



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**LA MUERTE CELULAR EN LOS PROCESOS
BIOLÓGICOS:**

**EL NEUROBLASTOMA COMO MODELO DE
APOPTOSIS Y LAS PAUTAS PARA SU
TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO**

**SEMINARIO DE
TITULACIÓN**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

JESÚS CHRISTIAN MORENO VARGAS

**DOCTORA MARÍA DEL CARMEN MEJÍA
VÁZQUEZ**



2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno
Moreno
Vargas
Jesús Christian
56 59 08 10
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
2. Datos del tutor
Dra.
María del Carmen
Mejía
Vázquez
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Concepción
Sánchez
Gómez
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Gloria
Acacia
Benítez
King
5. Datos del sinodal 3
Dra.
Margarita Teresa de Jesús
García
Gasca
6. Datos del sinodal 4
M. en C.
Miguel Angel
Palomino
Garibay
7. Datos del trabajo escrito
El Neuroblastoma como Modelo de Apoptosis y las Pautas para su Tratamiento
Farmacológico
105 p.
2010

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a la Dra. María del Carmen Mejía Vázquez, mi tutora, por su orientación y enorme paciencia en la realización de este trabajo. Así también, quiero agradecer a mis sinodales: la Dra. Concepción Sánchez Gómez, la Dra. Gloria Benítez King, la Dra. Teresa García Gasca y el M. en C. Miguel Angel Palomino Garibay, por sus valiosas aportaciones y sugerencias.

Agradezco también el apoyo de CONACYT en el proyecto de investigación básica No. 55464, así como de REDES, con el proyecto No. 60085.

Al Dr. José Erazo Espinoza por su enseñanza de la Biología, determinante en mi vocación.

A Ricardo Varela, gracias por todos estos años de auténtica amistad (“los invitados no merecen presentación”).

A Cloe.

A mis padres.

A mi árbol genealógico.

Donají, gracias por tu apoyo e infinito amor.

-Maestro, se dice que todo viene del Uno, pero ¿de dónde viene el Uno?

El maestro sonrió y respondió:

Cuando yo estaba en Osaka, me hice una camisa que pesaba una libra.

-Gracias maestro, he comprendido.

Koan

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
JUSTIFICACIÓN.....	5
EXPOSICIÓN DEL TEMA.....	6
1 Moléculas Involucradas en la Apoptosis.....	6
1.1 Receptores de muerte.....	7
1.1.1 Fas (APO-1/CD95L).....	8
1.1.2 Fas Ligando (FasL, CD95L o APO-1L).....	8
1.1.3 TRAIL.....	9
1.1.4 TNFR1.....	10
1.1.5 DR3.....	10
1.1.6 DR6.....	10
1.1.7 EDAR.....	11
1.2 Rutas de señalización.....	11
1.2.1 Señalización por CD95/Fas y TRAILR.....	12
1.2.2 Señalización por TNFR, DR3 y DR6.....	13
1.3 La familia Bcl-2.....	14
1.4 p53.....	16
1.5 <i>N-MYC</i>	18
1.6 Caspasas.....	20
1.6.1 La caspasa 8.....	22
1.7 Inhibidores de la apoptosis (IAPs).....	23
1.8 Survivina.....	24



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1.9 Smac/DIABLO.....	25
2 Rutas de la Apoptosis.....	27
2.1 Apoptosis mediada por receptores de muerte (la vía extrínseca)	27
2.2 Apoptosis mediada por la mitocondria (la vía intrínseca).....	27
3 El Neuroblastoma.....	30
3.1 Antecedentes.....	30
3.2 Epidemiología del neuroblastoma.....	32
3.3 Diferenciación del neuroblastoma.....	32
3.3.1 Neuroblastoma como derivado de la cresta neural.....	33
3.3.2 Tipos celulares del neuroblastoma.....	33
3.4 La inmunología del neuroblastoma.....	34
3.4.1 Estrategias evasivas del neuroblastoma contra la respuesta Innata y adaptativa del sistema inmunológico.....	35
4 Tratamiento Farmacológico del Neuroblastoma.....	36
4.1 Tratamiento con agentes quimioterapéuticos convencionales.....	37
4.1.1 Resistencia a agentes alquilantes.....	38
4.1.2 Resistencia a agentes inactivadores de los microtúbulos.....	40
4.1.3 Resistencia a agentes de rotura del DNA.....	40
4.1.4 Resistencia multifarmacológica.....	41
4.2 Nuevas terapias.....	42
4.2.1 Moduladores de resistencia.....	42
4.2.2 Potenciadores metabólicos de fármacos convencionales.....	44
4.2.3 Inhibidores de la topoisomerasa y activadores de la reparación del DNA.....	44
4.2.4 Agentes diferenciantes.....	45

4.2.5 Acido retinóico todo-trans.....	45
4.2.6 Fenretinida.....	46
4.2.7 Potenciadores de la apoptosis.....	47
4.2.8 Moduladores de la transducción de señales.....	49
4.2.9 Agentes antineoplásicos dirigidos.....	50
4.2.10 Agentes anti-migración y/o anti-adhesión.....	52
4.2.11 Compuestos metálicos (Casiopéinas).....	53
4.2.12 Inmunoterapia.....	54
4.2.13 Efectos adversos.....	55
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	57
ALCANCES ACTUALES Y PERSPECTIVAS.....	60
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	61
LITERATURA CITADA.....	71

RESUMEN

La apoptosis, un programa genético de muerte celular conservado evolutivamente en eucariontes superiores, es un proceso básico involucrado en el desarrollo y la diferenciación celular. La apoptosis puede ser esencial para la prevención de la formación de tumores, y se cree que los defectos en su regulación están ampliamente involucrados en la patogénesis de varias enfermedades, incluyendo el cáncer. En la mayoría de los casos, tanto los excesos en la proliferación celular como la muerte celular suprimida constituyen una plataforma para la progresión de las neoplasias.

La investigación básica sobre el cáncer ha producido importantes avances en el entendimiento de su biología y genética. Entre algunos de los avances más relevantes se encuentra el conocimiento de que la apoptosis y los genes que la regulan tienen un efecto profundo sobre el fenotipo maligno. Por ejemplo, se sabe que algunas mutaciones oncogénicas conducen a la iniciación, progresión o metástasis en un tumor. De manera opuesta, en carcinogénesis con múltiples estadios existe evidencia sólida que indica que otros cambios oncogénicos promueven la apoptosis, produciendo por lo tanto, presión selectiva para contrarrestarla. Hoy en día, está muy bien documentado que la mayoría de los agentes anticancerígenos citotóxicos inducen la apoptosis, originando la interrogante de si los defectos en los programas apoptóticos pueden contribuir a fallas en los tratamientos. Debido a que las mismas mutaciones que suprimen la apoptosis durante el desarrollo de un tumor también reducen la sensibilidad al tratamiento, la apoptosis provee un marco conceptual que permite ligar la genética del cáncer con su terapia. La investigación que se realiza en la actualidad está develando los mecanismos de regulación detrás de la apoptosis, con el fin de que esta información produzca nuevas estrategias que permitan explotarla con beneficios terapéuticos.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INTRODUCCIÓN

Entre 1992 y 1994, Bob Horvitz y sus alumnos Yun Ying Yuan y Michael Hengartner descubrieron la secuencia que codifica a tres componentes principales – *ced3*, *ced4* y *ced9* – del módulo genético involucrado en el control de la muerte celular programada (MCP) en *C. elegans*. Esto llevó al descubrimiento de que la maquinaria central de MCP de *C. elegans* tiene contrapartes conservadas evolutivamente en mamíferos, incluyendo al hombre (Horvitz, 1999; Vaux y Korsmeyer, 1999; Hengartner, 2000; Meier, 2000), en *Drosophila* (Song and Steller, 1999) y otras especies de animales (Ameisen, 2002). Dicha conservación a través de un rango de convergencia filogenética de alrededor de 700 millones de años reafirmó la idea de que la MCP pudo haber sido esencial para la sobrevivencia animal. Sin embargo, de acuerdo con la noción de que la evolución de rutas moleculares cruciales usualmente involucra tanto a la conservación genética como a la diversificación, al menos 14 homólogos del ejecutor Ced3 – las caspasas- fueron identificadas progresivamente en mamíferos, junto con al menos 20 homólogos del protector Ced9 – la familia antagonista Bcl-2/Bax (Horvitz, 1999; Hengartner, 2000; Meier, 2000), cuyos primeros miembros ya habían sido descubiertos previamente en humanos (Vaux et al., 1998, Vaux y Korsmeyer, 1999) previo a la descripción de la secuencia de Ced9 en *C. elegans*.

Lo anterior ha provisto un modelo para la identificación y el ordenamiento de las complejas y diversas rutas de MCP que operan en nuestras células, al mismo tiempo, la investigación llevada a cabo primero en células de mamífero, y posteriormente en las de *Drosophila*, reveló en ambas especies, el papel de varios actores moleculares, rutas de señalización y organelos intracelulares cuya implicación fue descrita a partir de los estudios realizados en *C. elegans*. Éstos incluyen la superfamilia de ligandos y receptores de muerte del factor de necrosis tumoral (TNF) (Krammer, 2000), los inhibidores de la apoptosis (IAPs) (Goyal, 2001), los inhibidores de las IAPs, tales como Reaper en *Drosophila* (Song y Steller, 1999), y Smac/Diablo en mamíferos (Goyal, 2001), la mitocondria y sus proteínas intermembranales, tales como el Citocromo *c* (Cit *c*) en mamíferos (Kroemer y Reed, 2000; Martinou y Green, 2001), y más recientemente, en células de *Drosophila*, pequeños micro RNAs no-codificantes (mRNA) que comparten similitudes con los RNAs de interferencia (RNAi) (Brennecke et al, 2003), y la identificación por el grupo de Bob Horvitz de miembros proapoptóticos del homólogo de Egl1 de la



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

familia única de BH3 pertenecientes a la familia Bcl2/Bax en mamíferos (Conradt y Horvitz, 1998), y su importante papel en la inducción de MCP en *C. elegans*.

Desde principios de los 90's, se han identificado varias formas de MCP en una amplia gama de ramas filogenéticamente divergentes en el árbol evolutivo, las cuales habían radiado mucho antes del surgimiento del ancestro común más reciente que compartimos con *C. elegans* (Ameisen, 1996; Ameisen, 2002). La MCP ha sido identificada también en las plantas, que aparecieron hace aproximadamente un billón de años, cerca del periodo en el cual surgieron los primeros animales. En varias plantas, la MCP tiene un papel principal en el desarrollo, la reproducción sexual y la resistencia a infecciones (Greenberg, 1996; Beers, 1997); más aún, se han identificado diversas formas de procesos de muerte celular regulada en varias especies de eucariontes unicelulares, que surgieron entre 1 y 2 billones de años atrás, así como en varias especies de bacterias, cuyos ancestros se cree representaron las primeras formas de vida en nuestro planeta, y que surgieron alrededor de hace 4 billones de años (Ameisen, 2004).

El desciframiento molecular de la MCP se ha ido asociando con el avance en el conocimiento de algunas enfermedades humanas las cuales incluyen al cáncer, lo que ha llevado a la noción de que la desregulación de la MCP juega también un papel principal en la patogénesis (Umansky, 1982; Ameisen y Capron, 1991; Thompson, 1995; Evan y Littlewood, 1998; Vaux et al., 1998; Nicholson, 2000), las cuales incluyen al cáncer. Una serie de avances experimentales sobre enfermedades humanas agudas y crónicas en varios modelos animales, ha comprobado el potencial que la modulación artificial de la MCP tiene como una estrategia para el tratamiento de éstas, con amplias implicaciones (Gurney, 2000; Nicholson, 2000; Kaspar et al., 2003). Por lo tanto, los mecanismos moleculares de la MCP, han pasado de ser actores esenciales del desarrollo a ser reconocidos como blancos cruciales en la preservación del equilibrio fisiológico de varias especies, incluyendo al hombre (Ameisen, 2004).

El neuroblastoma es el tumor extracraneal más común de la infancia. Este tumor está asociado con alteraciones en la apoptosis. El aniquilamiento de las células tumorales mediante diversas estrategias citotóxicas tales como drogas anticancerígenas, radiación γ , genes suicidas o inmunoterapia, está mediado predominantemente por la inducción de apoptosis. Las dificultades para activar las rutas apoptóticas en respuesta al tratamiento farmacológico pueden conducir a la resistencia de las células de neuroblastoma a las terapias contra el cáncer (Van Roy et al., 2009). El entendimiento de los eventos moleculares que regulan la apoptosis inducida por terapias citotóxicas del neuroblastoma y cómo sus células evaden eventos apoptóticos puede aportar un nuevo paradigma para

el tratamiento de esta enfermedad. Por lo tanto, las nuevas estrategias dirigidas hacia la resistencia de las células de neuroblastoma tienen que basarse en la investigación de los mecanismos moleculares de la apoptosis así como de otros mecanismos de muerte celular.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una enfermedad altamente heterogénea, lo cual ha impulsado la aplicación de diversas modalidades terapéuticas para combatirlo, entre ellas la quimioterapia. El neuroblastoma muestra una quimioresistencia importante en este tipo de tratamientos (Dyer, 2004). Es por esto que el conocimiento de los aspectos moleculares de las rutas apoptóticas permitirá optimizar el desarrollo de nuevos fármacos, así como la implementación de estrategias para dirigir los efectos de estas terapias.

El neuroblastoma (NB) comprende entre el 8 y 10 % del total de los cánceres que afectan a niños (0-14 años de edad) en países como los Estados Unidos de América, Australia, y Europa, mientras que la frecuencia es generalmente más baja (3 %) en países latinoamericanos y en algunas ciudades de Asia, como Tianjin, China y Delhi y Madras en la India (Parkin et al., 1998).

En México, la frecuencia de NB es de 2.7 %. Es posible que la baja incidencia de neuroblastoma en niños mexicanos se deba a la dificultad para diagnosticar los casos con el pronóstico más favorable, algunos de los cuales pudieron haber presentado regresión espontánea (Juárez-Ocaña et al., 2009) pues mediante programas de evaluación más precisos utilizados en países desarrollados se ha demostrado que algunos pacientes pueden presentar regresión espontánea en alrededor del 50 % de los casos (Frisch et al., 2004; Oue et al., 2004).

Antes de considerar la posibilidad de que los niños mexicanos puedan tener una menor susceptibilidad y/o una exposición menor a factores de riesgo que condicionen el desarrollo de NB, debemos eliminar la posibilidad de que esta aparentemente más baja susceptibilidad se deba únicamente a una menor sospecha de la presencia de neuroblastoma y a la dificultad para establecer un diagnóstico.

Es necesario implementar un mejor seguimiento en los pacientes con NB con el fin de obtener una evaluación óptima del estado general de esta enfermedad en México. El presente trabajo constituye una revisión de los tratamientos farmacológicos actuales del neuroblastoma, tomando como base la explotación de rutas apoptóticas y de sus moléculas, en función del sistema internacional de su clasificación clínica. Lo anterior con el objeto de crear una referencia para optimizar el diagnóstico y el tratamiento de esta enfermedad en nuestro país.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EXPOSICIÓN DEL TEMA

1 Moléculas Involucradas en la Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada involucrada en el desarrollo embrionario y en la homeostasis de tejidos normales de organismos multicelulares (Thompson, 1995; Jacobson et al., 1997). Es un proceso caracterizado por cambios estructurales típicos que incluyen encogimiento celular, aburbujamiento de la membrana, condensación de la cromatina y fragmentación del DNA nuclear (Kerr 1971, Wyllie et al., 1980). Defectos en la regulación de la apoptosis pueden conducir a enfermedades humanas como el cáncer y desórdenes degenerativos (Thompson 1995).

La muerte celular apoptótica permite la eliminación de células dañadas, de células que se encuentran fuera de su localización normal o que se han hecho superfluas, a partir de proteólisis controladas de los componentes celulares como resultado de la activación de un programa interno (Ellis y Horvitz, 1986; Kerr y Harmon, 1991). La señal para la ejecución de apoptosis en la célula puede provenir de varios estímulos: señales químicas asociadas a receptores de membrana específicos para muerte celular (Tewari y Dixit, 1995), privación de factores de crecimiento (Deckwerth y Johnson, 1993), radiación ionizante (Datta et al., 1997) y drogas antineoplásicas (Fearnhead et al 1997). A pesar de la existencia de una variedad de señales de muerte, las características clave de ejecución se presentan de manera muy similar, la señal de muerte converge con la activación de un conjunto de proteasas, que a su vez hidrolizan substratos protéicos (Chinnaiyan y Dixit, 1996) dando así origen a la morfología apoptótica característica.

