><i>PPARY</i></b>	CGACATTCAATTGCCATGAG	GACCACTCCCCTCCTTTGA	FW: 64 RV: 64.6
<b><i>VEGFA</i></b>	AGGAGGAGGGCAGAATCATCA	CTCGATTGGATGGCAGTAGCT	FW:67 RV: 65.3
<b><i>VIM</i></b>	GAGAACTTTGCCGTTGAAGC	GCTTCCTGTAGGTGGCAATC	FW:63 RV:63
<b><i>WNT</i></b>	TGCGCTTCCTCATGAACCTT	TGCTAGCGAGTCTGTTTGGG	FW: 59 RV: 60
<b><i>ACTβ</i></b>	CCATCATGAAGTGTGACGTTG	ACAGAGTACTTGCGCTCAGGA	FW:63 RV:63

### IV.3 Diseño experimental

La experimentación se llevó a cabo como se muestra en la Figura 9. Se utilizó la línea celular de neuroblastoma humano SK-N-BE(2) para la generación de dos modelos de cultivo celular: monocapa (m) y neuroesfera (n). Las células cultivadas fueron previamente proporcionadas para la implantación y formación de los xenotrasplantes en ratones inmunodeprimidos Foxn1<sup>nu/nu</sup> de 6 semanas de edad (macho).

Los ratones se dividieron en 2 grupos; “control” y “I<sub>2</sub>” que fueron colocados en cajas con 3-5 individuos. A cada ratón se le inyectaron 100 µL con 5x10<sup>5</sup> células (monocapa o neuroesfera). Una semana después, los ratones pertenecientes al grupo (I<sub>2</sub>) fueron suplementados con I<sub>2</sub> 0.025% en el agua de beber, mientras que el grupo control se le continuó suministrando agua desionizada estéril.

Los animales se mantuvieron en observación durante 10 semanas, después fueron sacrificados por dislocación cervical y se extrajeron los tumores (los cuales se fraccionaron en 2 partes iguales), una sección se fijó en formalina neutra para su análisis histológico, mientras la otra mitad se congeló con hielo seco y se almacenó a -70 °C para su análisis molecular.

En muestras histológicas (5 µm) se analizó la cantidad de eritrocitos extravasculares presentes en los tumores SK-N-BE(2) para ambos modelos (monocapa y neuroesfera).

Para corroborar la presencia de células troncales en las muestras histológicas, se realizó una inmunotinción de CD44 y para discernir entre eritrocitos (moléculas que también expresan el marcador) se utilizó como contratinción DAPI, un fluoróforo de unión a la cadena de ADN.

Finalmente, para evaluar el perfil molecular de los tumores se evaluaron marcadores de potencial de invasión celular (VIM, ECAD, MMP9 y CDH1) y la diferenciación celular (WNT, NOTCH, NSE y PPAR $\gamma$ ) en el ARNm mediante PCR en tiempo real, normalizados con el gen  $\beta$ -actina.

Los desechos producidos durante la experimentación se separaron, de acuerdo con su naturaleza química y fueron colocados en los contenedores adecuados (ácidos, bases, sales).

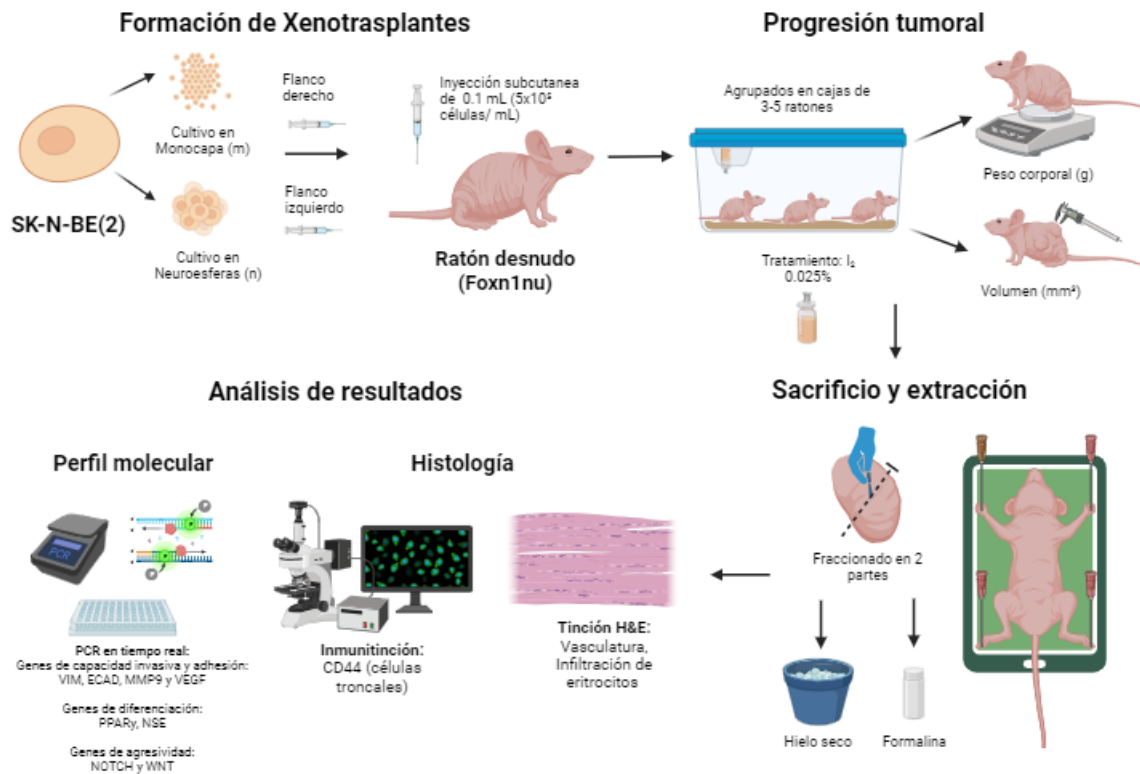


Figura 9. Diseño experimental (creada en Biorender.com).

## V. RESULTADOS

### V.1 Efecto antitumoral del I<sub>2</sub> en xenotrasplantes de neuroblastoma humano.

El primer objetivo de este trabajo consistió en conocer el efecto diferencial del suplemento de I<sub>2</sub> en la implantación y progresión de los xenotrasplantes de células en monocapa y troncales SK-N-BE(2) en ratones inmunosuprimidos (Foxn1<sup>nu/nu</sup>).

En primera instancia se comprobó el efecto del I<sub>2</sub> sobre la ganancia o pérdida de peso en los ratones para ambos modelos celulares (monocapa y neuroesfera). Los pesos se normalizaron en porcentaje respecto a sus valores reportados antes de ser inoculados (ver Figura 10). Ratones monocapa control al final del experimento perdieron un 5.06% de peso corporal (100% vs 94.94 ± 2.882%), para ratones monocapa suplementados con I<sub>2</sub> hubo una ganancia del 14% (100% vs 114 ± 1.823%). En ratones neuroesfera control se reportó al final del experimento una pérdida de peso del 12.31% (100% vs 87.69 ± 3.557%) mientras que el grupo de ratones neuroesfera suplementado con I<sub>2</sub> reportó una ganancia de 10.44% (100% vs 110.4 ± 2.4 %).

Adicionalmente, se evaluó la incidencia tumoral mediante observación y auscultación del ratón (ver Figura 11A). Los ratones control inyectados con células en monocapa alcanzaron el 100% de incidencia a la cuarta semana de experimentación y el grupo suplementado con I<sub>2</sub> sólo alcanzó un 90% a la décima semana. Por su parte los ratones control inoculados con células troncales solo alcanzaron el 50% de incidencia al final del experimento. Mientras que, el otro 50% de los ratones que no formaron tumores fallecieron antes de la décima semana. En ratones inoculados con células cultivadas en neuroesfera (troncales) suplementados con I<sub>2</sub> se obtuvo al final del experimento un 58% de incidencia desde la cuarta semana, mientras que el otro 42% de ratones que no formaron tumores se mantuvieron vivos hasta el final del experimento (ver Figura 11B).

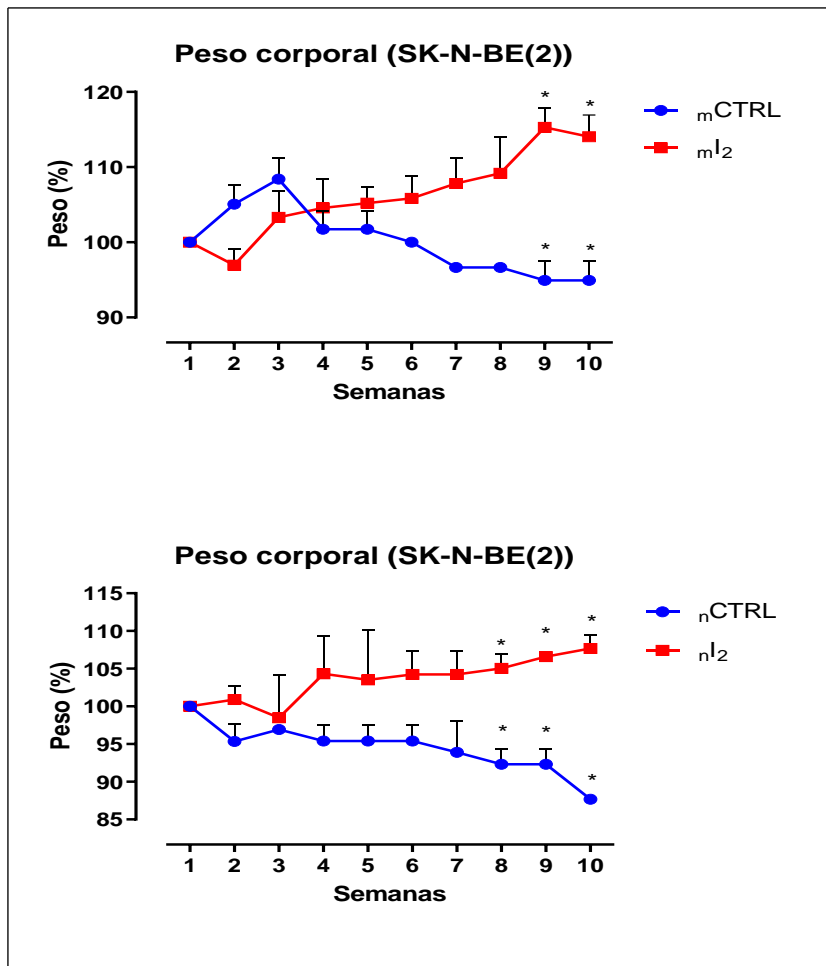


Figura 10. Porcentaje de peso corporal en ratones con xenotrasplantes SK-N-BE(2). Los ratones fueron suministrados con I<sub>2</sub> (0.025%) en el agua de beber (grupo I<sub>2</sub>) o agua desionizada (grupo control). Los datos son expresados como la media en porcentaje ± SEM. Se evaluó la significancia entre grupos mediante prueba de T donde “\*” representa la diferencia estadísticamente significativa.