La apoptosis es regulada ya sea por receptores de membrana para muerte celular o por proteínas pro y antiapoptóticas de la familia Bcl-2. Esta familia de proteínas está dividida en dos subgrupos: uno de ellos es la llamada familia "multidominio" que incluye a los dominios BH1, BH2, BH3 y BH4 y que agrupa miembros proapoptóticos tales como Bax y BAK1/Bak, así como proteínas de sobrevivencia, por ejemplo: Bcl-2, BCL2L1/Bcl-XL, y MCL1. El otro subgrupo es la familia única con el dominio de muerte celular BH3, un grupo grande de inductores de la apoptosis, tales como PMAIP1/Noxa y BCL2L11/Bim que son activados por varios estímulos. En el momento de decisión de la muerte celular, el Citocromo c (Cit c) es liberado fuera de la mitocondria e induce la formación del llamado



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“apoptosoma”, complejo que conduce a la activación de la caspasa 9, así como de las caspasas efectoras (Obexer et al., 2009).

1.1 Receptores de muerte

El término *receptor de muerte* (DR) se refiere a un grupo de ocho miembros de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) que son proteínas transmembranales de paso simple (Ashkenazi, 2002). Los receptores de muerte son los únicos miembros de esta familia cuyos extremos citoplásmicos contienen una secuencia conservada de 80 aminoácidos llamada *dominio de muerte* (DD). En el contexto celular apropiado, la activación de un receptor de muerte conduce a la formación de un *complejo de señalización inductor de muerte* (DISC) en el dominio de muerte y a la subsecuente activación de cascadas río-abajo, conduciendo a la muerte de la célula que expresa el receptor (Ashkenazi, 2002; Peter et al., 2007). Fisiológicamente, la activación del receptor de muerte puede ocurrir en *cis*, mediante un ligando transmembranal expresado en la misma célula que el receptor, o en *trans*, a partir de la expresión del ligando en la superficie de otras células o por el ligando liberado en el medio extracelular (Haase et al., 2008). La activación de los miembros de la familia de receptores de muerte por sus respectivos ligandos, trae como resultado la transducción de señales tanto apoptóticas como de sobrevivencia.

Hasta ahora, se han caracterizado ocho miembros de la familia de receptores de muerte (Figura 1): *el receptor del factor de necrosis tumoral 1* (TNFR1; también conocido como DR1, CD120a, p55 y p60), CD95 (también conocido como DR2, APO-1 y Fas), DR3 (o APO-3. LARD, TRAMP y WSL1), *el receptor ligando inductor de la apoptosis relacionado a TNF 1* (TRAILR1; conocido también como DR4 y APO-2), TRAILR2 (DR5, KILLER y TRICK2), DR6, *receptor a ectodisplasia A* (EDAR) y *el receptor del factor de crecimiento neuronal* (NGFR) (French y Tschopp, 2003; Wajant, 2003). Estos se distinguen por una región citoplásmica de ~80 residuos conocida como dominio de muerte. Cuando estos receptores son activados por sus ligandos correspondientes, un conjunto de moléculas es reclutado hacia el DD y subsecuentemente, se activa una cascada de señalización. Los ligandos de muerte también interactúan con *receptores señuelo* (DcRs) (receptores que se piensa se encuentran en forma soluble por carecer de una región transmembranal) que no poseen dominios de muerte y por lo tanto no pueden formar complejos de señalización. A la fecha, se han caracterizado cuatro receptores señuelo: TRAILR3 (o DcR1), TRAILR4 (también conocido como DcR2) DcR3 y *osteoprotegerina* (OPG) (Lavrik et al., 2005).

1.1.1 Fas (APO-1/CD95)

Fas (APO-1/CD95) es un miembro de la familia del receptor de TNF, un grupo de proteínas transmembranales tipo I (Ashkenazi y Dixit, 1998). Fue identificado en 1989 como un blanco para anticuerpos que inducen apoptosis en varias líneas celulares humanas (Trauth, 1989). El Fas humano está conformado por 325 aminoácidos con una secuencia señal en el extremo NH₂-terminal y una región de membrana en medio de la molécula (Ekert y Vaux, 1997). El gen Fas (12 kb, 9 exones, localizado en el cromosoma humano 10), se expresa en diferentes líneas celulares y tejidos con una variabilidad considerable. El dominio extracelular de esta proteína está formado por tres subdominios ricos en cisteína, codificados por los exones 2, 3 y 4, mientras que la zona citoplásmica, incluyendo la región regulatoria (dominio de muerte), se encuentra en el exón 9.

Fas (APO-1/CD95) es un receptor de superficie celular esencial para la regulación del sistema inmunológico (Nagata, 1997), especialmente para respuestas mediadas por células T, el mantenimiento del privilegio inmune (Abbas, 1996) y la prevención de la producción de anticuerpos (Rathmell et al., 1996). Una familia de proteasas de cisteína, llamadas caspasas (Alnemri et al., 1996) juega papeles críticos en la muerte celular apoptótica inducida por Fas.

Fas es una molécula de membrana homotrimérica en la que cada trímero de FasL se une a tres moléculas del receptor Fas sobre la superficie de la célula blanco. Esto trae como resultado el agrupamiento de los DD de los receptores, los cuales después reclutan al *dominio de muerte asociado a Fas* (FADD) al unirse a los dominios de muerte de FADD. FADD no solo contiene un DD, sino también un *dominio efector de muerte* (DED) que se une a un dominio análogo repetido en tándem dentro de la forma cimógena de la caspasa 8. El complejo del receptor de Fas (trímero), FADD y la caspasa 8 es llamado DISC. A partir del reclutamiento por FADD, la oligomerización de la caspasa 8 conduce a su activación mediante proteólisis de sí misma (Muzio et al., 1998). La caspasa 8 activa entonces la cascada río-abajo de las caspasas, comprometiendo a la célula hacia la apoptosis (Ekert y Vaux, 1997).

1.1.2 Fas Ligando (FasL, CD95L o APO-1L))

FasL fue purificado en 1993 a partir de la fracción de membrana solubilizada de una línea citotóxica de células T que se observó que mataba células blanco que expresaban Fas, no así a aquellas que no lo expresaban; finalmente, se clonó el cDNA de FasL (Takahashi et al., 1994). El gen de Fas se localiza en el cromosoma humano 1 y comprende 5 exones. Codifica una proteína de 40 kDa que no posee una secuencia señal en el extremo NH₂, pero sí tiene un dominio de aminoácidos hidrofóbicos en medio de la molécula, con la

región C-terminal fuera de la célula. Esta región extracelular comparte una alta homología con la región correspondiente de otros miembros de la familia TNF. FasL es expresada casi exclusivamente por líneas celulares T activadas. La expresión de FasL puede ser inducida en células T a través de la activación del receptor de la célula T (Ekert y Vaux, 1997).

Fas y algunos miembros de esta familia (receptores de muerte) tienen un dominio de muerte en su región citoplásmica, la cual es esencial para la inducción de la apoptosis. El único ligando fisiológico conocido de Fas, FasL (CD95L o APO-1L), pertenece a la familia de citocinas relacionadas a TNF (Nagata, 1997). Como muchos de sus parientes, FasL es sintetizado como una molécula transmembranal y los trímeros solubles de FasL pueden generarse a través de procesos mediante una metaloproteasa (Schneider et al., 1998; Tanaka et al., 1998).

Fas y FasL juegan un papel importante en tres principales tipos de apoptosis fisiológica: (i) deleción periférica de células T maduras activadas al final de la respuesta inmunológica; (ii) la muerte de blancos como células infectadas por virus o células cancerosas por células T citotóxicas y por células natural killer; y (iii) la muerte de células inflamatorias en sitios de “privilegio inmune” (Ashkenazi y Dixit, 1998).

1.1.3 TRAIL

El *ligando inductor de la apoptosis relacionado a TNF* (TRAIL), también conocido como Apo-2L, es un miembro de la superfamilia TNF (Wiley et al., 1995; Pitti et al., 1996) y es capaz de inducir apoptosis en varios tipos celulares, incluyendo células tumorales e infectadas con virus, no así en células normales (Griffith y Lynch, 1998; Ashkenazi y Dixit, 1999; Sedger et al., 1999). Se han identificado cinco receptores TRAIL: los receptores de muerte 4 (DR4/TRAIL-R1) y DR5/TRAIL-R2 tienen la habilidad de iniciar la cascada de señalización de la apoptosis después del ligamiento, mientras que los receptores señuelo 1 (DcR1/TRID/TRAIL-R3) y DcR2/TRAIL-R4/TRUNDD carecen de dicha propiedad. Se ha reportado que los receptores señuelo TRAIL-R3 y -R4, evitan la apoptosis extensiva en células y tejidos que expresan tanto TRAIL como los receptores de muerte TRAIL-R1 y -R2. La osteoprotegerina es un receptor sensible a TRAIL y también puede actuar como un receptor señuelo. El balance de los niveles de expresión entre los receptores y los señuelos de muerte es un factor importante que determina el efecto apoptótico de TRAIL (Ashkenazi y Dixit, 1999; Griffith y Lynch, 1998).

TRAIL se expresa en una amplia variedad de células humanas, incluyendo células T, monocitos, células dendríticas y células natural killer (Thomas y Hersey, 1998; Kayagaki et

al., 1999). La expresión de TRAIL ha sido implicada en la toxicidad de estos tipos celulares contra células tumorales y células normales como las células T. De hecho, existen estudios que indican el papel de TRAIL en la sobrevivencia inmunológica de células tumorales por células NK y T (Smyth et al., 2003), así como en la apoptosis de timocitos y en la inducción de enfermedades autoinmunes (Lamhamedi-Cherradi et al., 2003).

1.1.4 TNFR1

El receptor del factor de necrosis tumoral 1 es una proteína de 55kDa expresada en una amplia variedad de líneas celulares. Es activada por su ligando TNF- α el cual es producido principalmente por macrófagos y células T activados en respuesta a infecciones. El ligamiento de TNFR1 genera la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, conduciendo a la inducción de genes proinflamatorios e inmunomoduladores. En algunos tipos celulares, TNF- α también induce apoptosis (Ekert y Vaux, 1997).

1.1.5 DR3

El *receptor de muerte 3* (DR3), también conocido como TNFRSF25, TRAMP, LARD o WSL-1 es un receptor de la familia TNF que contiene un dominio de muerte que, al igual que el *receptor del factor de necrosis tumoral 1* (TNFR1), se une a la molécula adaptadora (TRADD) a través de su dominio de muerte citoplásmico. El reclutamiento de TRADD dota a DR3 de una doble capacidad para activar la señalización de NF- κ B y MAP-cinasa (MAPK) o para disparar alternativamente la activación de las caspasas y la muerte celular programada (Screaton et al., 1997; Wen et al., 2003). Sin embargo, a diferencia de TNFR1, el cual se expresa ampliamente, DR3 se expresa principalmente en linfocitos T (Screaton et al., 1997; Su et al., 2004). El ligando para DR3 fue identificado en 2002 como el *ligando similar a TNF* (TL1A) de la familia TNF (Migone et al., 2002). Cuando se suministra a ciertas líneas celulares tumorales, TL1A puede inducir apoptosis después de la adición de ciclohexamida. Sin embargo, en células T primarias, se ha reportado que TL1A incrementa la proliferación y la producción de *interleucina-2* (IL-2) y de *interferón γ* (IFN- γ) inducido por la unión cruzada al *receptor de la célula T* (TCR) (Papadakis et al., 2004).

1.1.6 DR6

El *receptor de muerte 6* (DR6) es un receptor perteneciente a la superfamilia TNFR, posee un dominio de muerte y su expresión se observa en varios tejidos, incluyendo los linfoides (Pan et al., 1998; Liu et al., 2001; Zhao et al., 2001). Sin embargo, las funciones fisiológicas completas de DR6 son aún desconocidas. Algunos estudios hechos en ratones con

deficiencia de DR6 han demostrado que éste funciona como un regulador importante de la proliferación de las células T CD4⁺ y la diferenciación de linfocitos T *helper* (Th) (Liu et al., 2001; Zhao et al., 2001). No obstante, debido a que interacciones entre las células B y T les proveen de señales mutuamente benéficas que conducen a una respuesta inmune protectora, la disrupción dirigida de DR6 puede también tener efectos intrínsecos tanto en las células B, en su respuesta y en la respuesta humoral (Schmidt et al., 2003).

1.1.7 EDAR

El receptor a ectodisplasina (EDAR) y otros receptores estructuralmente similares XEDAR y TROY, son miembros de la superfamilia TNFR que señala predominantemente *vía* el factor nuclear NF- κ B y sus factores de transcripción (Mikkola y Thesleff, 2003). El ligando de EDAR, EdaA1, un producto del gen *Ectodisplasina (Eda)*, difiere del ligando de XEDAR, EdaA2, por la presencia de solamente dos aminoácidos adicionales en el motivo TNF (Bayés et al., 1998; Yan et al., 2000; Hymowitz et al., 2003). A pesar de estas diferencias estructurales menores, EdaA1 y EdaA2 muestran una alta especificidad hacia sus respectivos receptores (Yan et al., 2000; Hymowitz et al., 2003). La unión de EdaA1 a EDAR resulta en el reclutamiento de la proteína auxiliar EDARADD, la cual se une a las proteínas seleccionadas del *factor asociado a TNFR* (TRAF) TRAF1/2/3 y 5/6 (Yan et al., 2000; Headon et al., 2001; Morlon et al., 2005). La *proteína 2 de unión a TAK1* (TAB2) es una proteína adaptadora que puentea a TRAF6 con TAK1 (*cinasa 1 activada por TGF- β*), permitiendo la activación de TAK1 y la subsecuente activación de factores de transcripción de NF- κ B, su translocación hacia el núcleo, y la modulación de la actividad de los genes blanco correspondientes (Morlon et al., 2005).

1.2 Rutas de señalización

Se pueden distinguir dos tipos de complejos de señalización de DR. El primer grupo comprende los complejos de señalización inductores de muerte que se forman en el receptor Fas, TRAILR1 o TRAILR2 (Peter y Krammer, 2003). Estos tres receptores reclutan DISCs con composiciones similares. La formación del DISC trae como resultado la activación de la caspasa 8, que juega un papel central en la transducción de la señal apoptótica. El segundo grupo está conformado por TNFR1, DR3, DR6 y EDAR. Estos reclutan a un conjunto diferente de moléculas, las cuales se encargan de la transducción de señales apoptóticas y de sobrevivencia (Lavrik et al., 2005).

1.2.1 Señalización por CD95/Fas y TRAILR

Los complejos de señalización inductores de muerte de Fas y TRAILR1/TRAILR2, consisten de receptores oligomerizados, probablemente trimerizados, la molécula adaptadora que contiene a FADD, dos isoformas de procaspasa 8 (procaspasa8/a y procaspasa 8/b), procaspasa 10 y la proteína celular inhibidora de FLICE (*enzima convertidora de interleucina-1 beta similar a FADD*) *forma larga de la proteína inhibidora similar a FLICE* (FLIPL/S) (Peter y Krammer, 2003). Las interacciones entre las moléculas en el DISC se basan en contactos homotípicos. El dominio de muerte del receptor interactúa con el de FADD, mientras que el DED de FADD interactúa con los NH₂-terminales en tandem de los DEDs de la procaspasa 8, procaspasa 10 y FLIP/S. Se cree que la activación de la procaspasa 8 sigue un modelo de “proximidad inducida” en el cual, altas concentraciones locales de procaspasa 8 en el DISC, llevan a su activación autoproteolítica. Un proceso de rotura que involucra varios pasos, lo que resulta en la formación de un heterotetrámero de la caspasa 8 que contiene dos subunidades grandes (p18) y dos subunidades pequeñas (p10), que es entonces liberado hacia el citosol para propagar la señal apoptótica. La procaspasa 10 es activada también en el DISC, formando un heterotetrámero activo (Sprick et al., 2002). Sin embargo, existe controversia respecto a si la caspasa 10 puede desencadenar la muerte celular en ausencia de la caspasa 8, en respuesta a la estimulación por Fas o TRAILR1/R2. Por lo tanto, el papel de la caspasa 10 no está muy claro. FLIPL y FLIPS inhiben la activación de la procaspasa 8 en el DISC al bloquear su procesamiento. Existe evidencia creciente de que FLIPL también facilita la activación de la procaspasa 8 en el DISC al formar heterodímeros de FLIPL–procaspasa 8 (Micheau et al., 2002; Chang et al., 2003).

Se han establecido dos tipos de señalización de Fas. Las células tipo I se caracterizan por altos niveles de formación de DISC y cantidades incrementadas de caspasa 8 activa. La caspasa 8 activada conduce directamente a la activación río-abajo de caspasas efectoras. En las células tipo II, existen niveles más bajos de formación de CD95 DISC y, por lo tanto, niveles inferiores de caspasa 8 (Scaffidi et al., 1998). En este caso, la señalización requiere de una amplificación adicional que involucra la activación de la proteína de la familia de Bcl-2, Bid (*dominio de muerte agonista que interactúa con BH3*), por la caspasa 8, para convertirla en *Bid truncado* (tBid), con la subsecuente liberación del citocromo c mediado por tBid fuera de la mitocondria. La liberación de Cit c desde la mitocondria trae como resultado la formación del apoptosoma, seguido de la activación de la procaspasa 9, que a su vez rompe caspasas efectoras río-abajo (Korsmeyer et al., 2000). La señalización tipo II de Fas puede ser bloqueada por miembros de la familia Bcl-2, como Bcl-2 y BclxL (Willis et al., 2003). La señalización río-abajo de los receptores de TRAILR1/R2 es similar a la de Fas (Lavrik et al., 2005).

1.2.2 Señalización por TNFR, DR3 y DR6

La señalización de TNF-R1 difiere de la del receptor Fas o de la apoptosis inducida por TRAILR1/R2 (Varfolomeev y Ashkenazi, 2004). Se postula que la estimulación de TNFR1 trae como resultado la formación de dos complejos de señalización (Micheau y Tschopp, 2003). El complejo I –formado en la membrana- comprende TNFR1, TNF, RIP (*proteína que interactúa con receptores*), TRADD (proteína de dominio de muerte asociada a TNFR), TRAF-1/2 y probablemente otras moléculas hasta ahora no identificadas. Se ha propuesto que este complejo dispara la activación de la ruta de señalización de NF- κ B a través del reclutamiento del complejo IKK (*cinasa I κ B*) y activa a JNK (*cinasa N-terminal que fosforila a c-Jun*) a través de un mecanismo dependiente de TRAF-2. El complejo I carece de FADD y de procaspasa 8, pero se ha reportado que se transloca hacia el citosol, donde FADD, procaspasa 8/10 y FLIPL/S son reclutados para formar el llamado traddosoma o complejo II (Micheau y Tschopp, 2003). La activación de la procaspasa 8 se lleva a cabo en el traddosoma y está seguida de la señalización de la muerte río-abajo. En este modelo, la elección entre sobrevivencia y muerte depende de la eficiencia en la formación del complejo II, activación de la caspasa 8 y de la cantidad de FLIP presente en las células que bloquean la activación de la procaspasa 8 en el complejo II. Las rutas de señalización de DR3 y DR6 se tienen menos caracterizadas (Bhardwaj y Aggarwal, 2003). RIP y TRADD son reclutados hacia el complejo del receptor, y DR3 y DR6 promueven la activación de NF- κ B que conduce a la expresión de genes de sobrevivencia (Karin y Lin, 2002; Bhardwaj y Aggarwal, 2003).

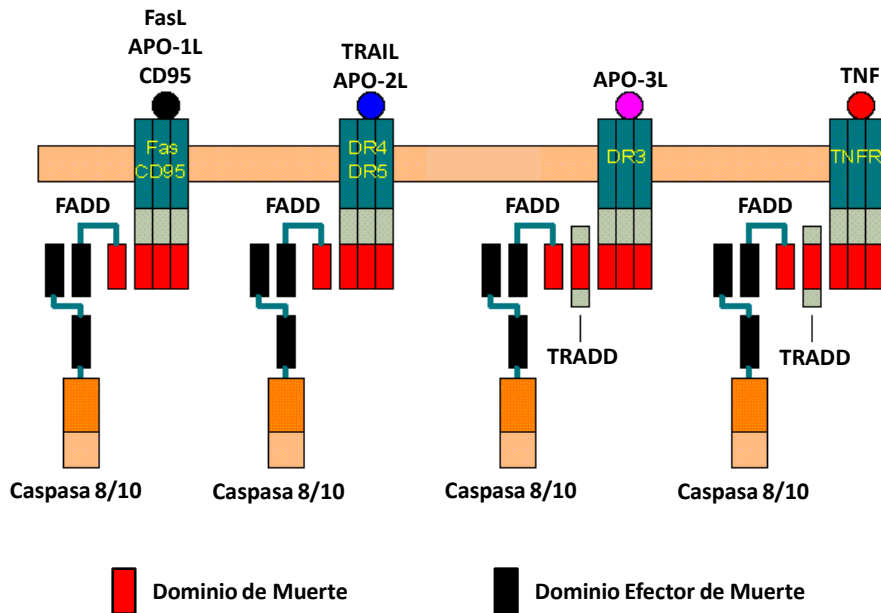


Figura 1. Miembros de la familia de receptores de muerte (DR): el receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1; también conocido como DR1, CD120a, p55 y p60), Fas (también conocido como DR2, APO-1 y CD95), DR3 (o APO-3. LARD, TRAMP y WSL1), el receptor ligando inductor de la apoptosis relacionado a TNF 1 (TRAILR1; conocido también como DR4 y APO-2). Cuando estos receptores son activados por sus ligandos correspondientes, un conjunto de moléculas es reclutado hacia el dominio de muerte (DD) y subsecuentemente, se activa una cascada de señalización.

1.3 La Familia Bcl-2

La familia de proteínas relacionadas con Bcl-2 (Figura 2) es primordial en la regulación de la apoptosis. Bcl-2 fue identificado en el punto de quiebre cromosómico de linfomas con células B. Hoy en día, se sabe que Bcl-2 pertenece a una familia creciente de productos reguladores de la apoptosis que pueden promover la sobrevivencia celular (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1) o inducir la muerte celular (Bax, Bak, Bcl-XS, Bad, Bid, Bik, Bim, Hrk, Bok) (Reed, 1994; Cory, 1995; Thompson, 1995; Yang y Korsmeyer, 1996; Kroemer, 1997).

La relación entre antagonistas de muerte (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1) o de agonistas (Bax, Bak, Bcl-XS, Bad, Bid, Bik, Bim, Bok, Hrk) influye en la susceptibilidad de las células a la apoptosis. Este reóstato de muerte/vida está mediado, al menos en parte, por dimerización competitiva entre pares selectivos de antagonistas y agonistas (Sedlak et al., 1995). Partiendo de que cada miembro de la familia Bcl-2 es expresado en un tipo celular,

la diferenciación y la activación estadio-específica, así como una red de pares de proteínas que interactúan entre sí (por ejemplo: Bcl-2/Bax, Bcl-XL/Bak, Mcl-1/Bok, entre otros) influyen en el destino de las células. La comparación de secuencias y el análisis mutacional han revelado la existencia de hasta cuatro dominios de homología de Bcl-2 (BH1, BH2, BH3 y BH4), todos antiapoptóticos. Varios de los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 (Bax, Bak, Bok) poseen tres de dichos dominios: BH1, BH2 y BH3, los cuales están involucrados en la formación de homodímeros y heterodímeros entre miembros de la familia Bcl-2. El cuarto dominio de BH (BH4) se encuentra únicamente en los antagonistas de muerte y está involucrado en la interacción con proteínas que no pertenecen a la familia Bcl-2, tales como Bag-1 y Raf-1. Varios de los antagonistas de muerte, únicamente poseen un dominio BH3 (Bad, Bid, Bim, Hrk) y forman así la rama “única de BH3” de la familia Bcl-2. A pesar de que proteínas de la familia Bcl-2 contienen dominios BH3, existen diferencias secuenciales que claramente distinguen al dominio BH3 de los miembros anti y proapoptóticos de la familia. Por lo tanto, el cambio de un segmento de 23 aminoácidos alrededor de BH3 convirtió a Bcl-2 de antagonista en agonista de muerte (Hunter y Parslow, 1996).

Los miembros antagonistas y promotores de muerte de la familia Bcl-2 funcionan como oncogenes potenciales y como genes supresores de tumores, respectivamente. Varios tumores, hiperexpresan inhibidores de la apoptosis o hipoexpresan miembros inductores de muerte de la familia Bcl-2. Bcl-2 y sus homólogos pueden intervenir en la oncogénesis en un primer nivel al favorecer la persistencia de células mutadas que, en circunstancias normales, serían eliminadas por apoptosis. En este nivel, Bcl-2 por sí sola tiene un potencial transformador bajo. Requiere de la cooperación de los otros oncogenes, por ejemplo: c-myc, para producir tumores *in vivo* (Reed, 1994; Cory, 1995; Thompson, 1995; Yang y Korsmeyer, 1996). En un segundo nivel, la selección darwiniana de células cancerosas por condiciones intrínsecas adversas (suministro limitado de nutrientes, reducción en la disponibilidad de oxígeno) y/o agentes terapéuticos (quimioterapia, radioterapia) pueden favorecer la sobrevivencia de células proliferativas que sobreexpresan productos genéticos antiapoptóticos. En otras palabras, Bcl-2 contribuye no sólo a los orígenes del cáncer, sino también a las dificultades para tratarlo (Croce, 2008).

Desbalances en la relación de proteínas anti y proapoptóticas de Bcl-2 pueden favorecer la sobrevivencia de las células tumorales en lugar de conducir las a la muerte (Antonsson y Martinou, 2000). Bcl-2 or Bcl-XL se expresan en gran medida en el tejido neuronal en desarrollo. Además, se ha reportado la expresión alterada de proteínas de la familia Bcl-2

en varios cánceres humanos, incluyendo al neuroblastoma (Reed, 1999). La sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-XL acelerada por transfección en células de neuroblastoma, tuvo como resultado resistencia farmacológica adquirida a una variedad de agentes anticancerígenos (Fulda y Debatin, 2002 a).

Superfamilia Bcl-2

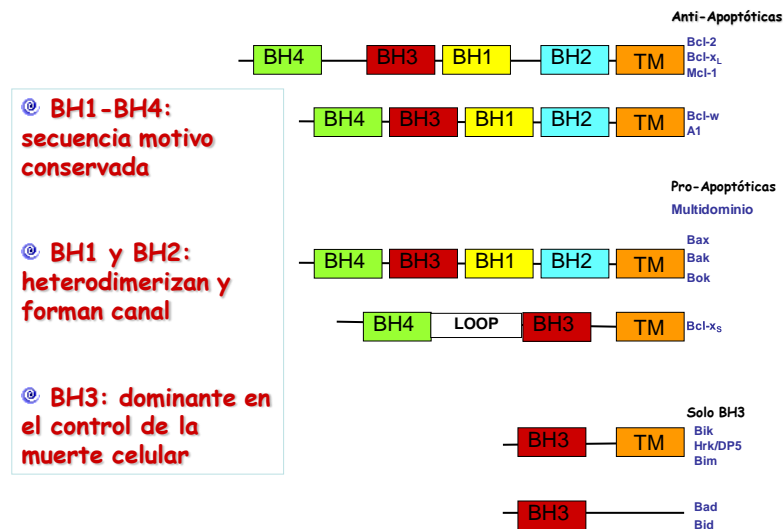


Figura 2. Miembros anti-apoptóticos y pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, así como sus principales funciones (Modificado de Kelekar y Thompson, 1998).

1.4 p53

El supresor de tumores p53, es un modulador clave en la respuesta celular al estrés. Esta proteína se activa en respuesta a daño al DNA, hipoxia, infección viral o la activación de oncogenes. Esto conduce a diversos efectos biológicos, tales como la detención del ciclo celular, apoptosis, envejecimiento, diferenciación y antiangiogénesis (Vousden y Lu, 2002). p53 es el gen alterado con mayor frecuencia en el cáncer humano (Hainaut et al., 1997) y la ausencia de p53 funcional permite la inmortalización celular y predispone a las células a la transformación neoplásica (Ryan et al., 2001). p53 modula en gran medida varias de sus funciones clave mediante la transactivación (incremento en la tasa de

expresión de un gen a partir de procesos biológicos o métodos artificiales) o la transrepresión de sus genes blanco (Bargonetti y Manfredi, 2002; Vousden y Lu, 2002). La mayoría de las mutantes de p53 derivadas de tumores, presentan defectos en acoplamiento al DNA, lo cual apoya la idea del papel clave de la transactivación (incremento en la tasa de expresión génica mediante procesos biológicos o artificiales) a partir de p53 para producir neoplasias. Se han identificado y caracterizado varios genes que responden a p53, los cuales participan en rutas celulares río-abajo tales como el arresto del crecimiento, diferenciación celular o apoptosis. El arresto del ciclo celular durante la fase G1 dependiente de p53 está mediado principalmente por p21WAF1, un *inhibidor de cinasas dependiente de ciclinas* (el- Deiry et al., 1992). Se ha propuesto el papel de varios genes blanco de p53 en la apoptosis, tales como Bax, Bid y PUMA (*modulador de la apoptosis por p53-sobrerregulado*) y las proteínas transmembranales Perp, Fas y Killer/Dr5. Las proteínas Bax, Bid y PUMA inducidas por p53, activan una ruta intrínseca para producir muerte celular. Fas y Killer/Dr5 inducen apoptosis celular a través de una ruta extrínseca. Los diversos genes proapoptóticos transactivados por p53, permiten sugerir o bien indican que éstos pueden jugar un papel en diferentes contextos en los que la apoptosis depende de esta molécula (Polyak et al., 1997).

Un evento frecuente en el origen y la progresión de varios tumores, es la pérdida de la función del gen de p53, el cual activa el fenómeno apoptótico. p53 puede producir apoptosis mediante transactivación transcripcional específica, probablemente de Bax, que promueve la apoptosis. En algunos casos, Bax no es necesario para la apoptosis dependiente de p53, como en el caso de timocitos tratados con radiación γ (Knudson et al., 1995), donde otros factores pueden ser más importantes; por ejemplo, Bcl-XL puede inhibir la apoptosis mediada por p53 *in vitro*. No está claro si el fenómeno apoptótico en NB depende de otra ruta diferente a la de p53. Se ha demostrado que algunos miembros de la familia Bcl-2 pueden inhibir la apoptosis mediada por p53 (Schott et al., 1995), pero que ello no se debe ni a la inhibición de la translocación nuclear de p53, ni al arresto del crecimiento mediado por esta molécula. Parece ser que Bcl-2 termina la señal que activa la maquinaria apoptótica como resultado de daño al DNA (Mejia et al., 1999).

p53 puede responder también al estrés celular induciendo apoptosis, la cual de acuerdo con el tipo celular puede ser dependiente o independiente de transcripción. En algunos tipos celulares, p53 induce la transcripción de Bax, gen proapoptótico que forma poros mitocondriales, lo cual conduce a la liberación citosólica del Cit c, que activa las caspasas e induce la apoptosis (Kirsch and Kastan, 1998). Bax puede también formar heterodímeros con Bcl-2, cuya transcripción puede ser reprimida por p53. El contexto en el que la célula

experimenta arresto del crecimiento o apoptosis es multifactorial, pues depende del tipo celular, la fase del ciclo celular, el estadio de diferenciación, la presencia de otras anormalidades oncogénicas, el crecimiento externo, factores de sobrevivencia y de los niveles de daño al DNA y de p53 inducido (Siddik, 2003.).

Debido a que la inducción de p53 puede llevar a la apoptosis después de daños al DNA, la adquisición de mutaciones en p53, puede promover tumorigénesis y generar quimioresistencia. Varios estudios que evalúan las mutaciones en p53 por análisis de *polimorfismo conformacional de una sola hebra* (SSCP), seguidos de secuenciación directa, han mostrado que son raras las mutaciones de p53 en tumores de neuroblastoma (Imamura et al., 1993; Komuro et al., 1993; Vogan et al., 1993; Mejia, et al., 1999) y en líneas celulares del mismo tipo (Davidoff et al., 1992). Sin embargo, p53 es fácilmente detectable en tejido de neuroblastoma y en líneas celulares, donde tiene una vida media prolongada de 6-10 horas, existiendo incrementos en la transcripción (Hoehner et al., 1997). La estabilización de p53 puede ocurrir a través de mecanismos como la mutación, en los que puede existir unión a oncoproteínas virales, pero en líneas celulares de NB usando coimmunoprecipitación no se ha observado el acoplamiento de p53 al antígeno T viral SV40 o a la proteína de choque térmico-70 (Davidoff et al., 1992).

1.5 N-MYC

El oncogen relacionado a la *mielocitomatosis viral*, (*MYC*, “N” por derivado de neuroblastoma) es un miembro de la familia de protooncogenes *myc* en la cual, *MYC*, *N-MYC* y *L-MYC*, presentan un fuerte potencial oncogénico (Mukherjee et al., 1992). El gen *MYC* se expresa en una amplia variedad de tejidos, mientras que la expresión de *N-MYC* está restringida a estadios tempranos del desarrollo embrionario; lo cual es punto a su favor como potencial blanco terapéutico. Las alteraciones genéticas, incluyendo la amplificación de genes, la translocación y sobreexpresión de cromosomas, resultado de la desregulación en la expresión de *MYC*, se han encontrado en una amplia variedad de tumores (Westermann y Schwab, 2002). La delección homocigótica dirigida de *MYC* y *N-MYC* en ratones, genera letalidad embrionaria, mientras que su sobreexpresión en modelos transgénicos de ratón, produce una amplia variedad de tumores, lo cual sugiere que ambos juegan un papel crucial tanto en el desarrollo embrionario como en el desarrollo oncogénico.