Se observó que los ratones control que no formaron tumores sólidos presentaron diarrea persistente moderada e inflamación intestinal (datos no mostrados), este síntoma no se observó en ratones tratados con I<sub>2</sub>. En ratones control que si desarrollaron tumores se reportaron cambios como se fue avanzando en la experimentación, dichos cambios incluyeron: la disminución en la movilidad y en los reflejos de ratones, la pérdida de fuerza de agarre y de masa muscular, la aparición de episodios de diarrea esporádicos y de desorientación. Dichos cambios no se observaron en ratones suplementados con I<sub>2</sub> que si desarrollaron tumores.

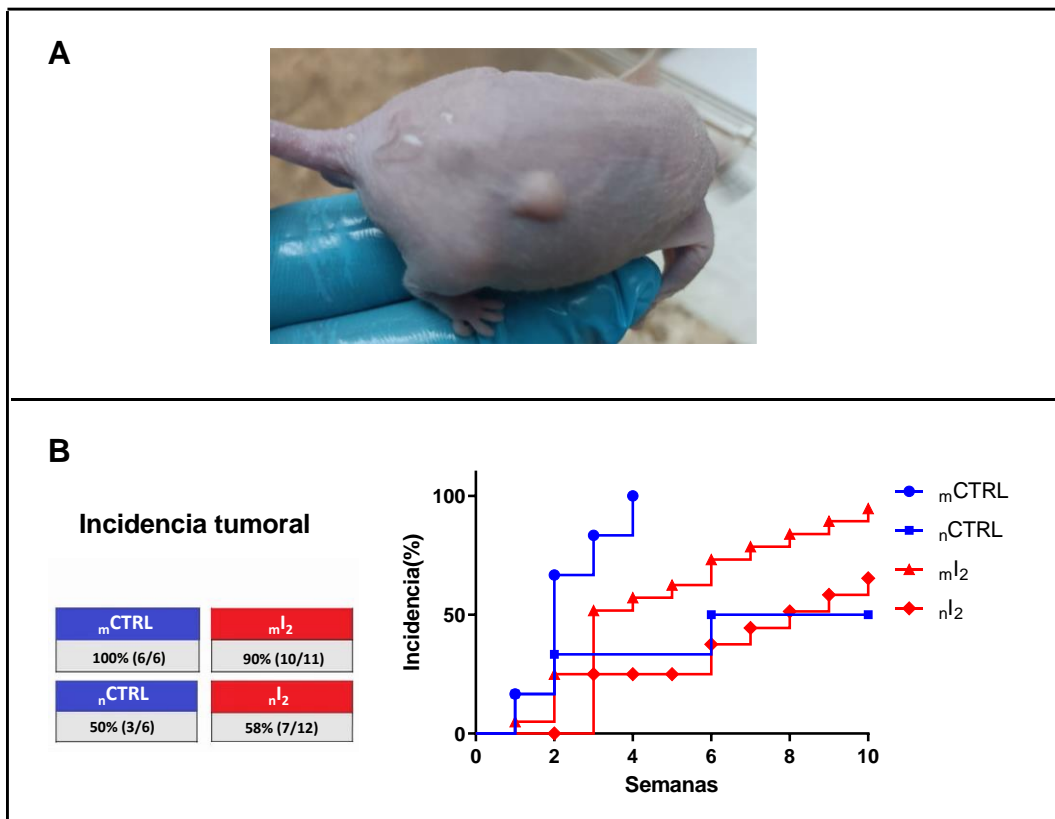


Figura 11. Incidencia de xenotrasplantes de neuroblastoma humano. A) fotografía representativa de un xenotrasplante en ratón  $Foxn1^{nu/nu}$  inoculado con  $5 \times 10^5$  células de SK-N-BE(2). B) Incidencia total y semanal durante 10 semanas. Los datos se reportan como el porcentaje de incidencia tumoral y se analizaron utilizando la prueba de Mantel-Cox.

El efecto de la suplementación de  $I_2$  sobre la incidencia tumoral resultó solo ser significativa en el modelo de xenotrasplantes utilizando células en monocapa SK-N-BE(2) ( $p=0.0161$ ).

V.2 Disminución del volumen tumoral en xenotrasplantes formados con células troncales de SK-N-BE(2).

A continuación, se analizaron los efectos de la suplementación de  $I_2$  en el volumen de los tumores recuperados (ver Figura 12). Se midió semanalmente el volumen de

los tumores utilizando un vernier electrónico (datos reportados en  $\text{mm}^3$ ). Los resultados mostraron que ratones inyectados con células SK-N-BE(2) en monocapa no reportaron cambios significativos ( $p=0.1301$ ) en el volumen tumoral al final del experimento con respecto al grupo control ( $3505 \pm 310.6 \text{ mm}^3$  vs  $2090 \pm 580.6 \text{ mm}^3$ ). En cambio, la suplementación de  $\text{I}_2$  en el modelo celular de células troncales mostró disminuciones significativas ( $p=0.037$ ) en ratones suplementados con  $\text{I}_2$  en comparación con el grupo control ( $9268 \pm 1036 \text{ mm}^3$  vs  $2972 \pm 658.1 \text{ mm}^3$ ).

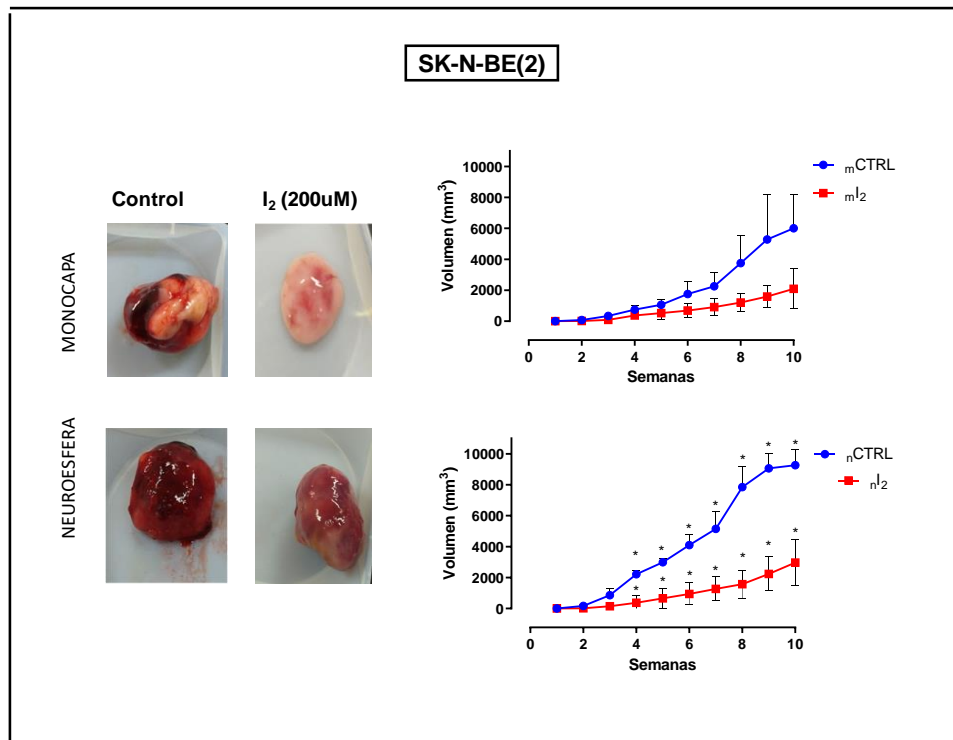


Figura 12. Volumen tumoral de xenotrasplantes SK-N-BE(2). A) Fotografías representativas de xenotrasplantes monocapa y neuroesfera provenientes de ratones suplementados con agua (control) o  $\text{I}_2$  ( $200\mu\text{M}$ ) después de 10 semanas. B) Cambios en el volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) de xenotrasplantes monocapa y neuroesfera durante 10 semanas. Los datos se reportaron en  $\text{mm}^3$ . Se evaluó la significancia entre grupos mediante prueba de T, donde “\*” representa la diferencia estadísticamente significativa.



En ambos modelos (monocapa y neuroesfera) se observó la presencia de patrones de vasculatura aberrante y áreas sangrantes. Los tumores monocapa control presentaron zonas con evidente vasculatura aberrante mientras que los tumores monocapa suplementados con I<sub>2</sub> se caracterizaron por ser más fibrosos y con menor o nula presencia de vasculatura. En tumores neuroesfera control enriquecidos con células troncales se observó una mayor presencia de vasculatura aberrante junto con áreas sangrantes respecto al modelo de monocapa, y a su vez con el respectivo grupo de tumores suplementado con I<sub>2</sub> que se caracterizaron por ser fibrosos y con menores zonas con vasculatura aberrante y áreas sangrantes.

Para identificar los cambios a nivel histológico presentes en los tumores obtenidos (monocapa y neuroesfera), se procedió a realizar una tinción de H&E (ver Figura 13A) Los resultados mostraron que en ambos casos (monocapa y neuroesfera) la suplementación de I<sub>2</sub> parecía disminuir la cantidad de eritrocitos presentes en el tejido. Para verificarlo se realizó un análisis de deconvolución para el posterior conteo de células utilizando el programa image J (ver Figura 13B). Los resultados confirmaron que el tratamiento con I<sub>2</sub> provocó una disminución en la cantidad de eritrocitos presentes en el tejido tumoral. Al comparar la cantidad de eritrocitos en tumores monocapa control respecto a tumores monocapa suplementados con I<sub>2</sub> la disminución resultó no ser significativa ( $236.7 \pm 46$  vs  $149 \pm 23$ ). Mientras que al comparar la cantidad de infiltración presente en tumores generados con células troncales control contra el grupo suplementado con I<sub>2</sub> si se observó una disminución significativa de eritrocitos ( $397 \pm 17$  vs  $159 \pm 17$ ).