Los miembros de la familia *MYC* son factores de transcripción que contienen un dominio de activación transcripcional en su región NH₂, y un dominio de regulación transcripcional con un *dominio de cierre de leucina base/hélice-loop-hélice* (bHLHzip) localizado hacia el

extremo C-terminal. Las proteínas de MYC forman heterodímeros con la proteína MAX a través de sus dominios conservados HLHZip y los complejos MYC/MAX activan la transcripción de un gran número de genes blanco al unirse específicamente al motivo de la caja E, CACGTG, mediante su región básica. La proteína MYC tiene una vida media de alrededor de 20-30 minutos, mientras que la expresión de MAX es abundante y constante tanto en células quiescentes como en células proliferativas. En tejidos normales, existe un control muy refinado de la actividad de MYC en la transcripción dirigida de genes y en la proliferación celular. Sin embargo, una vez que el gen MYC es regulado a la alta durante el desarrollo oncogénico, el balance entre MYC y MAX se ve perturbado y consecuentemente, los genes blanco de MYC se expresan anormalmente. Estos genes blanco están extensamente involucrados en el crecimiento celular, la apoptosis y el metabolismo, e incluyen protimocina a, *ornitina descarboxilasa* (ODC), *telomerasa reverso-transcriptasa* (TERT) e *Id2*, un activador de la proteína del retinoblastoma y un estimulador de la progresión del ciclo celular (Lasorella et al., 2000).

Recientemente, se demostró que los genes MYC también controlan la expresión de proteínas a través de traducción de mRNA, así como la replicación del DNA (Boon et al., 2001; Patel et al., 2004; Koppen, 2007; Cole y Cowling, 2008). Además de su función en oncogénesis, se ha descrito que los genes MYC también inducen apoptosis si se sobreexpresan en células donde MYC no está amplificado (Meyer et al., 2006). Esto podría indicar que la amplificación de los oncogenes MYC, requiere de un escenario genético específico y que podría haber relaciones letales con otros oncogenes.

N-MYC se localiza en el cromosoma 2p24; se encuentra amplificado en 20 a 25% de los neuroblastomas (Figura 3), y usualmente está presente en forma de dobles minutos (fragmentos cromosómicos) o de regiones teñidas homogéneamente (Schwab et al., 1984). El gen *N-MYC*, codifica un factor de transcripción que forma heterodímeros con la proteína MAX (Wenzel et al., 1994). Evidencia de su involucramiento directo en el desarrollo de NB se obtuvo a través de la construcción de un modelo de NB en ratones, en el cual, el cDNA de *N-MYC* humano fue puesto bajo el control de un promotor de tirosina hidroxilasa, conduciendo al desarrollo de NB (Weiss et al., 1997). La amplificación del gen *N-MYC* se encuentra casi siempre en tumores de alto riesgo y es un indicador de mal pronóstico (Brodeur et al., 1984).

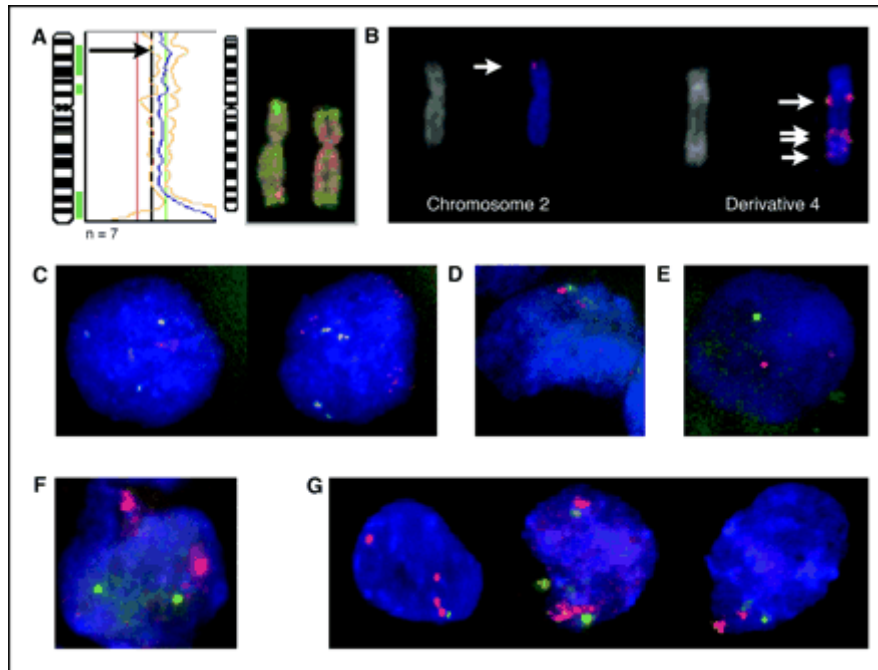


Figura 3. Amplificación del oncogen N-MYC (F y G) Modificado de <http://jco.ascopubs.org/content/vol23/issue4/images/large/zlj0040518580002.jpeg>

Se piensa que *N-MYC* es crítico en la tumorigénesis del NB (Weiss et al., 1997), así como en el desarrollo normal del cerebro y otros tipos de desarrollo neural (Zindy et al., 2006). Pacientes mayores de 1 año con amplificación de *N-MYC* mayores de 1 año, tienen un 30% de probabilidad de sobrevivir a pesar del uso de terapias multimodales agresivas, incluyendo cirugía, quimioterapia, radioterapia y trasplante de células troncales. Se cree que los niveles elevados de la expresión del gen *N-MYC* subsecuentes a la amplificación, son críticos en el comportamiento agresivo de los neuroblastomas que presentan amplificación de este gen (Kohl et al., 1984).

1.6 Caspasas

Las caspasas son proteasas de cisteína que se expresan como proenzimas, presentando tres dominios, incluyendo uno NH₂ terminal, una subunidad grande (~20 kDa) y una subunidad pequeña (~10 kDa). A la fecha, se han identificado al menos 14 caspasas diferentes, las cuales juegan distintos papeles en apoptosis y procesos inflamatorios (Wolf y Green 1999; Philchenkov, 2004). La activación de las caspasas involucra el

procesamiento proteolítico entre dominios, permitiendo la asociación de las subunidades grande y pequeña. Las caspasas activas funcionan como un tetrámero consistente en dos heterodímeros compuestos por una subunidad grande y otra pequeña. Existe evidencia substancial que soporta un modelo de cascada para la activación de las caspasas. Las caspasas iniciadoras, tales como 2, 8, 9 y 10, instigan la cascada apoptótica y conducen a la activación de las caspasas efectoras, que incluyen a las caspasas 3, 6 y 7 (Figura 4).

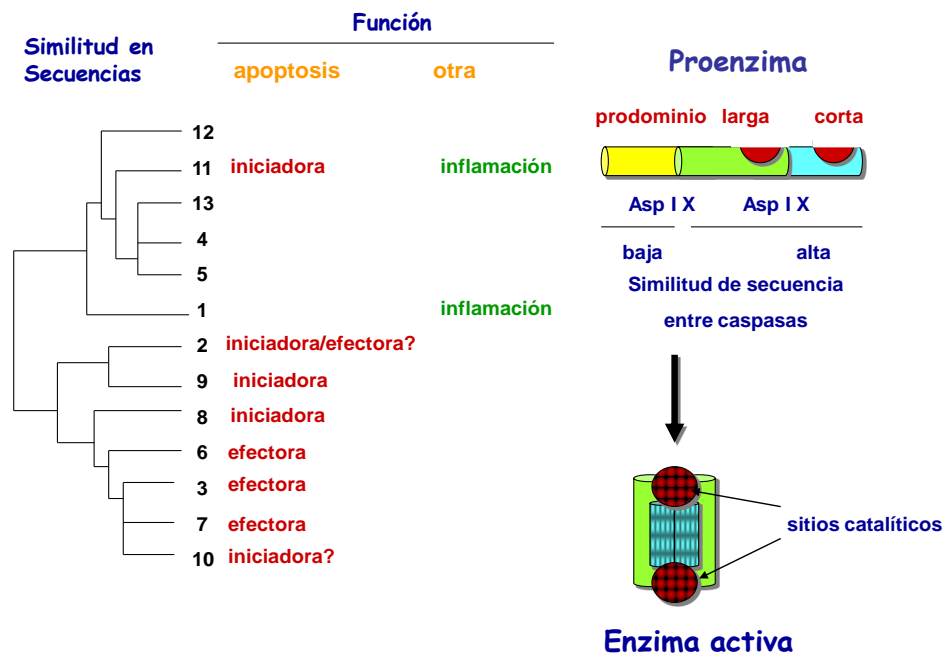


Figura 4. Activación de caspasas. Homología de secuencias de las caspasas involucradas en la apoptosis (izquierda). Forma inactiva (proenzima) de una caspasa, se esquematiza el prodominio (extremo NH₂ terminal), la subunidad larga (de alrededor de 20 kDa) y la subunidad corta (de alrededor de 10 kDa). Asp I X: residuos de aspártico o de escición en los cuales otra caspasa actúa, transformando la proenzima (procaspasa) en una caspasa activa.

Las caspasas causan muerte celular mediante la hidrólisis de varias proteínas celulares, incluyendo laminas nucleares (Lazebnik et al., 1995), enzimas reparadoras del DNA como la polimerasa de *poly-ADP-ribosa* (PARP) (Lazebnik et al., 1994), y proteínas del citoesqueleto tales como actina (Mashima, 1995), fodrina (Cryns et al., 1996) y gelsolina (Kothakota et al., 1997). La fragmentación del DNA durante la apoptosis es causada en

parte por una enzima conocida como *DNasa activada por caspasas* (CAD). Normalmente, CAD existe como un complejo inactivo junto con el *inhibidor de CAD* (ICAD). Durante la apoptosis, ICAD es proteolizado por la caspasa 3, generando la liberación de CAD, que a su vez dispara la fragmentación rápida del DNA (Sakahira et al., 1998). La actividad de las caspasas está estrechamente regulada por un conjunto de inhibidores endógenos de apoptosis, tales como algunos miembros de la familia de *proteínas inhibidoras de la apoptosis* (IAPs), las cuales se caracterizan por la presencia de al menos un dominio consistente en una repetición de *IAP de Baculovirus* (BIR). Las IAPs incluyen a c-IAP1, c-IAP2, NIAP, Survivina, *IAP ligada a X* (XIAP), Bruce, ILP-2, y Livina (Liston et al., 2003; Nachmias et al., 2004).

1.6.1 La Caspasa 8

Mediante la activación proteolítica, las caspasas efectoras rompen sus substratos e inactivan proteínas esenciales para la sobrevivencia, conduciendo a la desintegración de las células (Hengartner, 2000). La caspasa 8 es una enzima clave en la cima de la cascada apoptótica, involucrada tanto en la ruta extrínseca de receptores de muerte como en la ruta intrínseca mitocondrial. Varios estudios han reportado que el gen de la caspasa 8 se encuentra frecuentemente inactivado por metilación en líneas celulares de NB (Hopkins-Donaldson et al., 2000; Teitz et al., 2000; Eggert et al., 2001), alteración descrita principalmente en tumores agresivos y en aquellos de alto riesgo donde *N-MYC* se ve amplificado. Recientes descubrimientos sugieren que la pérdida de la caspasa 8 contribuye al fenotipo metastásico, de esta manera, se define a la caspasa 8 como un gen supresor de la metástasis en NB (Stupack et al., 2006). Se ha demostrado que el proceso de metástasis en NB se ve favorecido por la pérdida simultánea de la caspasa 8 y de la integrina $\alpha 3\beta 1$, lo cual subsecuentemente desarticula la muerte mediada por integrinas (IMID) (Teitz et al., 2006).

La caspasa 8 posee un papel importante en la ruta apoptótica mediada por receptores de muerte. Esta ruta, también llamada extrínseca, es iniciada por miembros de la superfamilia de receptores de muerte. La unión del ligando (por ejemplo: FasL) a su receptor (FasR) induce la agregación de los receptores, conduciendo al reclutamiento de FADD y de la procaspasa 8. La procaspasa 8 es entonces activada proteolíticamente, lo cual trae como resultado la activación de las caspasas efectoras río-abajo, conduciendo a la apoptosis. La caspasa 8 activa puede también romper a Bid (tBid), tBid se transloca hacia la mitocondria y promueve la liberación del Cit c, activando de esta manera la ruta mitocondrial (o intrínseca) (Hengartner 2000; Krammer et al 2007).

1.7 Inhibidores de la apoptosis (IAPs)

La familia de inhibidores endógenos de las caspasas, IAPs, comprende proteínas tales como XIAP, cIAP1, cIAP2, survivina, Livina (ML-IAP). Se ha reportado que las IAPs inhiben las caspasas activas 3 y 7, y evitan la activación de la caspasa 9 (Figura 5) (Altieri, 2001; Igney y Krammer, 2002). Además de modular la apoptosis, miembros de las IAPs como la survivina han sido implicados en la regulación de la mitosis (Altieri, 2001). Se ha reportado que la expresión elevada de survivina en muestras de tumores de neuroblastoma está relacionada con estadios avanzados del tumor y un mal pronóstico. A pesar de que el mecanismo de sobreexpresión de survivina en neuroblastoma no ha sido completamente esclarecido, la amplificación de su gen en el cromosoma 17q podría estar involucrada (Altieri, 2001). La actividad de las IAPs está controlada en varios niveles, por ejemplo, mediante el factor de transcripción NF- κ B, que puede inducir la expresión de cIAP1, cIAP2 y XIAP (Fulda y Debatin, 2002 b). Las IAPs son reguladas negativamente a partir de la proteólisis mediada por caspasas. Además, las proteínas Smac/DIABLO (*segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria/proteína de unión directa a IAP con bajo punto isoelectrico*) y la *proteasa de serina Omi* (Omi/HtrA2) que son liberadas desde la mitocondria hacia el citosol mediante inducción de la apoptosis, neutralizan la función de las IAPs al unírseles, desplazando así la unión a caspasas (Van Loo et al., 2002). La sobreexpresión de Smac o de péptidos de Smac, sensibilizó aún a células tumorales resistentes a la inducción de la apoptosis, y se sinergizó fuertemente con TRAIL para erradicar tumores establecidos en un modelo ortotópico murino de glioma maligno, indicando que agonistas de Smac pueden representar una nueva promesa en la terapia contra el cáncer (Fulda et al., 2002).

Debido a su posible importancia en tumorigénesis, se han desarrollado estrategias dirigidas hacia las IAPs a partir de la regulación de su expresión mediante el uso de tecnologías de interferencia del RNA, o neutralizando directamente sus funciones con compuestos que mimeticen a los antagonistas naturales de las IAPs (Wright y Duckett, 2005). La regulación a la baja de XIAP utilizando oligonucleótidos antisentido, sensibilizó a varios tipos celulares tumorales a la muerte causada por radiación γ , quimioterapia o TRAIL, tanto *in vitro* como *in vivo* (Hunter et al., 2007). Más importante aún, oligonucleótidos antisentido contra XIAP exhibieron por sí mismos actividad antitumoral potente en varios modelos preclínicos de cáncer de tumores sólidos xenotransplantados (Lacasse et al., 2005). De manera similar, la survivina o la supresión de c-IAP1 también sensibilizó a células cancerígenas, a la muerte por agentes quimioterapéuticos y receptores de muerte (Altieri, 2003; Gordon et al., 2002). Datos preclínicos obtenidos de

muestras de tumores humanos y de modelos animales sugieren que retar la expresión de IAP con oligonucleótidos antisentido, es una opción de tratamiento viable en combinación con otros tratamientos anti-cáncer (Cummings et al., 2006).

La estrategia de neutralizar la función de IAP con reactivos que son mimetizantes estructurales del *motivo de unión a IAP* (IBM) NH₂-terminal de Smac, es atractivo por diversas razones. Smac se une a los BIRs de varias IAPs, incluyendo XIAP, cIAP1, y cIAP2, y neutraliza su actividad antiapoptótica (Shiozaki y Shi, 2004). Por lo tanto, a diferencia de los oligonucleótidos IAP-específicos, los mimetizantes de Smac pueden en principio tener como blanco varios IAPs de manera simultánea. Smac puede también desencadenar la autoubiquitinación y desregulación de cIAP1 y cIAP2, pero no de XIAP, lo cual sugiere que Smac podría promover apoptosis mediante al menos dos mecanismos: evitando la inhibición de las caspasas (e.g. XIAP), y marcando a cIAP1 y cIAP2 como blancos para su degradación (Yang and Du, 2004). La cristalización de XIAP BIR3 en un complejo con Smac, llevó al diseño de pequeños compuestos o péptidos que mimetizan la función de Smac (Shiozaki y Shi, 2004; Nikolovska-Coleska et al., 2008). Los péptidos de Smac no solamente neutralizaron la inhibición de la actividad de las caspasas mediada por IAP *in vitro*, también sensibilizaron células cancerígenas primarias a apoptosis inducida por receptores de muerte o por quimioterapia (Srinivasula et al., 2000; Fulda et al., 2002).

1.8 Survivina

La survivina es una proteína de 16.5-kDa presente como heterodímero *in vivo* (Deveraux y Reed 1999). Es una de las ocho proteínas de la familia de las IAPs que contiene al menos una copia del dominio BIR, expresado únicamente en células en división y por lo tanto, se predice que es una proteína bifuncional que por un lado suprime la apoptosis y por el otro regula la división celular (Li et al., 1998; Miller, 1999). Se considera que la expresión de la survivina es la más tumor-específica de todos los productos genéticos humanos (Islam et al., 2000) y se ha reportado que se expresa en forma elevada en varios tipos de tumores, especialmente en el neuroblastoma, carcinomas gástricos y colorrectales, relacionándose con un mal pronóstico en estas enfermedades (Adida et al 1998; Kawasaki et al 1998; Islam et al 2000). La survivina contiene un elemento represor transcripcional de G1 con su promotor. Este promotor también exhibe transactivación típica inducible por fase M, lo cual sugiere que la survivina es una molécula regulada por el ciclo celular, que es reprimida en la fase G1 y está altamente expresada en la fase G2/M. Se asocia con el huso mitótico a través de su dominio C-terminal (Altieri y Li, 1999). El papel de la survivina durante la mitosis involucra la regulación del ensamble de los microtúbulos y de la formación del huso acromático normal (Li et al., 1998).

La regulación del ciclo celular-específica de la survivina en células tumorales sugiere que la proteína contribuye a la regulación de la apoptosis durante la proliferación celular. *In vitro*, la fosforilación de la survivina en la treonina 34 es necesaria para su interacción con las caspasas 3,7 y 9. Una mutación de esta treonina hacia alanina (T34A) puede inducir la liberación del citocromo c fuera de la mitocondria, conduciendo a la apoptosis (Anmol et al., 2004).

1.9 Smac/DIABLO

El *segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria* (Smac), proteína que también se conoce como *proteína de unión directa a IAP con bajo pI* (DIABLO) a pesar de ser una proteína mitocondrial es codificada por un gen nuclear que posee un extremo NH₂-terminal que funciona como una señal de transferencia a dicho organelo. La forma madura de Smac/DIABLO se origina a partir de la rotura de esta señal. En presencia de estímulos apoptóticos, Smac/DIABLO es liberada hacia el citosol (Fang et al., 2000). Ahí, Smac/DIABLO tiene un efecto propapoptótico, mediado por su interacción con IAPs y la consiguiente liberación de caspasas. Datos estructurales han establecido que Smac/DIABLO requiere formar homodímeros para interactuar con las IAPs (Chai et al., 2000). El motivo NH₂-terminal, consistente de cuatro aminoácidos, Ala-Val-Pro-Ile, es responsable de dicha interacción (Chai et al., 2000; Wu et al., 2000). Se ha demostrado que Smac/DIABLO interactúa con los dominios BIR2 y BIR3 de XIAP, permitiendo la liberación de las caspasas 3 (Chai et al., 2000) y 9 (Srinivasula et al., 2001), respectivamente. La caspasa 9 tiene un motivo tetrapéptido similar en su extremo NH₂-terminal, así que ambos compiten por el dominio BIR3 de XIAP (Wu et al., 2000). La caspasa 3 es liberada por la interacción entre el extremo terminal de Smac/DIABLO y el dominio BIR2 de XIAP (Gao et al., 2007).

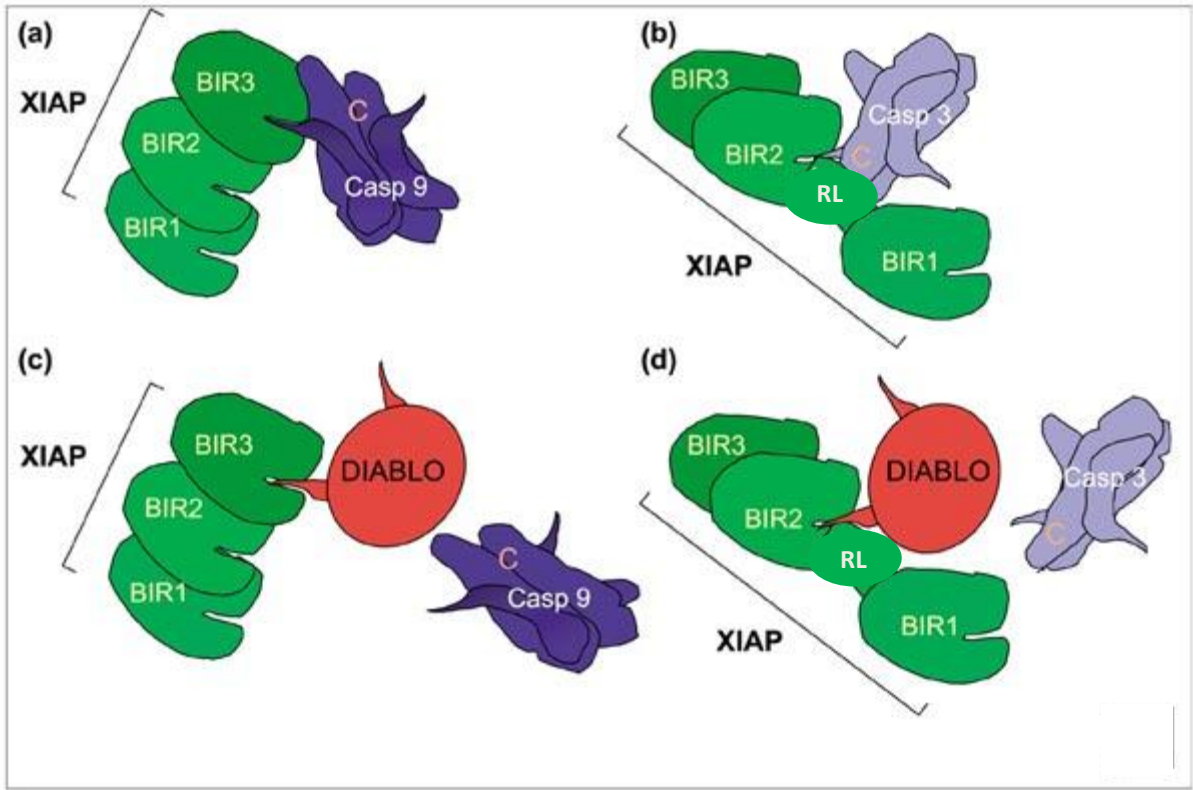


Figura 5. Mecanismo de inhibición de caspasas mediante las IAPs y su prevención por el antagonista de IAP, Smac/DIABLO. a) El extremo NH₂ terminal de la subunidad p10 de la caspasa 9 interactúa estrechamente con el dominio BIR3 de XIAP. b) La región de ligamiento (RL) del dominio BIR2 de XIAP interactúa con el sitio catalítico de la caspasa 3 (C indica el residuo catalítico de cisteína) lo que trae como resultado la inhibición efectiva de la caspasa. c) El extremo NH₂ terminal de DIABLO (rojo) es similar al de la caspasa 9 y compite exactamente por el mismo sitio de interacción dentro del dominio BIR3. d) Se postula que DIABLO interactúa con el dominio BIR2 de XIAP para remover a la caspasa 9 de esta última molécula (Modificado de Verhagen et al., 2001).

2 Rutas de la Apoptosis

2.1 Apoptosis mediada por receptores de muerte (la vía extrínseca)

La vía extrínseca de activación de las caspasas puede ser mediada por uno de varios receptores de muerte cuando éste se une al ligando apropiado (Figura 6) (Locksley et al., 2001). De estas rutas, las que se comprenden con mayor claridad, son la interacción entre el receptor Fas y su ligando FasL2, y la activación de TNF-R1 por TNF. En ambos casos, el ligando se une a su receptor induciendo su trimerización. No obstante, en algunos casos, estos receptores pueden también existir como trímeros previamente formados (Chan et al., 2000; Siegel et al., 2000). Este acoplamiento inicial desencadena una serie de eventos, cuya consecuencia fisiológica es regulada por el reclutamiento de moléculas adaptadoras especializadas, que selectivamente se comprometen en eventos de señalización río-abajo. Se han descrito dos clases principales de moléculas adaptadoras: las TRAFs y las moléculas que contienen dominios de muerte. El reclutamiento selectivo de estas moléculas está determinado en función de si el mismo receptor contiene un motivo de unión DD o TRAD. Tanto los receptores TNF-R1 como los de Fas, presentan dominios de muerte y reclutan a los *dominios de muerte de las moléculas adaptadoras asociadas a TNF-R1* (TRADD) y a Fas (FADD), respectivamente. En el caso de Fas, la interacción homotípica entre los dominios de muerte de Fas y aquellos de FADD, induce el reclutamiento de la procaspasa 8, a partir de la interacción entre los dominios efectores de muerte en FADD y el prodominio de la caspasa. El dímero unido a FADD de la procaspasa 8 se autoactiva para liberar la enzima activa, la cual a su vez corta y activa la cascada efectora de las caspasas 3 y 7, que cortan a sus substratos blanco para llevar a cabo la muerte de la célula (Shailaja y Tseng, 2003).

2.2 Apoptosis mediada por la mitocondria (la vía intrínseca)

La ruta mitocondrial de la apoptosis está regulada por las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Figura 6) (Sauer et al., 2001; Tada-Oikawa et al., 2003). En la ruta mediada por la mitocondria, el Cit *c* y otras proteínas apoptogénicas son liberadas desde el espacio intermembranal mitocondrial hacia el citosol. Una vez liberadas, el Cit *c* se une al *factor activador de la peptidasa apoptótica 1* (Apaf-1) e induce la activación secuencial de la caspasa 9 y de la caspasa 3. La activación de la caspasa 8, resultado de la unión de factores de muerte (por ejemplo: Fas ligando, factor de necrosis- α) a sus respectivos receptores en la superficie de la célula, provee de una relación entre las rutas apoptóticas mediada por receptores de muerte y la ruta mediada por la mitocondria. La activación de la caspasa 8

induce la activación de Bid hacia *Bid truncado* (tBid) el cual dispara la activación de Bax, dando como resultado cambios en la permeabilidad de la mitocondria y la consecuente liberación del Cit c hacia el citosol (Dae Won et al., 2007).

Los daños en el DNA, isquemia y estrés oxidativo son todos ejemplos de señales apoptóticas que conducen a la muerte celular a través de la ruta intrínseca, la cual comienza con la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria. Los mecanismos mediante los cuales esto ocurre permanecen en controversia; sin embargo, se cree que la permeabilización puede constituir una transición en la permeabilidad dependiente o independiente del *poro de transición PT*. (Green y Kroemer, 2004). El PT está constituido por la proteína de matriz ciclofilina D, la *proteína de membrana mitocondrial interna translocadora de nucleótidos de adenina* (ANT), y el *canal de aniones dependiente de voltaje* (VDAC), que es una proteína de membrana mitocondrial externa (Crompton et al., 1998). La apertura del poro de transición desencadena la disipación del gradiente de protones creado por transporte de electrones, causando el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. La apertura del PT también permite la entrada de agua hacia la matriz mitocondrial, lo que genera un hinchamiento del espacio intermembranal y la ruptura de la membrana externa, causando la liberación de las proteínas apoptogénicas (Green y Kroemer, 2004). Las proteínas liberadas incluyen al Cit c (Yang y Cortopassi, 1998), AIF, (Susin et al., 1999) y la endonucleasa G (Li et al., 2001; Van Loo et al., 2001). Este complejo promueve la activación de la caspasa 9, que a su vez activa a las caspasas efectoras, las cuales colectivamente orquestan la ejecución de la apoptosis. AIF y la endonucleasa G contribuyen a la fragmentación del DNA y a la subsecuente condensación cromosómica, las cuales son características relevantes de la apoptosis. Otras proteínas liberadas a partir de la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria, incluyen Smac/DIABLO y Omi/HtrA2, las cuales antagonizan a las IAPs, promoviendo por lo tanto la activación de las caspasas (Du et al., 2000; Suzuki et al., 2001).

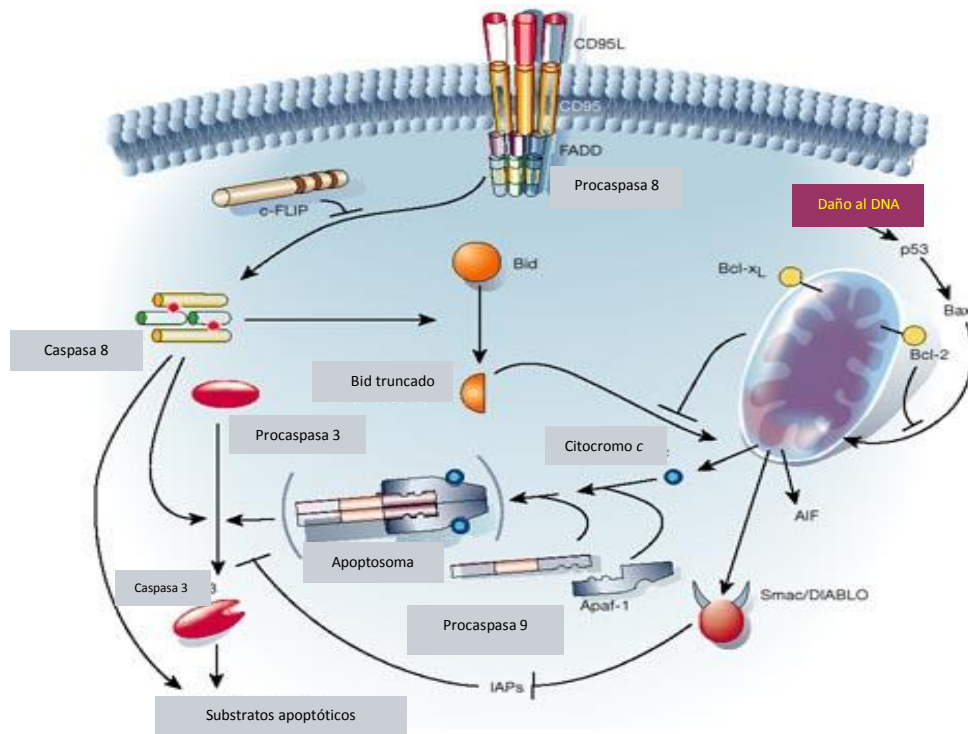


Figura 6. Las dos mayores vías apoptóticas en mamíferos: 1) La vía extrínseca (izquierda) iniciada mediante la activación de receptores pro-apoptóticos (CD95/Fas) por ligandos pro-apoptóticos (CD95L/FasL). La unión a los ligandos promueve el agrupamiento de los receptores (trimerización), lo cual recluta a FADD y a las procaspasas 8 ó 10 para formar el DISC, que favorece la proximidad de las procaspasas aumentando su actividad autocatalítica en el citoplasma. Esto conduce a la activación de las caspasas efectoras 3,6 y/o 7. La vía intrínseca (derecha) surge en respuesta a estímulos como el daño al DNA. Está basada en el equilibrio de proteínas pro y anti-apoptóticas. Bcl-2 y Bcl-xL inhiben la permeabilidad mitocondrial suprimiendo a Bax o Bak. Cuando se logra la permeabilidad de la membrana mitocondrial Cit c y Smac/DIABLO son liberados hacia el citosol. Este último promueve la apoptosis al interactuar con las IAPs, interrumpiendo su habilidad para inactivar a las caspasas, mientras que el Cit c se une a Apaf-1 formando el apoptosoma, el cual recluta a la caspasa iniciadora 9 para que active a las caspasas efectoras 3,6 y/o 7 (Modificado de Fulda y Debatin, 2006).