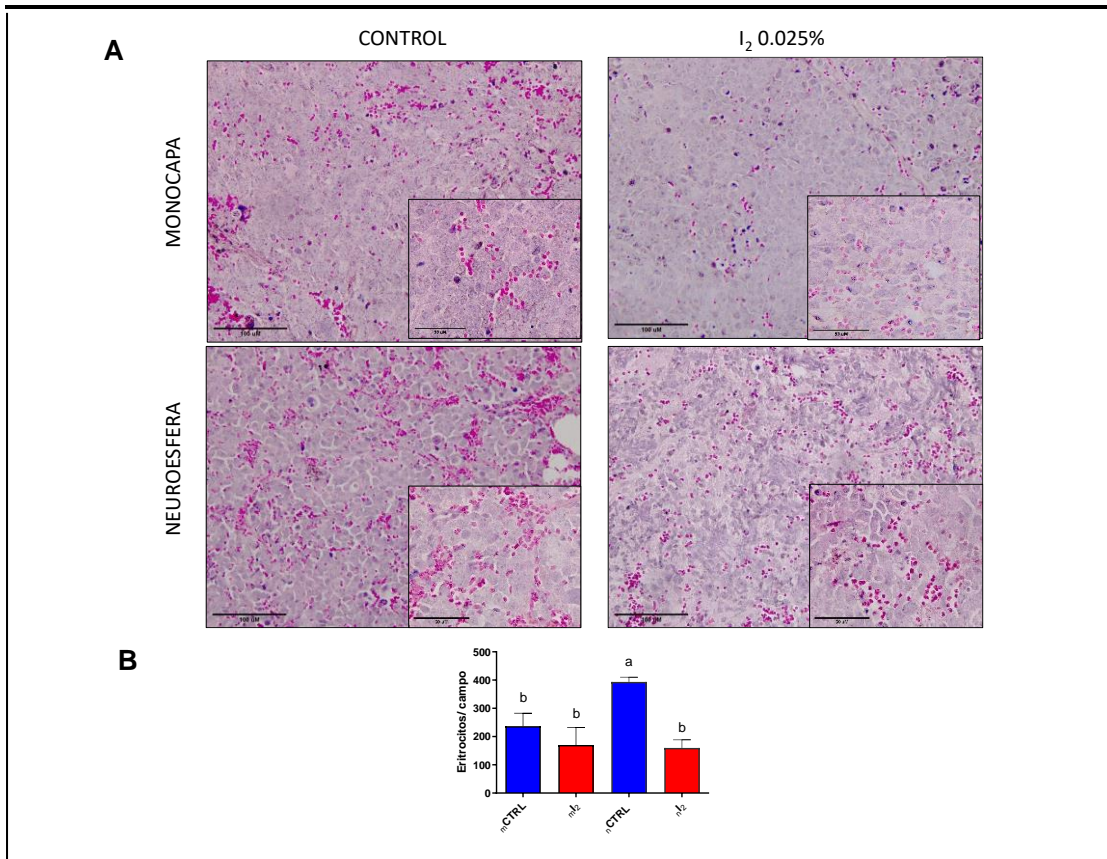


Figura 13. Efecto del I<sub>2</sub> en la formación de vasculatura aberrante e infiltración de eritrocitos extravasales. A) Tinción H&E de tejido tumoral extraído de xenotrasplantes generados con células SK-N-BE(2) en monocapa o neuroesfera tomadas a 20X con recuadros en aumento 40 X y B) Cantidad de eritrocitos extravasales presentes en el tejido tumoral. Los resultados se reportan por triplicado, se expresan como la cantidad de eritrocitos por campo  $\pm$  SEM. Los datos se analizaron por ANOVA de 1 vía y prueba post hoc de Tukey. Las letras distintas representan diferencia significativamente estadística entre grupos.

### V.3 Evaluación de marcadores de troncalidad en células de neuroblastoma humano

El segundo objetivo del trabajo consistió en evaluar la respuesta de las células troncales a la suplementación de I<sub>2</sub> mediante una inmunotinción de CD44: Un receptor de adhesión a la superficie celular que se considera un marcador típico de células troncales. La señal verde indicó la presencia de CD44 tanto en tumores enriquecidos con células troncales (modelo de neuroesfera) como en tumores en

monocapa. Sin embargo, debido a la alta cantidad de eritrocitos extravasculares (células que también expresan el receptor CD44) se optó por utilizar a la par el fluoróforo DAPI (azul) como marcador celular con especificidad de unión a ADN para discernir entre falsos positivos (ver Figura 14A).

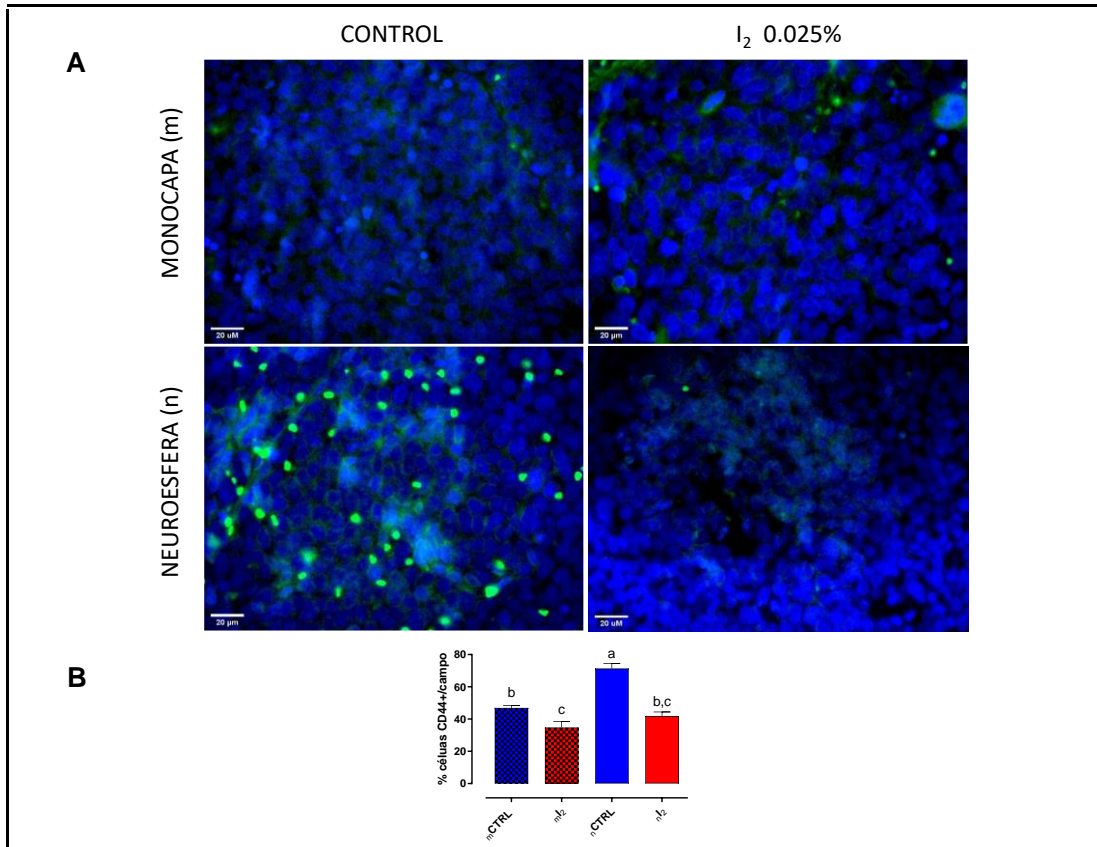


Figura 14 Efecto el I<sub>2</sub> en la diferenciación de células troncales. Expresión del marcador de troncalidad CD44 (verde) y DAPI (azul) en xenotrasplantes de neuroblastoma de SK-N-BE(2). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. Los resultados fueron reportados por triplicado, se expresan como células positivas por campo. Los datos fueron analizados utilizando ANOVA de una vía y prueba post hoc de Tukey. Las letras diferentes representan diferencia significativamente estadística entre grupos.

En tumores monocapa la suplementación de I<sub>2</sub> provocó una disminución en el porcentaje de expresión de células CD44+ comparado con el grupo control en un

12% ( $34.76 \pm 1.87\%$  vs  $46.92 \pm 0.9846\%$ ). En el modelo de tumores neuroesfera (enriquecido con células similares a células troncales) la suplementación de I<sub>2</sub> provocó una disminución del 29.63% respecto al grupo control ( $41.71 \pm 1.572\%$  vs  $71.34 \pm 2.14\%$ ). Para ambos grupos esta diferencia fue estadísticamente significativa (ver Figura 14B).

#### V.4 Evaluación del potencial de invasión en tumores de neuroblastoma enriquecidos con células troncales.

La segunda parte del objetivo consistió en evaluar los efectos de la suplementación del I<sub>2</sub> en la expresión de genes relacionados con la diferenciación, invasión y metástasis (ver Figura 15). La expresión del gen NSE relacionado con diferenciación en tumores monocapa control no mostró cambios comparado con lo reportado en tumores suplementados con I<sub>2</sub> ( $0.2450 \pm 0.03889$  vs  $0.2261 \pm 0.002144$ ), de igual manera en tumores neuroesfera tampoco se observó un cambio en la expresión del grupo control respecto al grupo de tumores suplementados con I<sub>2</sub> ( $0.1945 \pm 0.006928$  vs  $0.2206 \pm 0.03954$ ).

En el caso del gen PPAR $\gamma$  que está implicado en procesos de diferenciación y detención del crecimiento celular, los resultados mostraron un incremento en su expresión en los tumores que fueron suplementados con I<sub>2</sub> respecto a los controles. El incremento resultó ser significativo tanto en tumores monocapa ( $0.001037 \pm 0.0004$  vs  $0.00594 \pm 0.0011$ ) como también para tumores neuroesfera ( $0.000182 \pm 0.00006565$  vs  $0.0066 \pm 0.0001927$ ).

Para los genes relacionados con agresividad solo se observó una disminución estadísticamente significativa en la expresión del gen WNT, en los xenotrasplantes de células troncales en ratones suplementados con I<sub>2</sub> ( $0.09886 \pm 0.0078$  vs  $0.00456 \pm 0.01419$ ). Cabe señalar que el suplemento con I<sub>2</sub> en los xenotrasplantes de células en monocapa la expresión del gen WNT generó una tendencia a disminuir, sin embargo, esta tendencia no fue significativa. Del mismo modo, se observó esta tendencia a la baja en la expresión del gen NOTCH relacionado con para ambos

grupos (monocapa y troncales) cuando se suplementa con I<sub>2</sub> sin ser estadísticamente significativa.

Se evaluó también la expresión de genes relacionados con la pérdida de adhesión celular (CDH1) la remodelación de la matriz extracelular (MMP9), la capacidad de migración (VIM) y la inducción de angiogénesis (VEGF). En tumores generados a partir de células en troncales, la expresión del gen CDH1 aumento con la suplementación de I<sub>2</sub> en comparación con el grupo control ( $0.0001705 \pm 0.000018$  vs  $0.0006 \pm 0.00006419$ ); ocurrió del mismo modo para los tumores generados con células en monocapa sin diferencia estadísticamente significativa.

En el caso del gen MMP9 la suplementación de I<sub>2</sub> provocó una disminución estadísticamente significativa en la expresión del gen en tumores generados con células en neuroesfera control comparada con el grupo control ( $0.008726 \pm 0.00004244$  vs  $0.003605 \pm 0.0002693$ ). Esta misma tendencia se observó en la expresión de MMP9 en los tumores monocapa tratados con I<sub>2</sub>, sin embargo, no hubo diferencia estadísticamente significativa.

De igual manera, se reportó que para el gen VIM La expresión disminuyó con la suplementación de I<sub>2</sub>. En los tumores generados con células en monocapa ( $0.09421 \pm 0.01194$  vs  $0.04041 \pm 0.01337$ ) la disminución no se consideró significativa como si ocurrió en tumores neuroesfera ( $0.3709 \pm 0.03386$  VS  $0.1846 \pm 0.04208$ ).