3 El Neuroblastoma

3.1 Antecedentes

El neuroblastoma (NB) es el tumor extracraneal más común en la infancia, tiene su origen en las células inmaduras del sistema nervioso simpático (SNS). La evolución clínica de pacientes con neuroblastoma es altamente variable, abarcando desde una regresión espontánea hasta una enfermedad metastásica ampliamente diseminada (Van Roy et al., 2009). La misma tasa de cura relevante que se ha alcanzado en la mayoría de otras enfermedades de la niñez no se ha logrado en este tumor (Dae Won et al., 2007). El NB es una enfermedad que representa uno de los retos más grandes para la intervención terapéutica (Kinsley et al., 2008).

El término neuroblastoma en realidad representa un espectro de tumores que se origina a partir de células ganglionares primitivas a lo largo del SNS incluyendo al neuroblastoma (NB), al ganglioneuroblastoma (GNB) y al ganglioneuroma (GN) (Figura 7). El éxito de cura dentro de este espectro varía desde la casi completa sobrevivencia en el ganglioneuroma, hasta un 30 % de sobrevivencia en el estadio avanzado del neuroblastoma (Nuchtern, 2002). Se sabe que el neuroblastoma ha mostrado regresión espontánea desde un estadio indiferenciado hasta una apariencia celular completamente benigna (Bénard et al., 2008).

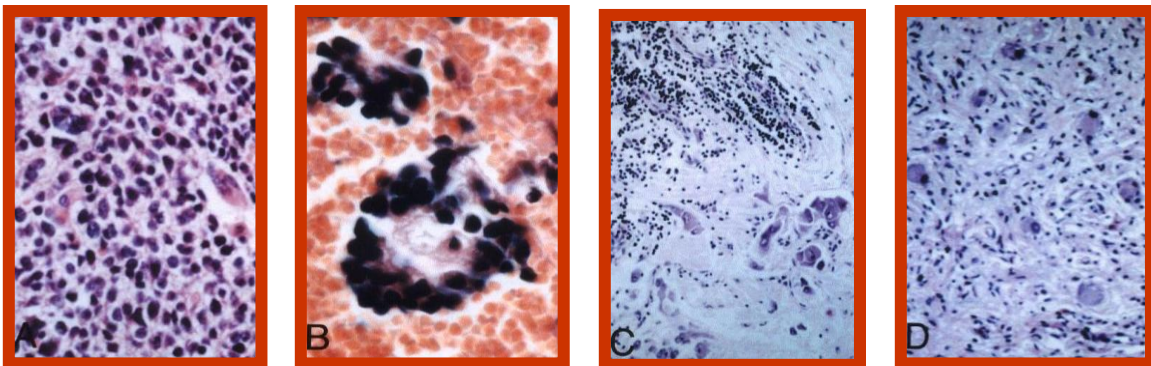


Figura 7. Aspectos histológicos del neuroblastoma: A) NB pobremente diferenciado constituido de células redondas inmersas en matriz neurocelular. B) Detalle de roseta de Homer-Wright. C) Ganglioneuroblastoma difuso con células neuroblásticas en diferenciación, estroma rico en libros neurópilos y células de Schwann. D) Ganglioneuroma constituido por células ganglionares maduras y prominente estroma schwanniano (Mejia, 1999).

En 1864 el médico alemán Rudolf Virchow fue el primero en describir un tumor abdominal en un niño, denominándolo “glioma” (Park y Rich, 2009). Más tarde, en la primera década del siglo XX, se reconocieron dos patrones distintos de diseminación del tumor. En 1901 William Pepper reportó una serie de infantes con infiltraciones hepáticas masivas, con tumores adrenales sin diseminación hacia huesos. En 1907 Robert Grieve Hutchison reportó su experiencia con un proceso patológico similar en niños mayores que además presentaban metástasis en órbitas oculares y cráneo (Rothenberg et al., 2009). En 1910 James Homer Wright fue el primero en reconocer que el tumor se originaba a partir de células neurales primitivas. Wright publicó una serie de casos: algunos involucraban diseminación hepática muy marcada y otros manifestaban metástasis ósea. Todos los casos presentaban tumores adrenales con paquetes de células a las cuales llamó “rosetas”, que a su vez encontró idénticas al tejido fetal adrenal, sugiriendo entonces el término “neuroblastoma” (Rothenberg et al., 2009).

Los tumores de neuroblastoma pueden originarse en cualquier sitio a lo largo del SNS. Los sitios más comunes son las glándulas adrenales, el retroperitoneo abdominal y pélvico, el tórax y cuello. Éstos tumores pueden metastatizar hacia nódulos linfáticos, médula ósea, corteza ósea, duramadre, órbitas, hígado y piel (Nuchtern et al., 2002).

Los síntomas dependen de la localización del tumor y la metástasis, si están presentes. Debido a la frecuencia de los tumores abdominales, es común observar dolor abdominal, abotargamiento, así como una masa palpable. Los tumores orbitales pueden causar equimosis periorbital, ptosis (párpado caído) y proptosis (protrusión del globo ocular). La diseminación metastásica hacia huesos y médula ósea puede causar dolor, especialmente durante el desplazamiento, así como anomalías en el conteo sanguíneo, tales como anemia o trombocitopenia (Nutchern et al., 2002).

La etiología del neuroblastoma no se ha comprendido completamente. Se han encontrado varios casos dentro de algunas familias y por lo tanto se le ha ligado a la genética. Sin embargo, se han sugerido varios factores de riesgo, los cuales se encuentran actualmente bajo investigación, especialmente aquellos alrededor de la concepción y la gestación, dada su aparición temprana. Dichos factores incluyen la ocupación de los padres (exposición a agentes químicos), uso de drogas (legales e ilegales), medicación durante el embarazo, infecciones, e inclusive el uso de hormonas y medicamentos ligados con los procesos de la fertilidad (Mossé et al., 2008).

Se han identificado varios factores biológicos pronósticos. El más importante de ellos es la amplificación del oncogen *N-MYC*, el cual ha sido reportado consistentemente como un factor pronóstico independiente adverso (Seeger et al., 1985). Otros factores pronósticos evaluados incluyen el grado del tumor de acuerdo con el sistema de clasificación histológica de Shimada, la ploidía del tumor, la ganancia del cromosoma 17q, así como deleciones en 1p y 11q (Attiyeh et al. 2005; Shimada et al. 1984).

Varios reportes sugieren que la regresión espontánea del NB ocurre probablemente por la muerte celular programada y no tanto por la maduración espontánea *per se* (diferenciación), o por ataque inmunológico sobre las células del tumor (Kitanaka et al., 2002). Sin embargo, a pesar de los esfuerzos considerables para identificar la función crítica de la apoptosis en el proceso de regresión, los resultados aún no son concluyentes.

3.2 Epidemiología del neuroblastoma

Cada año, en Estados Unidos, aproximadamente 650 niños son diagnosticados con neuroblastoma (Lacayo et al., 2009). De acuerdo con el *Reporte de Supervivencia, Epidemiología y Desenlace* (SEER), el neuroblastoma comprende entre 6-10 % de todos los cánceres en niños cuya edad promedio de diagnóstico es de 17.3 meses. La incidencia es de aproximadamente 9.5 casos por millón de niños (SEER 2003), principalmente durante el primer año de vida. Cincuenta por ciento de los casos de NB ocurren en infantes menores de 2 años, pero sólo 10 % se presenta en aquellos mayores de 5 años, incluyendo niños de mayor edad y adultos (Howman et al., 2007).

Stiller y Perkin (1992), encontraron que la incidencia de neuroblastoma es mayor entre caucásicos de Norteamérica, Europa, Australia y judíos israelíes. Se han hallado tasas más bajas para el oriente y el sur de Asia, incluyendo India y China, así como para Africa y Latinoamérica. En México se observan tasas ligeramente menores a las de Asia. En general, la incidencia mostró ser mayor en regiones de grupos étnicos con un estándar de vida más elevado (Stiller y Perkin, 1992).

3.3 Diferenciación en neuroblastoma

El comportamiento clínico, así como las características histopatológicas de los neuroblastomas, han sugerido que la tumorigénesis de este cáncer pediátrico está relacionada, al menos en parte, a defectos en los procesos de diferenciación celular (Thiele et al., 2005). Los neuroblastomas tanto primarios como metastáticos están conformados por diferentes tipos celulares y sus células usualmente muestran diferentes

estadios de diferenciación. Las formas histológicamente maduras de neuroblastoma, ganglioneuroblastoma y ganglioneuroma, corresponden al patrón normal de diferenciación observado durante el desarrollo del SNS (Shimada et al., 1984).

3.3.1 Neuroblastoma como derivado de la cresta neural

Clínicamente, los neuroblastomas se presentan en diversas localizaciones anatómicas que frecuentemente reflejan los sitios de los tejidos del sistema nervioso simpático, derivados de células de la cresta neural. Éstos sitios incluyen precursores neuronales postganglionares localizados en ganglios paraventrales del tronco simpático, ganglios preaórticos en el plexo alrededor de las ramas de la aorta abdominal, y en las células medulares y/o ganglionares de la glándula adrenal (Jaffe, 1998). Durante el desarrollo fetal, los sitios del SNS también incluyen estructuras neuroendócrinas con restos de neuroblastos en la glándula adrenal, y en paraganglios adyacentes a los ganglios simpáticos (Thiele et al., 2005). La cresta neural constituye una estructura embrionaria de transición que se origina en la interface entre el ectodermo no-neural y neural de la placa neural. A medida que la paca neural se invagina y los pliegues se aproximan para formar el tubo neural, fuerzas inductoras desde el mesodermo subyacente y del ectodermo superior no-neural estimulan el aspecto dorsal del tubo neural en desarrollo para formar así las crestas neurales. Las células migran lateralmente desde el tubo neural para formar o contribuir a la formación de una variedad de tipos celulares (Martinez-Morales et al., 2007).

El destino de especialización de las células de las crestas neurales depende de su localización rostro-caudal a lo largo del tubo neural; sin embargo, estudios *in vitro* e *in vivo* indican que las células de las crestas neurales mantienen un alto grado de plasticidad aún después de haber migrado desde el tubo neural. Estas son características marcadamente presentes en células malignas de neuroblastoma (Thiele et al., 2005).

3.3.2 Tipos celulares del neuroblastoma

Varios de los fenotipos celulares encontrados en la cresta neural en desarrollo son evidentes en el mismo neuroblastoma (Shimada et al., 1999). La heterogeneidad celular y la falta de maduración (por ejemplo, tumores ricos en estroma y pobres en estroma o tumores de alto y bajo riesgo basados en el grado histológico), se relacionan con el comportamiento clínico y son útiles para el pronóstico de la enfermedad (Shimada et al., 1999).

Esta misma heterogeneidad celular se observa en las líneas celulares de neuroblastoma. Se han descrito tres fenotipos celulares distintos: neuroblastos simpáticoadrenales (tipo-N); células sustrato-adherentes planas y alargadas (tipo-S); y células morfológicamente intermedias (tipo-I). Cada fenotipo representa un linaje particular dentro de la cresta neural (Biedler et al., 1997).

3.4 La inmunología del neuroblastoma

Se cree que la respuesta inmune innata y adaptativa juegan papeles clave en la sobrevivencia del tumor (Diefenbach y Raulet, 2002). Mientras que la inmunidad innata se apoya en fagocitos, células *natural killer* (NK), anticuerpos naturales y proteínas complementarias, la inmunidad adaptativa recluta *células presentadoras de antígenos* (APC), células T y células B (Janeway, 2001). La inmunidad innata depende de receptores invariables que reconocen características comunes de las células tumorales; sin embargo, carece de memoria inmunológica y puede ser evadida con frecuencia. La habilidad para reconocer tumores específicamente y para prevenir su crecimiento, se vuelve más efectiva con el surgimiento de la inmunidad adaptativa. Esta propiedad de especificidad se basa en la selección clonal de linfocitos portadores de receptores a antígenos. Un amplio espectro de células efectoras, citocinas, quimiocinas, anticuerpos y sus productos recombinantes, ha sido probado en inmunoterapias pasivas (en las que se potencia la respuesta inmunológica a partir del uso de estas moléculas) en programas pre-clínicos y clínicos. Además, se ha observado que tumores y productos derivados de ellos, pueden ser utilizados de manera altamente efectiva para estimular una respuesta antitumoral activa (Cheung y Sondel, 2005).

Con el fin de reconocer anticuerpos humanos contra NB, se han explorado receptores de células T, así como receptores del sistema inmune innato (por ejemplo: NK, NKT y células T γ/δ +) (Jameson et al., 2003). Además, se han descrito varios antígenos reconocidos por anticuerpos en NB (Schönmann et al., 1986; Cheung et al., 1987; Berthold et al., 1989; Nakamura et al., 2001).

Así también, en NB se han demostrado sistemas de antígenos reconocidos por linfocitos T citotóxicos (CTLs), que incluyen a los antígenos de cáncer testicular [MAGE (Ishida et al., 1996; Cheung et al., 1998)], GAGE (Cheung y Cheung, 2001), NY-Eso-1 (Soling et al., 1999), el oncogen *N-MYC* (Sarkar y Nuchtern 2000) y *cinasa del linfoma anaplásico* (ALK) (Passoni et al., 2002), entre otros.

Debido a la propensión de NB para experimentar regresión espontánea, varios autores han postulado la existencia de una respuesta inmune endógena anti-NB. El descubrimiento de un anticuerpo natural IgM anti-NB en niños, sugiere que la inmunidad innata puede tener un papel potencial en el seguimiento contra este tumor (Ollert et al., 1996). Además de IgM, los linfocitos del sistema inmune innato (células NK, NKT, $\gamma/\delta+$ T) interactúan con tumores a través de activación única y receptores inhibidores (Jameson et al., 2003). Las células NK pueden lisar neuroblastomas humanos *in vitro* y exhibir crecimiento xenográfico (Colucci et al., 2003). Así también, los ligandos específicos en células tumorales, disparan la activación de receptores activadores o inhibidores sobre células NK (Schilbach et al., 2000).

3.4.1 Estrategias evasivas del neuroblastoma contra la respuesta innata y adaptativa del sistema inmunológico

El neuroblastoma emplea una gran variedad de tácticas para evadir al sistema inmunológico. Suprime receptores “inmuno-activadores” a la vez que sobreexpresa receptores “inmuno-inhibidores” (Cheung y Sondel, 2005). Al reprimir la expresión del *complejo mayor de histocompatibilidad* (MHC) clase-I y clase-II, así como CD1d, interfiere con los brazos aferente y deferente de la respuesta inmune adaptativa (Metelitsa et al., 2001). Además, las células de NB pueden evitar el reconocimiento inmunológico y su destrucción al liberar el gangliósido GD1a, el cual es tóxico para los linfocitos humanos, a la vez que desarticula la señalización celular a través de la ruta NF- κ B (Shen y Ladisch, 2002). Así también, la liberación del gangliósido GD2 interfiere en las funciones de células T (Li et al., 1995) y de APC (Shurin, 2001). Algunas células de neuroblastoma han mostrado la expresión de FasL, el cual puede actuar como una señal de muerte causando la apoptosis de células efectoras, tales como células T y NK, que a la vez expresan en su superficie el receptor de muerte Fas (Takamizawa et al., 2000; Li et al., 2002). Al ser confrontadas con anticuerpos, y a pesar de los bajos niveles de CD55 (factor acelerador del decaimiento), algunas células de neuroblastoma presentan expresión elevada de CD59 (proteína cofactor de membrana) para hacerse resistentes a las rutas de complemento terminales (Cheung y Sondel, 2005).

4 Tratamiento Farmacológico del Neuroblastoma

La habilidad para modular la vida o la muerte de una célula es reconocida por su inmenso potencial terapéutico. Por lo tanto, la investigación continúa enfocándose en elucidar y analizar la maquinaria del ciclo celular y de las rutas de señalización que controlan el arresto del ciclo celular y la apoptosis (Elmore, 2007). El cáncer es un ejemplo donde los mecanismos normales de la regulación del ciclo celular son disfuncionales. De hecho, se piensa que la supresión de la apoptosis durante la carcinogénesis tiene un papel central en el desarrollo y la progresión de algunas enfermedades de este tipo (Elmore, 2007).

Los defectos en la apoptosis representan un factor causal principal en el desarrollo y la progresión del cáncer. La habilidad de las células tumorales para evadir el compromiso con la apoptosis puede jugar un papel significativo en su resistencia a regímenes terapéuticos convencionales. El entendimiento de las complejidades de la apoptosis y de los mecanismos utilizados por las células tumorales para resistirse al compromiso con la muerte celular, ha enfocado los esfuerzos de la investigación hacia el desarrollo de estrategias diseñadas para inducir la apoptosis de manera selectiva en las células del cáncer (Kasibhatla y Tseng, 2003).

En niños con tumores primarios únicos, suficientemente pequeños y que no cruzan la línea media del cuerpo, el tratamiento es solamente quirúrgico y su efectividad de cura está en alrededor del 95 %. Sin embargo, para el 65 % de los pacientes, cuyos tumores al ser diagnosticados por primera vez son demasiado grandes como para removerlos quirúrgicamente por completo o bien, metastásicos hacia otros tejidos y órganos, la terapia máxima disponible actualmente incluyendo cirugía, quimioterapia y radioterapia, está entre el 5 y el 20 % de los casos y proporciona una tasa de supervivencia de 5 años. La quimioterapia ablativa, seguida de trasplante de médula ósea para restablecer la normalidad en las células de la médula ósea barridas por esta modalidad de tratamiento, convierte esta tasa de supervivencia de 5 años, en una de 8 años de supervivencia (Schor, 2002). Estos hechos demuestran que es necesario un mejor entendimiento de los retos que plantea la terapia convencional actual, así como nuevas aproximaciones para el tratamiento del neuroblastoma.

La clasificación clínica del neuroblastoma involucra la evaluación de la magnitud de la masa tumoral y su grado de diseminación. Los tumores de estadio I, son aquellos tumores primarios suficientemente pequeños que no cruzan la línea media del cuerpo. Los de

estadio II son también tumores primarios pero, a pesar de no haber cruzado la línea media del cuerpo, son demasiado grandes para ser removidos quirúrgicamente o se han diseminado hacia nódulos linfáticos cercanos al tumor, no así hacia el otro lado del cuerpo. Los tumores de estadio III son aquellos que han cruzado la línea media o bien, aquellos que han alcanzado nódulos linfáticos cercanos al tumor pero en el lado opuesto del cuerpo. Los tumores de estadio IV se han diseminado hacia sitios distantes, tales como pulmón, hígado y/o médula ósea y no cumplen con los criterios del estadio IV-S. A diferencia del neuroblastoma convencional, los tumores IV-S o “especiales” se presentan en niños menores de un año de edad, constituyendo generalmente tumores pequeños primarios que se han diseminado hacia hígado, médula ósea y/o piel. Los tumores de estadio IV-S son especiales porque, a pesar de su diseminación, y a diferencia de otros tipos de neuroblastoma diseminados, le confieren al paciente un pronóstico excelente (Evans et al., 1976, en Schor, 2009).

4.1 Tratamiento con agentes quimioterapéuticos convencionales

Los fármacos que han mostrado tener una eficacia substancial contra el neuroblastoma incluyen a las antraciclinas, compuestos de platino, etoposido, vincristina, así como agentes alquilantes (Tabla 1). Las células de neuroblastoma poseen una tendencia particular a desarrollar resistencia; en general, la terapia más agresiva se aplica al tipo de resistencia más difícil. Se piensa que las *proteínas de resistencia múltiple a fármacos* (MRPs) como la *glicoproteína de permeabilidad* (P-gp) son responsables y se correlacionan con el número de copias del oncogen *N-MYC* (Berthold y Hero, 2000). Los neuroblastomas con amplificación de *N-MYC* metilan el gen de la caspasa 8 suprimiendo su expresión (Teitz et al., 2001). El soporte principal de la quimioterapia contra el neuroblastoma es una combinación de ciclofosfamida, cisplatino, doxorubicina y tenipósido. Los pacientes con tumor en estadio I o estadio IV-S no requieren quimioterapia. Los pacientes de riesgo estándar (sin amplificación de *N-MYC*) e infantes con tumores sintomáticos de estadios II-IV, reciben quimioterapia para detener la progresión rápida, tratar síntomas que amenazan la vida o mejorar la condición de enfermedades derivadas de los estadios II y III. El carboplatino y el etoposido o ciclofosfamida, la doxorubicina y la vincristina son dos regímenes alternativos. Los pacientes de alto riesgo reciben quimioterapia ablativa, la cual presuntamente barre con el tumor pero, inevitablemente barre también con la médula ósea normal; de esta forma, se añade el trasplante de médula ósea y la aplicación del factor estimulador de células granulocíticas. Algunos centros “purgan” las células de neuroblastoma fuera de la médula ósea del paciente antes de volver a realizar su infusión,

pero no está claro aún si este procedimiento mejora el éxito del tratamiento (Berthold y Hero, 2000).

4.1.1 Resistencia a agentes alquilantes

La resistencia adquirida a agentes alquilantes puede deberse a la pérdida de p53. Se ha observado que las células tumorales modulan el contenido de glutatión en una manera dependiente de p53 (Goto et al., 2003). La butionín sulfoximina (BSO), un inhibidor de la síntesis del glutatión reducido (GSH), sinérgicamente incrementa la citotoxicidad del agente alquilante melfalán (Anderson et al., 2001), lo cual implica que el contenido de GSH puede determinar la susceptibilidad a los agentes alquilantes. En células derivadas de pacientes que no respondieron a la mieloablación seguida de un trasplante de médula ósea, la BSO incrementa la susceptibilidad al melfalán, aunque además se requiere de dosis de melfalán tan altas como las utilizadas en la mieloablación original (Anderson y Reynolds, 2002).

Tabla 1. Agentes quimioterapéuticos convencionales y sus mecanismos de acción, hacia los cuales el NB presenta quimiorresistencia.

Fármaco	Mecanismo de Acción
Etoposido	<ul style="list-style-type: none"> - Disminuye el tránsito celular en fase S - Genera arresto celular en la fase S-tardía o G2-temprana del ciclo celular - Inhibe el transporte mitocondrial (NADH-deshidrogenasa) - Inhibidor de topoisomerasa II
Vincristina	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibe la formación de microtúbulos - Disgrega el huso mitótico - Específico de fases M y S - Disminuye la síntesis de ácidos nucleicos/proteínas - Bloquea la utilización del ácido glutámico
Ciclofosfamida	<ul style="list-style-type: none"> - Disminuye la división celular - Disminuye la síntesis de DNA (produce entrecruzamiento de hebras de DNA) - No específico de alguna fase del Ciclo celular - Potente actividad inmunosupresora
Doxorubicina	<ul style="list-style-type: none"> - Disminuye la síntesis de DNA y RNA - Inhibidor de topoisomerasa II: intercala entre pb/obstrucciones estéricas: fragm. del DNA - El complejo doxorubicina-hierro genera radicales libres: fragmentación DNA/membranas
Cisplatino	<ul style="list-style-type: none"> - Disminuye la síntesis de DNA (produce entrecruzamiento de hebras de DNA, desnaturaliza la doble hélice) - Unión covalente al DNA - Citotoxicidad: Isómero <i>cis</i> (más tóxico), isómero <i>trans</i> (menos tóxico) - Disminuye el reconocimiento enzimático
Carboplatino	<ul style="list-style-type: none"> - Agente alquilante - Unión covalente al DNA - Interfiere la función del DNA
Isofosfamida	<ul style="list-style-type: none"> - Produce entrecruzamiento de hebras de DNA - Disminuye la síntesis de DNA/proteínas - Unión a ácidos nucleicos/estructuras intracelulares

4.1.2 Resistencia a agentes inactivadores de los microtúbulos

La vincristina es un agente inactivador de los microtúbulos, altamente efectivo en la terapia del neuroblastoma. Células de neuroblastoma resistentes a la vincristina han mostrado no tener mutaciones de α - o β -tubulina. En lugar de ello, MAPc, una *proteína asociada a microtúbulos*, se ve marcadamente disminuída; la proteína desestabilizadora de los microtúbulos, stathmina, se ve incrementada en gran medida. Se ha observado que las células resistentes incrementan los niveles de tubulina polimerizada y alteran su contenido de α - o β -tubulina. La morfología celular se ve ampliamente alterada también (Don et al., 2004).

4.1.3 Resistencia a agentes de rotura del DNA

La inducción de apoptosis mediante doxorubicina y VP26 requiere de la activación de p53, MEK, H-Ras, y NF- κ B. La resistencia se relaciona con aberraciones en esta ruta (Armstrong et al., 2006). Cuando se cultivan células de neuroblastoma SK-N-SH en medio de cultivo proveniente de células del mismo tipo resistentes a la doxorubicina, disminuye su sensibilidad a los fármacos al mismo tiempo que ello las induce a activar la ruta de sobrevivencia Akt, inhibiendo la activación de la caspasa 3, que implica que los factores humorales secretados por las células resistentes, protegen de la quimioterapia a las células vírgenes (Emran et al., 2002).

Las células de neuroblastoma similares a las células de Schwann que son tratadas con doxorubicina, experimentan un tipo de apoptosis independiente de los receptores de muerte, que es sensible a la inhibición de las caspasas 3,7 y 9, pero no al *hidroxianisól butilado* (BHA). Por el contrario, las células de neuroblastoma similares a las neuronas que son tratadas con doxorubicina, experimentan necrosis y son sensibles al tratamiento con BHA, generando especies reactivas de oxígeno (Hopkins-Donaldson et al., 2002). Esto implica que los dos subtipos celulares de neuroblastoma pueden ser diferencialmente sensibles a la doxorubicina en un ambiente determinado.

Las células de neuroblastoma resistentes al cisplatino sobreexpresan DNA-metiltransferasas. La inhibición de estas moléculas revierte dicha resistencia (Qiu et al., 2005). En un estudio, se utilizaron técnicas proteómicas para determinar las moléculas que acompañan la resistencia del neuroblastoma al etoposido. El clon resistente al etoposido mostró sobreexpresión de las siguientes proteínas: peroxiredoxina 1, proteína de unión a la lectina soluble en β -galactosida, vimentina, proteína de choque térmico y

ribonucleoproteína K nuclear heterogénea. Además, éste estudio reveló la desregulación de dUTP pirofosfatasa (Urbani et al., 2005).

4.1.4 Resistencia multifarmacológica

La sobreexpresión de *N-MYC* en el neuroblastoma conduce a su vez a la sobreexpresión del *factor de resistencia a múltiples fármacos 1* (MDR1) y de P-gp, contribuyendo así a la resistencia de este tumor (Blanc et al., 2003). Sin embargo, varios investigadores han encontrado que ni la sobreexpresión de *N-MYC* ni la quimioresistencia, se correlacionan con la expresión de MRP1 en estas células (Goto et al., 2000). En contraste, otros autores han encontrado que los niveles de MRP1 son más altos en tumores que sobreexpresan *N-MYC* que en aquellos en los que no, y que altos niveles de expresión de MRP1 están relacionados con bajas tasas de pobre sobrevida y libres de eventos.

P-gp puede ser transferida de una célula de neuroblastoma a otra y permitir a las células resistir altas concentraciones de fármacos el tiempo suficiente como para adquirir P-gp endógenamente (Levchenko et al., 2005). MRP-1 fue asociada con un mal pronóstico en el neuroblastoma y se ha encontrado también que MRP-4 es un mediador de quimioresistencia. La expresión de MRP-4 está relacionada con la expresión de *N-MYC* (Norris et al., 2005).

Existen otros mecanismos responsables de alterar la sensibilidad del neuroblastoma a múltiples fármacos. Por ejemplo, la hipoxia reduce la sensibilidad de líneas celulares de NB a la vincristina, etoposido y agentes quimioterapéuticos fenólicos como VP16, pero no al citoxan. Esta reducción en sensibilidad, está relacionada con la sobrerregulación del *factor de hipoxia inducible 1 α* (HIF-1 α) (Hyun et al., 2004; Hussein et al., 2006). La resistencia al cisplatino en células de NB en cultivo, genera resistencia cruzada a N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidina, doxorubicina y vincristina, no así a Ara-C ni a clorambucil. En este tipo de células no se identificaron cambios en la expresión de MDR1, MRP, hMLH1 y hMSH2 (Iwasaki et al., 2002). En un modelo de xenotransplante en ratones, se observó un incremento en la inducción de la apoptosis a partir de oligonucleótidos antisentido a MRP1, en neuroblastomas tratados con VP16 (Kuss et al., 2002).

Varios neuroblastomas resistentes a fármacos han perdido p53, o con mayor frecuencia la función de cascada río-abajo de p53. Estas líneas resistentes, más que las líneas silvestres, expresan p53 mutante o sobreexpresan MDM2. Más aún, la transformación con un *virus del papiloma humano* (HPV) que degrade p53, convierte a las líneas celulares sensibles en

resistentes. Esto sugiere que los mecanismos dependientes de p-53 son necesarios para combatir neuroblastomas que muestran resistencia (Keshelava et al., 2001).

El bloqueo de la forma silvestre de p53 confiere a los neuroblastomas un fenotipo MDR, no así el bloqueo de su forma mutante. El bloqueo de p53 trae como resultado alteraciones graves en la mitosis con subsecuente apoptosis. El envejecimiento celular en neuroblastoma producto del daño al DNA es dependiente de p53 (Xue et al., 2007).

Como en el caso de las células de tumores cerebrales, la exposición a dexametasona puede inducir quimioresistencia en células de neuroblastoma (Zhang et al., 2006).

4.2 Nuevas terapias

Los avances más novedosos en la terapia de NB incluyen: moduladores de proteínas asociadas a resistencia, potenciadores metabólicos de fármacos convencionales, inhibidores de la topoisomerasa, agentes diferenciantes, potenciadores de la apoptosis, moduladores de la transducción de señales, agentes antineoplásicos dirigidos, agentes anti-migración y/o anti-adhesión e inmunoterapia.

4.2.1 Moduladores de resistencia

La inhibición de MRP1, una proteína de resistencia a múltiples fármacos ligada a la conjugación de éstos, utilizando VX70 junto con paclitaxil, es promisorio para el tratamiento del neuroblastoma. Alternativamente, es posible inhibir la síntesis de GSH con BSO para contrarrestar la resistencia debida a MRP1. Desafortunadamente, la quimiotoxicidad también aumenta. La eliminación de la resistencia relacionada con dicha proteína requiere de reducir los niveles de GSH en un 60-80 %, y las dosis no tóxicas de BSO únicamente lo hacen en un 30-40 % (Bart et al., 2002). En líneas celulares de NB, la expresión del gen de longevidad *sirt 1*, genera la expresión de P-gp y resistencia a la quimioterapia, convirtiendo a *sirt 1* en un posible blanco quimioterapéutico (Chu et al., 2005). Un ejemplo es la ceramida, necesaria para que la apoptosis se lleve a cabo; su conversión a glucosilceramida bloquea la muerte celular y media la quimioresistencia. Con base en estos hechos, se ha propuesto la utilización de inhibidores de la conversión de la ceramida como agentes quimioterapéuticos coadyuvantes (Dijkhuis et al., 2006).

Otros factores que contribuyen a la resistencia quimioterapéutica en los neuroblastomas incluyen la regulación a la baja de la caspasa 8 mediante la metilación de su gen (Fulda et

al., 2001). De manera opuesta, se ha reportado la transcripción aumentada (*via* STAT-1) de los genes de las caspasas, en respuesta al tratamiento con IFN- γ (Fulda y Debatin, 2003).

Profármacos (substancias farmacológicas que se administran en su modalidad inactiva) del etopósido han sido diseñados para inhibir MDR-1, siendo además menos tóxicos sistémicamente. La dosis máxima tolerada de estos agentes es tres veces la del etoposido; al mismo tiempo que su toxicidad para las células de neuroblastoma es más alta (Lange et al., 2003)

La onconasa, una RNasa pancreática obtenida a partir de ovocitos de rana, es activa contra células de neuroblastomas nativos y aquellos resistentes a múltiples fármacos, tanto *in vitro* como en tumores xenotransplantados subcutáneos murinos. Ocasiona arresto en G1 y muerte celular independiente de caspasas. Posee una curva de concentración y dosis respuesta similar en ambos tipos celulares (Michaelis et al., 2007).

Células de NB quimioresistentes, secretan hacia el medio una proteína denominada midkina que induce resistencia en células sensibles circundantes. La transfección del gen de esta proteína en células sensibles les confiere resistencia (Mirkin et al., 2005). Estos hechos determinan que este gen y su proteína son agentes quimioterapéuticos potenciales. Así también, la inducción de la expresión de catepsina L o la inhibición de su degradación, genera un fenotipo senescente y una reversión de la resistencia de las células de NB (Zheng et al., 2004).

BBR3464 es un análogo del cisplatino, con múltiples núcleos basados en el mismo cisplatino y un mecanismo de unión al DNA putativamente diferente al de este fármaco. Es efectivo en sistemas modelo contra células de NB resistentes al cisplatino (Servidei et al., 2001). Los complejos organometálicos de galio (III) han mostrado ser efectivos contra este mismo tipo de células *in vitro*. Especialmente en complejos potentes, contiene substituyentes de halógeno en los anillos fenólicos; los nitro-substituyentes hacen a dichos complejos menos efectivos, pero aún así demuestran actividad inductora de la apoptosis (Shakya et al., 2006).