Finalmente, en relación a la expresión del gen VEGF la suplementación de I<sub>2</sub> no provocó cambios en los niveles de expresión al comparar tumores monocapa control contra tumores monocapa suplementados I<sub>2</sub> ( $0.02855 \pm 0.01091$  vs  $0.02790 \pm 0.005671$ ) pero al comparar los niveles de expresión del gen VEGF en tumores neuroesfera control vs tumores neuroesfera a suplementados I<sub>2</sub> si se reportó una disminución en los niveles de expresión que resulto ser significativa ( $0.1416 \pm 0.03201$  vs  $0.04977 \pm 0.01092$ ).

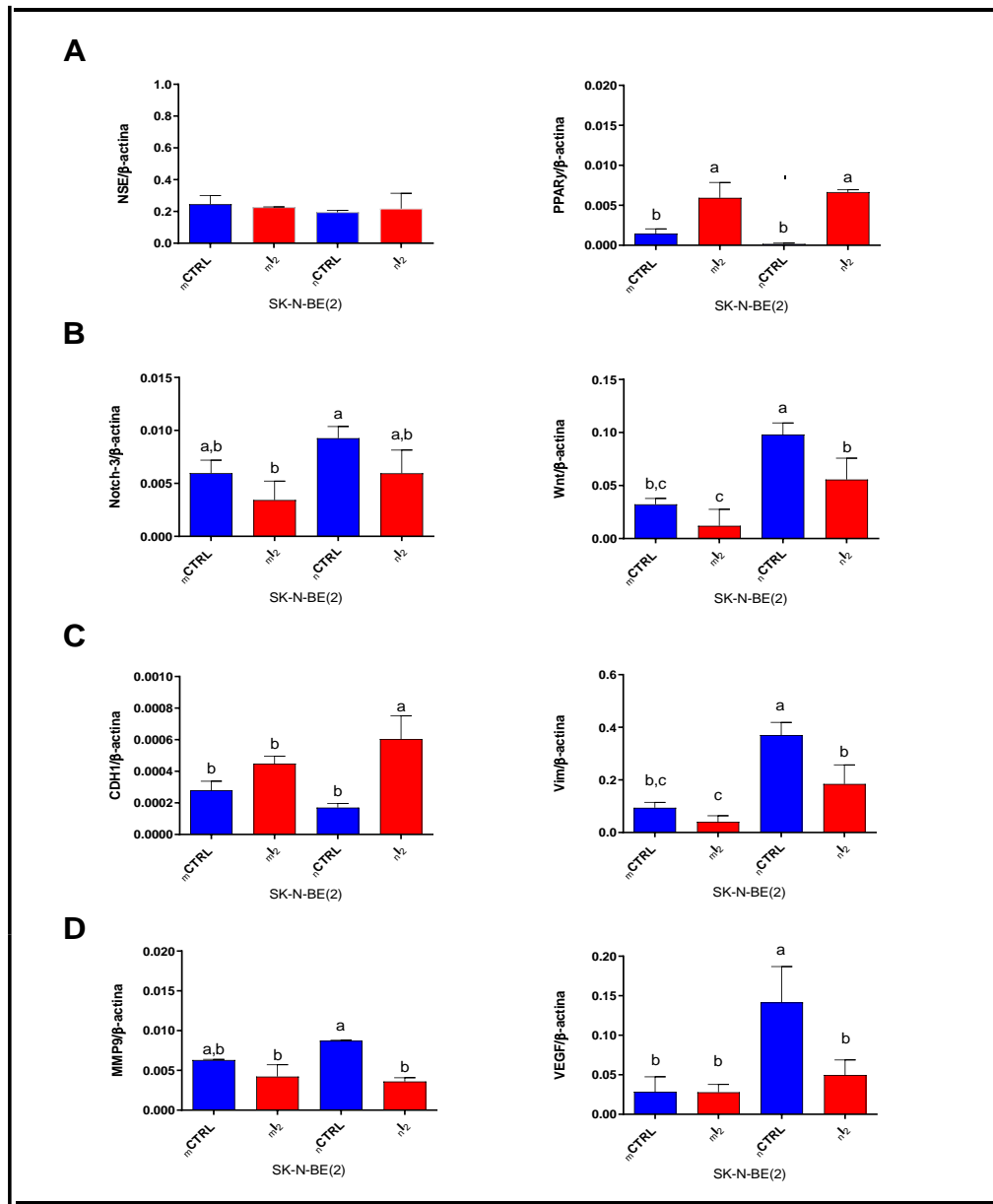


Figura 15 Efecto del I<sub>2</sub> en la potencialidad de invasión y diferenciación de células troncales. A) Expresión de genes relacionados con la diferenciación celular (PPAR $\gamma$ , NSE) B) Expresión de genes relacionados agresividad (NOTCH, WNT) C) Expresión de genes relacionados con la adhesión e invasión celular (CDH1, VIM) y D) Expresión de genes relacionados con la remodelación de la membrana extracelular y la angiogénesis (MMP y VEGF). Los genes fueron analizados por RT-qPCR utilizando ADNc de tumores SK-N-BE(2) suministrados con I<sub>2</sub> 0.025% (grupo I<sub>2</sub>) o agua desionizada (grupo control). Todos los resultados se realizaron por triplicado y se expresan como la media  $\pm$  SEM. Los datos fueron normalizados utilizando el gen constitutivo  $\beta$ -actina y evaluados con ANOVA de una vía y prueba post hoc de Tukey. Las letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa.

## VI. DISCUSIÓN

Alrededor del 20% de los pacientes con NB de alto riesgo son refractarios a la quimioterapia estándar (Basta y col., 2016). La evidencia propone que la resistencia terapéutica puede atribuirse a varios factores: como a los procesos de desdiferenciación celular, la sobreexpresión de receptores MDR, así como la presencia de subpoblaciones de células troncales que suelen encontrarse en el tumor (Bahmad y col., 2019).

La línea de neuroblastoma humano SK-N-BE(2) utilizada en este trabajo presenta la amplificación del oncogén MYCN, un controlador maestro de la diferenciación celular, asociado a pronósticos poco favorables. Se generaron xenotrasplantes a partir de cultivos de células en monocapa (parentales) y en neuroesfera (células madre cancerosas neurales) (Jensen y Parmar, 2006) y se comparó su respuesta al tratamiento con 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{I}_2$  durante 10 semanas.

Los xenotrasplantes formados con neuroesfera se comportaron más agresivos, provocando en ratones pérdida de peso (disminución de 12%), desorientación, tumores más voluminosos (9000  $\text{mm}^3$ ) y con mayores las áreas sangrantes (presencia de 2.49 veces más de eritrocitos extravasculares en tejido), así como la muerte de al menos 6 individuos (porcentajes) antes de terminar el experimento. Mientras que en ratones inoculados con células en monocapa los efectos descritos anteriormente se presentaron en menor medida: pérdida de peso del 5% sin reportes de desorientación o muerte, menores volúmenes tumorales (3000  $\text{mm}^3$ ) con presencia de 0.4 veces la cantidad de eritrocitos extravasculares.

Varios estudios han reportado que la presencia de las células madre puede modular las características de los nichos tumorales, promoviendo la activación de vías de señalización clave involucradas en la autorrenovación, la angiogénesis y la supervivencia (Ayob y Ramasamy, 2018). Lo que puede explicar las diferencias observadas en ambos modelos al suponer que la presencia de las células madre cancerosas puede promover la agresividad tumoral.

La respuesta al tratamiento con el suplemento de I<sub>2</sub> provocó un retraso en la aparición de tumores sólidos generados tanto con células monocapa como con células neuroesfera, lo que puede explicarse gracias a las capacidades intrínsecas que posee el I<sub>2</sub> para inhibir la proliferación, la quimiorresistencia y favorecer los efectos apoptóticos que ya se han reportado en varias líneas celulares: SK-N-BE(2), SK-N-AS y MDA-MB-231 (Alvarez-León y col., 2021;; Moreno-Vega y col., 2019; Mendieta y col., 2019). También se observó que los ratones suplementados con I<sub>2</sub> mantuvieron una ganancia de peso entre 10-12% comparado con los ratones control que presentaron un efecto a la inversa, pérdida significativa de peso corporal de 5- 10%, situación similar que ya se había reportado en ratones con xenotrasplantes de células MDA-MB-231, MCF-7 y SK-N-BE(2) donde la suplementación con I<sub>2</sub> evitó efectos secundarios nocivos como pérdida de peso corporal y diarrea (Mendieta y col 2019; Mendieta y col., 2020). En dichos trabajos se asoció el crecimiento tumoral con la aparición de estrés en los ratones, y a su vez sugiriendo así que la pérdida de peso corporal es una consecuencia directa de un síndrome conocido como caquexia por cáncer, que es un proceso debilitante caracterizado por la pérdida de peso involuntaria que no solo afecta el tejido adiposo, sino que también conduce al desgaste y la debilidad del músculo esquelético y en donde contribuyen citocinas proinflamatorias, como el TNF- $\alpha$ , la interleucina-1 (IL-1), la interleucina-6 (IL-6) y el factor de diferenciación de crecimiento 15 (GDF-15) (Fearon y col., 2011).

Se ha sugerido que la prevención de la pérdida de peso por suplementación de I<sub>2</sub> pueden deberse a 3 condiciones; primero, al efecto antineoplásico de I<sub>2</sub> que previene el crecimiento tumoral y disminuye así la señalización celular implicada en procesos de vascularización e hipermetabolismo; el segundo, debido al efecto antioxidante del I<sub>2</sub> que afecta los procesos de inflamación crónica debido a la presencia de ROS y la activación de vías de señalización como; *NF- $\kappa$ B*, STAT3, la proteína activadora 1 (AP-1), el factor nuclear de las células T activadas (NFAT) y HIF1 $\alpha$ , que median reacciones vitales de estrés celular; por último, el I<sub>2</sub> podría estar generando la diferenciación de las células madre tumorales hacia un fenotipo terminal menos agresivo (Alvarez-Léon y col., 2021; Arulselvan y col., 2016).



Se observó que una característica evidente en los tumores suplementados con I<sub>2</sub> fue la disminución en el volumen tumoral, este efecto antineoplásico ya se había reportado en coadministración de 200 µM de I<sub>2</sub> con 1.5 mg/Kg de ATRA en tumores de neuroblastoma con células SH-SY5Y de bajo riesgo y SK-N-AS de mediano riesgo. Además, se correlacionó con un efecto proapoptótico del yodo, lo que sugiere que independientemente del modelo, el yodo genera apoptosis en células de neuroblastoma, que en consecuencia promueve la disminución del volumen tumoral (Mendieta y col., 2020).

Otro efecto significativo debido al suplemento con I<sub>2</sub> fue la disminución de áreas sangrantes en los tumores, observada en las tinciones H&E, como infiltración de eritrocitos, siendo más evidente en tumores generados a partir de células cultivadas en neuroesfera respecto a tumores generados con células en monocapa. Se sabe que los tumores de neuroblastoma SK-N-BE(2) se suelen caracterizar por ser azulados (tumores blueberry) con la presencia de patrones de vasculatura aberrante y áreas sangrantes. Los trabajos previos de Álvarez-León y col., 2021 y de Mendieta y col., 2019 habían reportado que en tumores de mama y de neuroblastoma la suplementación de I<sub>2</sub> (0.025%) generó tumores más fibrosos y con menor presencia de vasculatura aberrante. Este efecto se replicó en los xenotrasplantes generados con células en monocapa y en xenotrasplantes generados con células troncales obtenidos en este trabajo. Una de las posibles explicaciones es que el I<sub>2</sub> posee un efecto antiangiogénico que ya ha sido reportado previamente por Álvarez-León y col., 2021 en tumores SK-N-BE(2) que exhibieron una expresión elevada de HIF1 $\alpha$ , pero sin evidentes cambios en la expresión de VEGF. De manera interesante, en este trabajo se encontró que el efecto del I<sub>2</sub> en tumores generados con células troncales sí generó una disminución significativa en la expresión de VEGF con respecto al grupo control. Se ha demostrado que en las células madre la sobreexpresión de HIF es un modulador primario del metabolismo celular para mantener su estado indiferenciado y potencial pluripotente (Mohyeldin y col., 2010). Además, a nivel molecular la señalización de HIF1 $\alpha$  es necesaria para el mantenimiento de las células madre neuronales (NSC) y la estabilidad vascular. La

presencia de ambientes hipóxicos que van prevaleciendo en los nichos de las células madre en crecimiento junto con las células estromales provocan la activación de HIF-1 $\alpha$ , considerado también un "interruptor angiogénico" que regula al alza la expresión de varios genes proangiogénicos, incluidos *VEGF* y sus receptores *Flt-1*, *Flk-1*, *Ang-1*, *Ang-2* y *Tie-2* (Bárdos y Ashcroft, 2005; Zimna y Kurpisz, 2015). En particular, la inactivación genética de HIF1 $\alpha$  resulta en la pérdida gradual de las NSC (Li y col., 2014). En nuestro modelo podemos observar que la disminución de la expresión de HIF1 $\alpha$  también afecta de manera importante a las vías de señalización proangiogénica (VEGF).

Otro resultado que podría apoyar esta hipótesis es la disminución de la cantidad de MMP9 reportada en xenotrasplantes suministrados con I<sub>2</sub> donde el cambio fue significativo únicamente para xenotrasplantes generados con células troncales. Se ha reportado que la actividad de las metaloproteinasas de matriz que degradan la matriz extracelular, en particular MMP9 y MT1-MMP regulan directamente la angiogénesis lo que facilita la invasión de células endoteliales y conduce a la generación de nuevos vasos (Fields, 2019; Nelson y col., 2000).

Una de las interrogantes que se trató de responder en este trabajo fue el efecto del I<sub>2</sub> en las células troncales. Los resultados mostraron que la suplementación de I<sub>2</sub> disminuyó de manera significativa la presencia del marcador de superficie celular CD44 que es típico de células troncales lo que podría sugerir que el I<sub>2</sub> puede actuar como diferenciador celular en estas poblaciones. Otros resultados reportados por Bigoni-Ordoñez y col., en 2018 mostraron que la suplementación de 200  $\mu$ M de I<sub>2</sub> en las líneas celulares derivadas de cáncer cervical HeLa y SiHa provocó una disminución de la expresión de marcadores de troncalidad: CD49f, CK17, OCT-4, NANOG, SOX2 y KLF4; así como, una mayor expresión y activación de los receptores PPAR $\gamma$ . De igual manera se encontró en nuestro trabajo que la suplementación de I<sub>2</sub> favoreció un incremento en la expresión de los niveles de PPAR $\gamma$  tanto en los xenotrasplantes generados con células en monocapa como los generados con células en neuroesfera. Una de las posibles razones que explica la diferenciación de las células troncales y el incremento de los receptores PPAR $\gamma$ , es

mediante el mecanismo de acción indirecta que posee el I<sub>2</sub>. Se ha demostrado que la 6 yodolactona (6IL) -la cual se forma mediante la yodación del ácido araquidónico que está presente en la membrana celular- actúa como un ligando de unión de PPAR $\gamma$ . La activación de PPAR $\gamma$  le permite unirse a un complejo heterodímero con los receptores RXR $\alpha$  y translocarse al núcleo celular para activar el elemento de respuesta de PPAR $\gamma$  (PPRE), para activar vías de señalización antiproliferativas, proapoptóticas y de diferenciación (Chawla y col., 2001; Nava-Villalba y col., 2015; Wafer y col., 2017). Se ha reportado que en cáncer de mama la activación de PPAR $\gamma$  regula la diferenciación terminal de los adipocitos (Li y col., 2015). En el intestino, la activación de PPAR $\gamma$  causa la degradación de la  $\beta$ -catenina y la inactivación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina río abajo, y por lo tanto aumenta la cetogénesis al inducir la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa 2 mitocondrial (HMGCS2), una enzima cetogénica limitante de la velocidad en la síntesis de  $\beta$ -hidroxibutirato del cuerpo ( $\beta$ HB), que contribuye a la regulación de la diferenciación celular intestinal (Zurlo y col., 2016) Y a nivel de proteína, promueve la diferenciación epitelial y estabiliza el fenotipo diferenciado al regular al alza la expresión de proteínas clave como queratinas, E-cadherina, fosfatasa alcalina o proteína 1 de unión a GTP regulada por el desarrollo (Cheng y col., 2019).

Se analizaron también otros genes implicados en la diferenciación celular como WNT donde se observó que la suplementación de I<sub>2</sub> disminuyó la expresión del gen en ambos modelos (monocapa y neuroesfera) sólo significativo para tumores de células troncales. En varios estudios se ha propuesto que la expresión elevada de genes diana de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina se puede utilizar como indicativo de mal pronóstico en el neuroblastoma sin amplificación de MYCN (Duffy y col., 2016). Se sabe que Wnt tiene por diana al gen MYCN y la sobreexpresión de la proteína MYCN reprime directamente los genes necesarios para la diferenciación terminal del sistema nervioso simpático. Paradójicamente, se ha demostrado que el tratamiento con wnt3a/Rspo2, un agonista específico de neuroblastoma, favorece la diferenciación de células SH-SY5Y y SK-N-BE(2) con amplificación de MYCN, pero a su vez también incrementa la proliferación de células SK-N-AS (Szemes y col., 2018). En

un estudio realizado por Suebsoonthron y col. en 2017 se reportó que las células de neuroblastoma SH-SY5Y tratadas con XAV939, el inhibidor de WNT, no alteró la morfología, la viabilidad o la proliferación de las células SH-SY5Y. Sin embargo, el tratamiento con XAV939 aumentó la sensibilidad a la doxorrubicina, y reguló a la baja marcadores neuronales de diferenciación neural ( $\beta$ -tubulina III, PHOX2A y PHOX2B); mientras que el inhibidor de WNT XAV939 promovió la sobreexpresión de varios marcadores de progenitores neurales (PAX6, TFAP2 $\alpha$  y SLUG). Aunque los resultados encontrados sugieren que la suplementación de I<sub>2</sub> podría actuar como un inhibidor de WNT no se observó un incremento en la expresión de genes relacionados con un estado indiferenciado. Esto podría estar asociado a la sobreexpresión de los PPAR $\gamma$  que favorecen los procesos de diferenciación. De manera interesante, varios autores sugieren que en la señalización de WNT,  $\beta$ -catenina y PPAR $\gamma$ , se autorregulan, ya que generalmente se encuentran en oposición. Cuando  $\beta$ -catenina está regulada al alza en los procesos inflamatorios, estrés oxidativo y varios cánceres, se observa lo contrario con PPAR $\gamma$ , que generalmente se regula a la baja durante la inflamación, el estrés oxidativo y varios cánceres (Vallée y col., 2018).

Otra característica que se evaluó fue el efecto del I<sub>2</sub> en la potencialidad de invasión de las células troncales. Se observó que la suplementación de I<sub>2</sub> disminuyó los niveles de expresión de MMP9 y VIM en ambos modelos (monocapa y neuroesfera); mientras que, aumentó los niveles de expresión de E-cadherina, una glicoproteína transmembrana involucrada en las uniones adherentes epiteliales. Este patrón de expresión (pérdida de E-cadherina, aumento de MMP9 y VIM) podría ser suficiente para promover la cascada de invasión-metástasis, activando vías de transducción de señales específicas aguas abajo que otorgan una alta motilidad a las células al inducir proteínas como N-cadherina que es un requisito previo para poder migrar (Batth y col., 2020). En cambio, el patrón de expresión de estos genes fue significativo en los xenotrasplantes generados con células troncales lo que podría indicar dos cosas: la primera es que la suplementación de I<sub>2</sub> favorece la diferenciación celular de estas poblaciones en los tumores de neuroblastoma y la

segunda es que la presencia de células troncales puede estar correlacionada con el potencial de invasión respecto a los xenotrasplantes generados con células en monocapa que poseen poca o nula presencia de poblaciones de células madre.

Además, se observó que la suplementación de I<sub>2</sub> disminuyó significativamente la expresión de Notch-3 solo en tumores neuroesfera. Esto podría ser principalmente debido a que la vía de señalización de Notch se encuentra altamente conservada y regula las decisiones del destino celular durante la embriogénesis, modula el estado diferenciado de las células maduras y es uno de los principales factores en la regulación de las células madre cancerosas (Wang y col., 2009). Otros trabajos han asociado la vía de Notch como un promotor de la identidad de células de neuroblastoma mesenquimatosas desdiferenciadas. Se ha reportado que un subconjunto de neuroblastoma con alta expresión de Notch-3 y sus genes blanco presentan mayores características mesenquimales, mayor incidencia de metástasis y un mal pronóstico (van Nes y col., 2013). Esto sugiere que el I<sub>2</sub> podría estar disminuyendo la activación de Notch para inhibir las propiedades mesenquimales de las células de neuroblastoma y con ello, disminuir el potencial de invasión y metástasis principalmente en xenotrasplantes generados con células troncales.

## **VII. CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos indican que el I<sub>2</sub>, ejerce acciones apoptóticas, de diferenciación celular y disminución en la potencialidad de invasión en xenotrasplantes de neuroblastoma de poblaciones parentales y troncales.

Estos resultados requieren más estudios enfocados a entender las interacciones directas entre el I<sub>2</sub> y la pérdida de características intrínsecas de las células troncales; como la autorrenovación o la interacción con el microambiente tumoral.

Además, nuestros resultados nos permiten proponer la evaluación del suplemento de I<sub>2</sub> como coadyuvante en estudios clínicos; encaminados a mejorar las terapias convencionales generando una mayor respuesta terapéutica y la disminución de los efectos secundarios.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

**Aceves C**, Mendieta I, Anguiano B, Delgado-González E. Molecular Iodine Has Extrathyroidal Effects as an Antioxidant, Differentiator, and Immunomodulator. *Int J Mol Sci.* **2021**; 22(3):1228.

**Ahad F**, Ganie SA. Iodine metabolism and Iodine deficiency disorders revisited. *Indian J Endocrinol Metab.* **2010**; 14:13-17.

**Ahlstrom JD**, Erickson CA. The neural crest epithelial-mesenchymal transition in 4D: a tail of multiple non-obligatory cellular mechanisms. *Development.* **2009**; 136:1801-1812.

**Alaminos M**, Davalos V, Cheung NK, Gerald WL, Esteller M. Clustering of gene hypermethylation associated with clinical risk groups in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst.* **2004**; 96(16):1208-19.

**Álvarez-León W**, Mendieta I, Delgado-González E, Anguiano B, y Aceves C. “Molecular Iodine/Cyclophosphamide Synergism on Chemoresistant Neuroblastoma Models.” *International journal of molecular sciences.* **2021**; 22:16.

**Anguiano B**, Aceves C. Iodine in mammary and prostate pathologies. *Curr. Chem. Biol.* **2011**; 5:177–182.

**Anguiano B**, García-Solís P, Delgado G, Velasco CA. Uptake and Gene Expression with Antitumoral Doses of Iodine in Thyroid and Mammary Gland: Evidence that Chronic Administration Has No Harmful Effects. *Thyroid.* **2007**; 17:851–859.

**Aranda N**, Sosa S, Delgado G, Aceves C, Anguiano B. Uptake and antitumoral effects of iodine and 6-iodolactone in differentiated and undifferentiated human prostate cancer cell lines. *Prostate.* **2013**; 73(1):31-41.

**Arroyo-Helguera O**, Rojas E, Delgado G, Aceves C. Signaling pathways involved in the antiproliferative effect of molecular iodine in normal and tumoral breast cells: evidence that 6-iodolactone mediates apoptotic effects. *Endocri. Relat Cancer.* **2008**; 4:1003-11.

**Arroyo-Helguera** O, Anguiano B, Delgado G, Aceves C. Uptake and antiproliferative effect of molecular iodine in the MCF-7 breast cancer cell line. *Endocr Relat Cancer*. **2006**; (4):1147-58.

**Arulselvan** P, Fard MT, Tan WS, Gothai S, Fakurazi S, Norhaizan ME, Kumar SS. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Oxid Med Cell Longev*. **2016**; 5260.

**Ayob** AZ, Ramasamy TS. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *J Biomed Sci*. **2018**; 25(1):20.

**Babiker** A, Alawi A, Al Atawi M, Al Alwan I. The role of micronutrients in thyroid dysfunction. *Sudan J Paediatr*. **2020**; 20(1):13-19.

**Bahmad** H., Chamaa F., Assi S., Chalhoubm M., Abou-Antoun T., y Abou-Kheir W. Cancer Stem Cells in Neuroblastoma: Expanding the Therapeutic Frontier. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. **2019**; 12:131.

**Bahmad** HF, Elajami MK, Daouk R, Jalloul H, Darwish B, Chalhoub RM, Assi S, Chamaa F, Abou-Kheir W. Stem Cells: In Sickness and in Health. *Curr Stem Cell Res Ther*. **2021**; 16(3):262-276.

**Bakir** B, Chiarella AM, Pitarresi JR, Rustgi AK. EMT, MET, Plasticity, and Tumor Metastasis. *Trends Cell Biol*. **2020**; 30(10):764-776

**Bárdos** JI, Ashcroft M. Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochim Biophys Acta*. **2005**;1755(2):107-20.

**Barr** EK, Applebaum MA. Genetic Predisposition to Neuroblastoma. *Children (Basel)*. **2018**; 5(9):119.

**Basta** NO, Halliday GC, Makin G, Birch J, Feltbower R, Bown N, Elliott M, Moreno L, Barone G, Pearson AD, James PW, Tweddle DA, McNally RJ. Factors associated with recurrence and survival length following relapse in patients with neuroblastoma. *Br J Cancer*. **2016**; 115(9):1048-1057.

**Batth** IS, Dao L, Satelli A, Mitra A, Yi S, Noh H, Li H, Brownlee Z, Zhou S, Bond J, Wang J, Gill J, Sholler GS, Li S. Relapse prediction based on circulating cell-surface vimentin-positive tumor cells in a long-term longitudinal study of patients with post-remission neuroblastoma. *Int J Cáncer*. **2020**; 147(12):3550-3559.

**Becker** J, Wilting J. WNT Signaling in Neuroblastoma. *Cancers*. **2019**; 11:1013.



**Bhoopathi P**, Pradhan AK, Bacolod MD, Emdad L, Sarkar D, Das SK, Fisher PB. Regulation of neuroblastoma migration, invasion, and in vivo metastasis by genetic and pharmacological manipulation of MDA-9/Syntenin. *Oncogene*. **2019**; 38(41): 6781-6793.

**Bigoni-Ordóñez GD**, Ortiz-Sánchez E, Rosendo-Chalma P, Valencia-González HA, Aceves C, García-Carrancá A. Molecular iodine inhibits the expression of stem markers in cancer stem cells from established cell lines derived from cervical cancer. *BMC Cáncer*. **2018**; 18(1):928.

**Borenäs M**, Umapathy G, Lai WY, Lind DE, Witek B, Guan J, Mendoza-Garcia P, Masudi T, Claeys A, Chuang TP, El Wakil A, Arefin B, Fransson S, Koster J, Johansson M, Gaarder J, Van den Eynden J, Hallberg B, Palmer RH. ALK ligand ALKAL2 potentiates MYCN-driven neuroblastoma in the absence of ALK mutation. *EMBO J*. **2021**; 40(3):e105784.

**Brabletz T**, Kalluri R, Nieto MA, Weinberg RA. EMT in cancer. *Nat Rev Cancer* **2018**; 18:128-134.

**Brodeur GM**, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F, et al. Revisions of the international criteria for the diagnosis, staging and response to treatment of neuroblastoma. *J Clin Oncol*. **1993**; 11(8):1466-77.

**Bronner ME**, LeDouarin, NM. Development and evolution of the neural crest: An overview. *Developmental Biology*. **2012**; 366:2-9.

**Bumpous LA**, Moe KC, Wang J, Carver LA, Williams AG, Romer AS, Scobee JD, Maxwell JN, Jones CA, Chung DH, Tansey WP, Liu Q, Weissmiller AM. WDR5 facilitates recruitment of N-MYC to conserved WDR5 gene targets in neuroblastoma cell lines. *Oncogenesis*. **2023**;12(1):32.

**Cangelosi D**, Brignole C, Bensa V, Tamma R, Malaguti F, Carlini B, Giusto E, Calarco E, Perri P, Ribatti D, Fonseca NA, Moreira JN, Eva A, Amoroso L, Conte M, Garaventa A, Sementa AR, Corrias MV, Ponzoni M, Pastorino F. Nucleolin expression has prognostic value in neuroblastoma patients. *EBioMedicine*. **2022**; 85:104300.

**Chang C.** Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance. *Medicine* vol. **2016**; 95,1:20-25.

**Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM.** PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med.* **2001**; 48-52.

**Chen C, Huang R, Zhou J, Guo L, Xiang S.** Formation of pre-metastatic bone niche in prostate cancer and regulation of traditional chinese medicine. *Front Pharmacol.* **2022**; 13:897942.

**Chen T, You Y, Jiang H, Wang ZZ.** Epithelial-mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis. *J Cell Physiol.* **2017**; 232(12):3261-3272.

**Cheng HS, Tan WR, Low ZS, Marvalim C, Lee JYH, Tan NS.** Exploration and Development of PPAR Modulators in Health and Disease: An Update of Clinical Evidence. *Int J Mol Sci.* **2019**; 20(20):5055.

**Chung C, Boterberg T, Lucas J, Panoff J, Valteau-Couanet D, Hero B, Hill-Kayser CE.** Neuroblastoma. *Pediatric Blood & Cancer.* **2021**; 68:2.

**Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau CS, Verstegen NJM, Ciampricotti M, Hawinkels LJAC, Jonkers J, de Visser KE.** IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature.* **2015**; 522(7556):345-348.

**Cohn S, Pearson A, London W.** The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: An INRG task force report. *J Clin Oncol* **2009**; 27:289-297.

**Cohen MA, Zhang S, Sengupta S, Ma H, Bell GW, Horton B, Sharma B, George RE, Spranger S, Jaenisch R.** Formation of Human Neuroblastoma in Mouse-Human Neural Crest Chimeras. *Cell Stem Cell.* **2020**; 26(4):579-592.

**Croteau N, Nuchtern J, LaQuaglia MP.** Management of Neuroblastoma in Pediatric Patients. *Surg Oncol Clin N Am.* **2021**; (2):291-304.

**De la Vieja A, Santisteban P.** Role of iodide metabolism in physiology and cancer. *Endocr Relat Cancer.* **2018**; R225-R245.

**Delloye-Bourgeois** y Castellani V. Hijacking of Embryonic Programs by Neural Crest-Derived Neuroblastoma: From Physiological Migration to Metastatic Dissemination. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. **2019**; 12:52

**Dianat** H, Heidarifard M, Jahanban-Esfahlan R, Panahi Y, Hamishehkar H, Pouremanali F, Rahbarghazi R, Nouri M. Cancer stem cells-emanated therapy resistance: Implications for liposomal drug delivery systems. *J Control Release* **2018**; 288:62-83.

**Dhaar** GM, Robbani I. Nutritional problems of mothers and children. *Foundations of Community Medicine: Reed Elsevier*. **2008**; 272-280.

**Dongre** A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **2019**; 20:69-84.

**Duborská** E, Matulová M, Vaculovič T, Matúš P, Urík, M. Iodine fractions in soil and their determination. *Forests*. **2021**; 12:1512.

**Duffy** DJ, Krstic A, Schwarzl T, Halasz M, Iljin K, Fey D, Haley B, Whilde J, Haapa-Paananen S, Fey V, Fischer M, Westermann F, Henrich KO, Bannert S, Higgins DG, Kolch W. Wnt signalling is a bi-directional vulnerability of cancer cells. *Oncotarget*. **2016**; (37):60310-60331.

**Du** X, Shao Y, Qin HF, Tai YH, Gao HJ. ALK-rearrangement in non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Thorac Cancer*. **2018**; 9(4):423-430.

**Dupin** E, Calloni GW, Coelho-Aguiar JM, Le Douarin NM. The issue of the multipotency of the neural crest cells. *Dev Biol*. **2018**; 444 Suppl 1:S47-S59.

**Fares** J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther*. **2020**; 5:28.

**Fearon** K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, Jatoi A, Loprinzi C, MacDonald N, Mantovani G, Davis M, Muscaritoli M, Ottery F, Radbruch L, Ravasco P, Walsh D, Wilcock A, Kaasa S, Baracos VE. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lanceta Oncol*. **2011**; (5):489-95.

**Fields** GB. Mechanisms of Action of Novel Drugs Targeting Angiogenesis-Promoting Matrix Metalloproteinases. *Frontiers in Immunology*. **2019**; 10:1278.

**Garner** EF, Beierle EA. Cancer Stem Cells and Their Interaction with the Tumor Microenvironment in Neuroblastoma. *Cancers (Basel)*. **2015**; 8(1):5.

**Gärtner** R, Rank P, Ander B. The role of iodine and delta-iodolactone in growth and apoptosis of malignant thyroid epithelial cells and breast cancer cells. *Hormones (Athens)*. **2010**; (1):60-6.

**Ghouse** SM, Vadrevu SK, Manne S, Reese B, Patel J, Patel B, Silwal A, Lodhi N, Paterson Y, Srivastava SK, Karbowniczek M, Markiewski MM. Therapeutic Targeting of Vasculature in the Premetastatic and Metastatic Niches Reduces Lung Metastasis. *J Immunol*. **2020**; 204(4):990-1000.

**Greenwald** MB, Frušić-Zlotkin M, Soroka Y, Ben-Sasson S, Bianco-Peled H, Kohen R., A novel role of topical iodine in skin: Activation of the Nrf2 pathway. *Free Radic. Biol. Med*. **2017**; 104:238-248.

**Gupta** MK, Mallepalli S, Damu A, Vadde R. Neuroblastoma and Stem Cell Therapy: An Updated Review. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. **2021**;20(7): 625-643.

**Hapach** LA, Mosier JA, Wang W Engineered models to parse apart the metastatic cascade. *Precis. Onc*. **2019**; 3:20.

**Hero** B, Simon T, Spitz R, Ernestus K, Gnekow AK, Scheel-Walter HG, Schwabe D, Schilling FH, Benz-Bohm G, Berthold F. Localized infant neuroblastomas often show spontaneous regression: results of the prospective trials NB95-S and NB97. *Journal of clinical oncology* **2008**; 26:1504-1510.

**Holla** VR, Elamin YY, Bailey AM, Johnson AM, Litzenburger BC, Khotskaya YB, Sanchez NS, Zeng J, Shufean MA, Shaw KR, Mendelsohn J, Mills GB, Meric-Bernstam F, Simon GR. ALK: a tyrosine kinase target for cancer therapy. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*. **2017**; 3(1):a001115.

**Huang** Y, Hong W, Wei X. The molecular mechanisms and therapeutic strategies of EMT in tumor progression and metastasis. *J Hematol Oncol*. **2022**;15(1):129.

**Iannuzzo** G, Campanozzi A, Trevisani V, Rutigliano I, Abate V, Rendina D, De Filippo G. Iodine Requirements in Pediatrics: From Fetal Life to Adolescence. *Front Endocrinol (Lausanne)*. **2022**; 13:929176.

**Irwin** MS, Naranjo A, Zhang FF, Cohn SL, London WB, Gastier-Foster JM, Ramirez NC, Pfau R, Reshmi S, Wagner E, Nuchtern J, Asgharzadeh S, Shimada H, Maris

JM, Bagatell R, Park JR, Hogarty MD. Revised neuroblastoma risk classification system: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. **2021**; 39(29):3229-3241.

**Jensen** JB, Parmar M. Strengths and limitations of the neurosphere culture system. *Mol Neurobiol*. **2006**; 34:153-161.

**Johnsen** JI, Dyberg C, Wickström M. Neuroblastoma a Neural Crest Derived Embryonal Malignancy. *Front Mol Neurosci* **2019**; 12:9.

**Kalcheim** C. Epithelial-Mesenchymal Transitions during Neural Crest and Somite Development. *J Clin Med* **2015**; 5:1.

**Kalluri** R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* **2009**; 119:1420-1428.

**Kermoison** G, Draganescu C. Role of Dietary and Environmental Factors on Thyroid Cancer in Romania: A Brief Review. *Diagnostics (Basel)*. **2022**; 12(8):1959.

**Lai** X, Liu J, Zou Z, Wang Y, Wang Y, Liu X, Huang W, Ma Y, Chen Q, Li F, Wu G, Li W, Wang W, Yuan Y, Jiang B. SOX10 ablation severely impairs the generation of postmigratory neural crest from human pluripotent stem cells. *Cell Death Dis*. **2021**; 12(9):814.

**Lam** WA, Cao L, Umesh V. Extracellular matrix rigidity modulates neuroblastoma cell differentiation and N-myc expression. *Mol Cancer* **2010**; 9:35.

**Lee** W, Ko SY, Mohamed MS, Kenny HA, Lengyel E, Naora H. Neutrophils facilitate ovarian cancer premetastatic niche formation in the omentum. *J Exp Med*. **2019**; 216(1):176-194.

**Leggett** S.E, Hruska A.M, Guo M. The epithelial-mesenchymal transition and the cytoskeleton in bioengineered systems. *Cell Commun Signal*. **2021**; 19:32

**Li** H, Wang Q, Dong L, Liu C, Sun Z, Gao L, Wang X. Morusin suppresses breast cancer cell growth in vitro and in vivo through C/EBP $\beta$  and PPAR $\gamma$  mediated lipoapoptosis. *J Exp Clin Cancer Res*. **2015**; 34:137.

**Li** J, Wang S, Wang N, Zheng Y, Yang B, Wang X, Zhang J, Pan B, Wang Z. Aiduqing formula inhibits breast cancer metastasis by suppressing TAM/CXCL1-induced Treg differentiation and infiltration. *Cell Commun Signal*. **2021**; 19(1):89.

**Li L**, Candelario KM, Thomas K, Wang R, Wright K, Messier A, Cunningham LA. Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) is required for neural stem cell maintenance and vascular stability in the adult mouse SVZ. *J Neurosci.* **2014**; 34(50):16713-9.

**Li Y**, Li M, Su K, Zong S, Zhang H, Xiong L. Pre-metastatic niche: from revealing the molecular and cellular mechanisms to the clinical applications in breast cancer metastasis. *Theranostics.* **2023**; 13(7):2301-2318.

**Liu Y**, Cao X. Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. *Cancer Cell.* **2016**; 30(5):668-681.

**Liu JA**, Cheung M. Neural crest stem cells and their potential therapeutic applications. *Dev Biol.* **2016**; 419(2):199-216.

**Liu S**, Yin W, Lin Y, Huang S, Xue S, Sun G, Wang C. Metastasis pattern and prognosis in children with neuroblastoma. *World J Surg Oncol.* **2023**; 21(1):130.

**Lossow K**, Renko K, Schwarz M, Schomburg L, Schwerdtle T, Kipp AP. The Nutritional Supply of Iodine and Selenium Affects Thyroid Hormone Axis Related Endpoints in Mice. *Nutrients.* **2021**; 13(11):3773.

**Lugassy C**, Escande JP. The haematogenous theory of metastasis: Récamier did not propose it. *Virchows Archiv: an international journal of pathology.* **1997**; 431:431.

**Luo Y**, Xiao JH. Inflammatory auxo-action in the stem cell division theory of cancer. *PeerJ.* **2023**; 11:e15444.

**Majidpoor J**, Mortezaee K. Steps in metastasis: an updated review. *Med Oncol.* **2021**; 38(1):3.

**Maris J**, Hogarty M, Bagatell R. Neuroblastoma. *Lancet* **2007**; 369:2106-2120.

**Marquardt JU**, Factor VM, Thorgeirsson SS. Epigenetic regulation of cancer stem cells in liver cancer: current concepts and clinical implications. *J Hepatol.* **2010**; 53:568-77.

**Marrano P**, Irwin MS, Thorner PS. Heterogeneity of MYCN amplification in neuroblastoma at diagnosis, treatment, relapse, and metastasis. *Genes Chromosomes Cancer.* **2017**; 56(1):28-41.

**Meitar D**, Crawford SE, Rademaker AW y Cohn SL. Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification, and poor prognosis in human neuroblastoma. *Revista de oncología clínica* **1996**; 14:405-414.

**Mendieta I**, Nuñez RE, Nava M. Molecular iodine exerts antineoplastic effects by diminishing proliferation and invasive potential and activating the immune response in mammary cancer xenografts. *BMC Cancer* **2019**; 19:261

**Mendieta I**, Rodríguez-Gómez G, Rueda-Zarazúa B, Rodríguez-Castelán J, Álvarez-León W, Delgado-González E, Anguiano B, Vázquez-Martínez O, Díaz-Muñoz M, Aceves C. Molecular iodine synergized and sensitized neuroblastoma cells to the antineoplastic effect of ATRA. *Endocr Relat Cancer*. **2020**: 699-710.

**Mhaidly R**, Mechta-Grigoriou F. Fibroblast heterogeneity in tumor micro-environment: Role in immunosuppression and new therapies. *Semin Immunol*. **2020**; 48:101417.

**Mittal V**. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annu Rev Pathol*. **2018**; 13:395-412.

**Mohyeldin A**, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*. **2010**; (2):150-61.

**Moreno-Vega A**, Vega-Riveroll L, Ayala T, Peralta G, Torres-Martel JM, Rojas J, Mondragón P, Domínguez A, De Obaldía R, Vecilla-Guerrero C, Anguiano B, Delgado-González E, Zambrano-Estrada X, Cuenca-Micó O, De La Puente Flores O, Varela-Echavarría A, Aceves C. Adjuvant Effect of Molecular Iodine in Conventional Chemotherapy for Breast Cancer. Randomized Pilot Study. *Nutrients*. **2019**:11(7):1623.

**Nava-Villalba, M.** Aceves C. 6-Iodolactone, key mediator of antitumoral properties of iodine. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, **2014**; 112:27-29.

**Nava-Villalba, M.** Nuñez RE, Bontempo A, Aceves C. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is crucial for antitumoral effects of 6-iodolactone. *Molecular cancer*. **2015**; 14:168.

**Nedić O.** Iodine: Physiological importance and food sources. *eFood*, **2023**; 4:63.

**Nelson AR**, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biological activity and clinical implications. *J Clin Oncol*. **2000**; (5):1135-49.

**Ogorodnikov A**, Levin M, Tattikota S, Tokalov S, Hoque, M, Scherzinger D, Marini F, Poetsch A, Binder H, Macher-Göppinger S, Probst HC, Tian B, Schaefer M, Lackner KJ, Westermann F, Danckwardt S. Transcriptome 3'end organization by

PCF11 links alternative polyadenylation to formation and neuronal differentiation of neuroblastoma. *Nature communications* **2018**; 9:5331.

**Otte** J, Dyberg C, Pepich A, Johnsen JI. Role of MYCN in the development of neuroblastoma. *Frente Oncol.* **2021**; 10:624079.

**Palmer** RH, Vernersson E, Grabbe C, Hallberg B. Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *Biochem J.* **2009**; 420(3):345-61.

**Parodi** F, Carosio R, Ragusa M, Di Pietro C, Maugeri M, Barbagallo D, Sallustio F, Allemanni G, Pistillo MP, Casciano I, Forlani A, Schena FP, Purrello M, Romani M, Banelli B. Epigenetic dysregulation in neuroblastoma: A history of miRNAs and DNA methylation. *Biochim Biophys Acta.* **2016**; 1859(12):1502-1514.

**Paunkov** A, Chartoumpakis DV, Ziros PG, Sykiotis GP., A Bibliometric Review of the Keap1/Nrf2 Pathway and its Related Antioxidant Compounds. *Antioxidants.* **2019**; 8:353.

**Quintero-García** M, Delgado-González E, Sánchez-Tusie A, Vázquez M, Aceves C, Anguiano B., Iodine prevents the increase of testosterone-induced oxidative stress in a model of rat prostatic hyperplasia. *Free Radic. Biol. Med.* **2018**; 115:298-308.

**Reya** T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* **2001**; 414:105-11.

**Reynolds** CP, Wang Y, Melton LJ, Einhorn PA, Slamon DJ, Maurer BJ. Retinoic-acid-resistant neuroblastoma cell lines show altered MYC regulation and high sensitivity to fenretinide. *Medical and pediatric oncology* **2000**; 35:597-602.

**Riesco-Eizaguirre** G, Santisteban P, De la Vieja A. The complex regulation of NIS expression and activity in thyroid and extrathyroidal tissues. *Endocr Relat Cancer.* **2021**; 28(10):T141-T165.

**Ross** R, Biedler J, y Spengler B. A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors. *Cancer Letters.* **2003**; 197; 1-2.

**Ross** R, Walton JD, Han D, Guo HF, Cheung NK. A distinct gene expression signature characterizes human neuroblastoma cancer stem cells. *Stem Cell Res.* **2015**; 15(2):419-26.



**Roth** DM, Bayona F, Baddam P, Graf D. Craniofacial Development: Neural Crest in Molecular Embryology. *Head Neck Pathol.* **2021** (1):1-15.

**Rösner** H, Torremante P, Möller W, Gärtner R. Antiproliferative/cytotoxic activity of molecular iodine and iodolactones in various human carcinoma cell lines. No interfering with EGF-signaling, but evidence for apoptosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* **2010**; 118:410-9.

**Sherwood** Lauralee. Human physiology; from cells to systems. Belmont, CA: Brooks/cole, Cengage Learning. **2013**; 693-695.

**Shrivastava** A. Molecular Iodine Induces Caspase-independent Apoptosis in Human Breast Carcinoma Cells Involving the Mitochondria-mediated Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **2006**; 281:19762-19771.

**Smith** V, Foster J. High-Risk Neuroblastoma Treatment Review. *Children* **2018**; 5:114.

**Srivastava** R, Tiwari S, Banakar PS, Bhakat M, Mani V, Mohanty TK, Mondal G. Iodine Supplementation Improved Antioxidant Status, Hormonal Status, Sexual Behavior, and Semen Production Performance of *Bos indicus* Bulls Under Tropical Climatic Condition. *Biol Trace Elem Res.* **2022**; 200(11):4690-4703.

**Stemple** D, Anderson D. Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *CellPress.* **1992**; 71:973-985.

**Stuhlmiller** T, García-Castro M. Current perspectives of the signaling pathways directing neural crest induction. *Cell Mol Life Sci.* **2012**; 69:3715-37.

**Suebsoonthron** J, Jaroonwichawan T, Yamabhai M, Noisa P. Inhibition of WNT signaling reduces differentiation and induces sensitivity to doxorubicin in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Anticancer Drugs.* **2017**; (5):469-479.

**Szabó** A, Mayor R. Mechanisms of Neural Crest Migration. *Annu Rev Genet.* **2018**; 52:43-63.

**Szemes** M, Greenhough A, Melegh Z, Malik S, Yuksel A, Catchpoole D, Gallacher K, Kollareddy M, Park JH, Malik K. Wnt Signaling drives context-dependent differentiation or proliferation in neuroblastoma. *Neoplasia* **2018**; (4):335-350.

**Taggart** D, London W, Schmidt M. Prognostic value of the stage 4S metastatic pattern and tumor biology in patients with metastatic neuroblastoma diagnosed between birth and 18 months of age. *J Clin Oncol* **2011**; 29:4358-4364.

**Takita** J. Molecular basis and clinical features of neuroblastoma. *JMA J.* **2021**; 4(4):321-331.

**Tan** X, Gong W, Chen B, Gong B, Hua Z, Zhang S, Chen Y, Li Q, Li Z. Downregulation of fibronectin 1 attenuates ATRA-induced inhibition of cell migration and invasion in neuroblastoma cells. *Mol Cell Biochem.* **2021**; 476(10):3601-3612.

**Thomas** S, Thomas M, Wincker P, Babarit C, Xu P, Speer MC, Munnich A, Lyonnet S, Vekemans M, Etchevers HC. Human neural crest cells display molecular and phenotypic hallmarks of stem cells. *Hum Mol Genet.* **2008**; 17(21):3411-25.

**Tolbert** VP, Matthay KK. Neuroblastoma: clinical and biological approach to risk stratification and treatment. *Cell Tissue Res.* **2018**; 372(2):195-209.

**Tomolonis** JA, Agarwal S, Shohet JM. Neuroblastoma pathogenesis: deregulation of embryonic neural crest development. *Cell and tissue research.* **2018**; 372:245-262.

**Tsubota** S, Kadomatsu K. Origin, and initiation mechanisms of neuroblastoma. *Cell Tissue Res.* **2018**; 372(2):211-221.

**Tume** LF. Cancer stem cells as a research center for immunotherapy- *Venezuelan Journal of Oncology.* **2014**; 26:199-216.

**Tutter** M, Schug C, Schmohl KA, Urnauer S, Schwenk N, Petrini M, Lokerse WJM, Zach C, Ziegler S, Bartenstein P, Weber WA, Wagner E, Lindner LH, Nelson PJ, Spitzweg C. Effective control of tumor growth through spatial and temporal control of theranostic sodium iodide symporter (NIS) gene expression using a heat-inducible gene promoter in engineered mesenchymal stem cells. *Theranostics.* **2020**; 10(10):4490-4506.

**Vallée** A, Lecarpentier Y. Crosstalk Between Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma and the Canonical WNT/ $\beta$ -Catenin Pathway in Chronic Inflammation and Oxidative Stress During Carcinogenesis. *Front Immunol.* **2018**; 9:745.

**Van Nes** J, Chan A, van Groningen T, van Sluis P, Koster J, Versteeg R. A NOTCH3 transcriptional module induces cell motility in neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* **2013**; 19(13):3485-94.

**Van Zijl** F, Krupitza G, Mikulits W. Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutation research.* **2011**; 728:23–34.

**Visvader** JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer.* **2008**; 10:755-68.

**Wafer** R, Tandon P, Minchin JEN. The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARG) in Adipogenesis: Applying Knowledge from the Fish Aquaculture Industry to Biomedical Research. *Front Endocrinol (Lausanne).* **2017**; 28:102.

**Walcher** L, Kistenmacher AK, Suo H, Kitte R, Dluczek S, Strauß A, Blaudszun AR, Yevsa T, Fricke S, Kossatz-Boehlert U. Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Front Immunol.* **2020**; 11:1280.

**Walton** JD, Kattan DR, Thomas SK, Spengler BA, Guo HF, Biedler JL, Cheung NK, Ross RA. Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. *Neoplasia* **2004**; 6:838-45.

**Wang** Z, Li Y, Banerjee S, Sarkar FH. Emerging role of Notch in stem cells and cancer. *Cancer Lett.* **2009**; 279(1):8-12.

**Weigle** J, Bohnsack BL. Genetics Underlying the Interactions between Neural Crest Cells and Eye Development. *J Dev Biol.* **2020**; 8(4):26.

**Wisdom**, KM, Adebowale K, Chang J. Matrix mechanical plasticity regulates cancer cell migration through confining microenvironments. *Nat Commun* **2018**; 9:4144.

**Yang** L, Ke XX, Xuan F, Tan J, Hou J, Wang M, Cui H, Zhang Y. PHOX2B Is Associated with Neuroblastoma Cell Differentiation. *Cancer Biother Radiopharm.* **2016**; (2):44-51.

**Yang** L, Serra-Roma A, Gualandi M, Bodmer N, Niggli F, Schulte JH, Bode PK, Shakhova O. Lineage-restricted sympathoadrenal progenitors confer neuroblastoma origin and its tumorigenicity. *Oncotarget.* **2020**; 11(24):2357-2371.

**Zafar** A, Wang W, Liu G, Wang X, Xian W, McKeon F, Foster J, Zhou J, Zhang R. Molecular targeting therapies for neuroblastoma: Progress and challenges. *Med Res Rev.* **2021**; 41(2):961-1021.

**Zambrano-Estrada** X, Landaverde-Quiroz B, Dueñas-Bocanegra A.A, De Paz-Campos MA, Hernández-Alberto G, Solorio-Perusquia B, Trejo-Mandujano M, Pérez-Guerrero L, Delgado-González E, Anguiano B. Molecular iodine/doxorubicin neoadjuvant treatment impair invasive capacity and attenuate side effect in canine mammary cancer. *BMC Vet. Res.* **2018**; 14:87.

**Zbigniew** S. Role of Iodine in Metabolism. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov.* **2017**;10(2):123-126.

**Zhang** TH, Liang LZ, Liu XL, Wu JN, Su K, Chen JY, Zheng QY. LncRNA UCA1/miR-124 axis modulates TGF $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition and invasion of tongue cancer cells through JAG1/Notch signaling. *J Cell Biochem.* **2019**; 120(6):10495-10504.

**Zhang** X, Wang G, Li Y, Chuai M, Lee KK, Yang X. Role of FGF signalling in neural crest cell migration during early chick embryo development. *Zygote*, **2018**;1:1-8.

**Zhang** X, Zhang F, Li Q, Feng C, Teng W. Iodine nutrition and papillary thyroid cancer. *Front Nutr.* **2022**; 9:1022650.

**Zimna** A, Kurpisz M. Hipoxia-Inducible Factor-1 en angiogénesis fisiológica y fisiopatológica: aplicaciones y terapias. *Biomed Res* **2015**; 549412.

**Zurlo** D, Ziccardi P, Votino C, Colangelo T, Cerchia C, Dal Piaz F, Dallavalle S, Moricca S, Novellino E, Lavecchia A, Colantuoni V, Lupo A. The antiproliferative and proapoptotic effects of cladospirals A and B are related to their different binding mode as PPAR $\gamma$  ligands. *Biochem Pharmacol.* **2016**; 108:22-35.