El metabolismo de los esfingolípidos y la generación de moléculas de este tipo, tales como la ceramida, juegan también un papel en la resistencia de los neuroblastomas a los fármacos. Esto puede involucrar un mecanismo autónomo, relacionado con efectos directos de los esfingolípidos sobre la respuesta a la apoptosis, así como mecanismos dependientes de la interacción entre éstos y transportadores de unión al ATP (Sietsma et al., 2002)

4.2.2 Potenciadores metabólicos de fármacos convencionales

Ara-C es activada mediante fosforilación por la desoxicitidina cinasa. La desoxicitidina cinasa es inhibida mediante retroalimentación a partir de altas concentraciones de dCTP. Por lo tanto, se espera que los fármacos que disminuyen dCTP incrementen la actividad de Ara-C. La *ciclopentenil citosina* (CPEC) es uno de estos fármacos. Utilizado de manera conjunta, CPEC ha mostrado incremento en la actividad citostática de Ara-C contra células humanas SK-N-BE(2)c de neuroblastoma. Sin embargo, CPEC por si solo y en combinación con Ara-C ha demostrado niveles similares de inducción de la apoptosis (Bierau, 2003).

4.2.3 Inhibidores de la topoisomerasa y activadores de la reparación del DNA

Los inhibidores de la topoisomerasa I y de la topoisomerasa II, son utilizados en la quimioterapia para el tratamiento del neuroblastoma recurrente. El etopósido, un inhibidor de la topoisomerasa II, ha sido incorporado en los regímenes de tratamiento de tumores recurrentes y primarios, al mismo tiempo que es muy efectivo cuando se utiliza en regímenes de neuroblastomas de diagnóstico inicial (Keshelava et al., 2006). La camptotecina es un alcaloide citotóxico natural que tiene como blanco a la topoisomerasa I, una enzima nuclear que reduce el estrés torsional del DNA cuando éste se encuentra superenrollado, durante su replicación, recombinación, transcripción y reparación. El topotecan y el irinotecan son análogos sintéticos desarrollados para la administración conjunta de su forma lectónica por vía parenteral (García-Carbonero y Supko., 2002).

Una característica común de las topoisomerasas es su mecanismo catalítico, el cual consiste en el ataque nucleofílico a un enlace fosfodiéster del DNA mediante un residuo catalítico tirosílico de la topoisomerasa. La unión covalente resultante de la tirosina al fosfato del DNA, puede ser al extremo 3' del DNA roto en el caso de las enzimas tipo Top1 (Top1 y Top1mt) o bien al extremo 5' del DNA roto para las otras topoisomerasas. De esta manera, las enzimas Top1 son las únicas topoisomerasas que forman un enlace covalente con el extremo 3' del DNA roto, a la vez que generan una terminación 5'- hidroxilo en el otro extremo del fragmento. Las camptotecinas son los únicos inhibidores de la Top1 aprobados clínicamente y han mostrado actividad en cánceres de colon, pulmón y ovario.

La enzima nuclear *poly (ADP-ribose) polimerasa-1* (PARP-1) es un nuevo blanco en la terapia contra el cáncer. PARP-1 repara fragmentos de DNA de una sola hebra *via* la ruta de reparación de excisión de bases. Los Inhibidores de PARP-1 han demostrado incrementar los efectos citotóxicos de la radiación ionizante y de agentes quimioterapéuticos de daño al DNA, tales como agentes metiladores e inhibidores de la

topoisomerasa I. A la fecha existen al menos cinco inhibidores de PARP utilizados en el desarrollo de estrategias clínicas. Evidencia reciente tanto *in vitro* como *in vivo* sugiere que los inhibidores de PARP podrían ser utilizados no solo como sensibilizadores de la quimio y radioterapia, sino también como agentes únicos para matar selectivamente cánceres con defectos en la reparación del DNA (Drew y Calvert, 2008).

Se ha propuesto que la temozolomida (un agente alquilante derivado de la imidazotetracina) y el cisplatino sean utilizados de manera sinérgica, ya que la primera evita la reparación del daño al DNA hecha por el cisplatino. Sin embargo, en el tratamiento de neuroblastomas se ha observado una respuesta modesta (Geoerger et al., 2005).

4.2.4 Agentes diferenciantes

El arresto de la diferenciación y el crecimiento de células malignas producido por el *ácido retinóico* (AR) son, al parecer, mediados por una o más de dos familias de *receptores de ácido retinóico* (RAR o RXR); RAR α , β , γ ; y RXR α , β , γ (Linney, 1992), todos ellos pertenecen a la familia de factores de transcripción de hormonas esteroideas/tiroideas y poseen dominios discretos de unión al DNA y al ácido retinóico. El ácido retinóico se une a los receptores de AR, ocasionando cambios conformacionales que promueven la unión a secuencias de DNA *cis*-activas, lo cual regula la transcripción de ciertos genes blanco (Reynolds y Lemons, 2001).

4.2.5 Acido retinóico todo-trans

La vitamina A o retinol proveniente principalmente de la dieta, juega un papel crítico en el desarrollo normal de la cresta neural. El metabolismo y almacenamiento del retinol está mediado por un conjunto de proteínas de unión y enzimas. El retinol intracelular es metabolizado hacia *ácido retinóico todo-trans* (ATRA) (Thiele et al., 2005). El ácido retinóico todo-trans es un mediador principal de los efectos de la vitamina A *via* activación de varios receptores nucleares RAR y RXR que heterodimerizan y regulan la transcripción de genes. La exposición de las líneas celulares humanas de neuroblastoma a dosis suprafisiológicas (micromolares) de ATRA, causa una reducción en el crecimiento celular, inducción de la extensión de neuritas y diferenciación, que es ultraestructural, bioquímica y electrofisiológicamente similar a la de las células neurales normales (Abemayor y Sydel, 1989).

El tratamiento de células de NB con ATRA se acompaña de una disminución en la expresión y transcripción del gen *N-MYC* (Thiele e Israel, 1988). La disminución en la

expresión de *N-MYC* precede el arresto en G1 del ciclo celular, inducido por ATRA. En contraste, la sobreexpresión de *N-MYC* bloquea la diferenciación (Peverali, 1996). El ácido retinóico todo-trans induce una baja en los niveles de *N-MYC* y un incremento del inhibidor de la cinasas dependiente de ciclina p27, el cual puede mediar el arresto del ciclo celular durante G1 en el neuroblastoma (Matsuo y Thiele 1998; Nakamura et al., 2003).

El bloqueo de XAB2, parte del complejo correpresor que inhibe la inducción de la diferenciación por el ácido retinóico, incrementa el efecto diferenciante del ácido retinóico todo-trans sobre las células de NB (Onhuma-Ishikawa et al., 2007). Se ha observado que la sobreexpresión de *N-MYC* y *c-myc* confiere a las células de neuroblastoma resistencia al ácido retinóico. Sin embargo, las líneas resistentes al AR no lo fueron al análogo del ácido retinóico denominado fenretinida. De hecho, algunas líneas celulares fueron más sensibles a la fenretinida que las líneas sensibles al ácido retinóico (Reynolds et al., 2000). La fenretinida ha mostrado funcionar mediante un mecanismo dependiente de especies reactivas de oxígeno distinto al de los agentes diferenciadores (Lovat et al., 2004).

4.2.6 Fenretinida

La N-(4-hidroxifenil) retinamida o fenretinida (4-HPR) es un retinoide sintético que en concentraciones entre 1– 10 μM inhibe el crecimiento de NB *in vitro* (Ponzoni et al., 1995). Esta molécula al 5–10 μM , es altamente activa contra líneas celulares de NB resistentes al ácido retinóico (Reynolds et al., 2000). En contraste con el ATRA, 4-HPR no induce cambios en la maduración, pero es citotóxica, causando apoptosis y necrosis (Maurer et al., 1999). La toxicidad de 4-HPR en pruebas clínicas quimiopreventivas ha sido mínima. Además es bien tolerada en pacientes pediátricos (Garaventa et al., 2003). La mayor toxicidad de 4-HPR consiste en visión nocturna disminuída, debida al decaimiento de los niveles de retinol en plasma. No se ha reportado toxicidad hematológica (Reynolds y Lemons, 2001).

Los mecanismos mediante los cuales 4-HPR logra la citotoxicidad antitumoral no están completamente claros. Uno de los mecanismos mediante los cuales 4-HPR estimula la apoptosis es la inducción de especies reactivas de oxígeno en las células de NB (Lovat et al., 2003). Otros mecanismos posibles incluyen la inducción de lipo-oxigenasa, del factor de transcripción inducido por estrés GAAD153 (Lovat et al., 2002) y de Bak, un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2 (Lovat et al., 2003). Gran parte de la citotoxicidad a altas concentraciones de la fenretinida de las células de NB, es por la vía de mecanismos no apoptóticos (Maurer et al., 1999). La fenretinida estimula un gran incremento de la ceramida en líneas celulares de NB, lo cual puede determinar la citotoxicidad no

apoptótica (Reynolds et al., 2004). Los agentes que modulan el metabolismo de la ceramida pueden incrementar la actividad antitumoral de 4-HPR. Fármacos que inhiben proteínas que modulan el metabolismo de la ceramida y/o su acción, tales como la glucosilceramida sintetasa/1-O-acilceramida sintetasa, esfingosina cinasa, o el safingol, pueden incrementar significativamente la actividad antitumoral de 4-HPR con una toxicidad mínima para los fibroblastos normales o los progenitores mieloides de la médula ósea (Maurer et al., 2000). La fenretinida también ha demostrado inhibir la angiogénesis inducida por NB (Ribatti, 2001), y la actividad antiangiogénica de 4-HPR puede estar mediada en parte *via* ceramida (Erdreich-Epstein et al., 2002). Estos últimos datos sugieren que la 4-HPR por sí sola o en combinación con moduladores de la ceramida pueden lograr actividad antitumoral *in vivo*, ya sea mediante efectos directos contra el tumor o por antiangiogénesis (Thiele et al., 2005).

Por otro lado, en líneas celulares de NB resistentes al ATRA y al ácido retinóico 13-cis (AR-13-cis), la fenretinida ha mostrado alcanzar citotoxicidad multilogarítmica (Reynolds et al., 2000). La resistencia a AR-13-cis en líneas celulares de NB parece involucrar una condición selectiva en el aumento de *N-MYC* o *c-myc*. Dichas líneas celulares de NB resistentes al ácido retinóico son colateralmente hipersensibles a 4-HPR; por lo tanto, datos preclínicos sugieren que el uso secuencial de AR-13-cis seguido de 4-HPR, podría constituir una aproximación efectiva al tratamiento de la enfermedad residual mínima en pacientes de NB con terapia mieloablativa previa (Thiele et al., 2005).

4.2.7 Potenciadores de la apoptosis

La incidencia de la apoptosis no siempre es reflejo de la efectividad de la quimioterapia contra NB (Russel y Ling, 2003). Los neuroblastomas frecuentemente carecen de caspasa 8 y algunas veces de caspasa 3. El *status* de la expresión de las caspasas no está relacionado con la expresión de *N-MYC* (Iolascon et al., 2003). La survivina protege a las células de NB de la inducción de la apoptosis en una manera dependiente del ciclo celular. Las células en transición G2/M poseen abundante survivina y son resistentes a apoptosis. Las células en G1 tienen mucho menos survivina y son sensibles a la apoptosis. La retención de survivina en células en G1 a partir de la utilización de inhibidores de ubiquitinación, trae como resultado resistencia a la inducción de la apoptosis. Por lo tanto, se ha propuesto a la survivina como un blanco para el incremento de la quimiosensibilidad del neuroblastoma (Chandele et al., 2004). Se ha reportado también en NB la expresión elevada de survivina, la expresión alterada de miembros de la familia Bcl-2, así como la amplificación del activador de p53 MDM2 (Fulda y Debatin, 2003).

Los retinoides atípicos (por ejemplo ST1926) matan a las células de NB mediante un mecanismo diferente al del ácido retinóico todo-trans. Puede ser independiente de caspasas, no involucra diferenciación ni especies reactivas de oxígeno. ST1926 produce arresto en G2 y muerte celular independiente de p53 (Di Francesco et al., 2007). La oxofenretinida es 4 veces más potente que la fenretinida contra NB y parece funcionar a partir de un mecanismo independiente de receptores de ácido retinóico. Las células se acumulan en la interfase G2-M y experimentan apoptosis mediante un mecanismo que requiere de la caspasa 3, pero no de la caspasa 8 (Villani et al., 2006).

La muerte celular en tumores a partir de dialil disulfido, depende de la generación de especies reactivas de oxígeno; los neuroblastomas son particularmente susceptibles a este compuesto. (Filomeni et al., 2005).

El trióxido de arsénico es efectivo contra líneas celulares de NB, aún cuando éstas últimas son resistentes a agentes quimioterapéuticos convencionales. Esto ocurre aún en condiciones hipóxicas. Los agentes quimioterapéuticos convencionales, en contraste, son menos eficaces bajo estas condiciones. Bajo condiciones de hipoxia y normoxia, Bax se fragmenta después del tratamiento de las células con trióxido de arsénico, implicando que el mecanismo de muerte celular es el mismo en ambos escenarios (Karlsson et al., 2005). El trióxido de arsénico tiene la capacidad de matar células de NB resistentes a múltiples fármacos *in vitro* e *in vivo*. Esta droga está siendo evaluada en pruebas clínicas (Pettersson et al., 2007).

El ácido docosahexanóico es deficiente en células de NB en relación con neuronas normales en desarrollo. El suplemento de células de NB con ácido docosahexanóico las hace más susceptibles a los agentes quimioterapéuticos y potencia la inducción de la apoptosis. El decremento de GSH incrementa este efecto; antioxidantes como la vitamina E lo disminuyen (Lindskog et al., 2006). Los análogos de la vitamina E son tóxicos para las células de NB pero no para otros tipos celulares. La expresión de Bcl-2 y Bcl-XL aumentan la sensibilidad a estos compuestos (Swettenham et al., 2005).

La afidil colina es selectivamente letal para las células de NB y para células de otros tumores pero no para tipos celulares normales. La afidil colina no es soluble en agua, y por lo tanto, por si sola, no sería utilizable en quimioterapia. Sin embargo, ha sido incorporada en un complejo de inclusión de ciclodextrina y probada en modelos de xenotransplantes subcutáneos murinos, para evaluar su efectividad contra líneas celulares de tumores de NB nativos y resistentes a vincristina. Es igualmente efectiva contra ambas líneas

tumorales, y estudios previos sugieren que es sinérgica con otros agentes quimioterapéuticos convencionales (Michaelis et al., 2001).

La sobreexpresión controlada de *N-MYC* en células de NB humanas SH-EP, las hace más susceptibles a la inducción de la apoptosis a partir de agentes quimioterapéuticos mediante diversos mecanismos. Estas células acumulan más daño en el DNA que aquellas donde no se expresa *N-MYC*. Los inhibidores de los microtúbulos fueron los agentes quimioterapéuticos más potentes en este sistema (Paffhausen et al., 2007).

4.2.8 Moduladores de la transducción de señales

Se ha dicho que el *factor neurotrófico derivado de la línea celular glial* (GDNF) tiene potencial terapéutico contra neuroblastoma. Sin embargo, algunas veces incrementa la quimioresistencia y, junto con la neurturina, bloquea los efectos diferenciadores del ácido retinóico (Hansford y Marshall, 2005). La coexpresión del *factor neurotrófico derivado del cerebro* (BDNF) y del *receptor neurotrófico de tirosina cinasa tipo 2* (TrkB) confiere resistencia a los neuroblastomas. La transfección de TrkB hacia neuroblastomas que expresan BDNF demuestra esta condición. La inhibición de Trk evita lo anterior. Así también, los neuroblastomas que coexpresan TrkB y BDNF fosforilan Akt de manera constitutiva, mientras que aquellos que no los expresan no lo hacen. Esto implica que la ventaja de sobrevivencia que confieren las moléculas expresadas puede incrementar la sensibilidad de estos tumores a la quimioterapia (Jaboin et al., 2002; Li et al., 2005).

En las líneas celulares de NB, la inducción del *factor de crecimiento endotelial vascular* (VEGF) mediante hipoxia y la activación de *flt-1*, condujo a la sobreexpresión de Bcl-2 y a la resistencia a apoptosis, a través de la activación de la *cinasa extracelular regulada por señales* (ERK) y de la *cinasa activada por mitógenos* (MEK) (Das et al., 2005).

La sobreexpresión de Smac/DIABLO sensibiliza al neuroblastoma a TRAIL. La activación de la ruta de TRAIL se ha convertido en un método importante para inducir la apoptosis, excepto en células resistentes a TRAIL. Sin embargo, el tratamiento de estas células con otras drogas citotóxicas las hace sensibles, proveyendo ventajas terapéuticas efectivas. Además de activar rutas apoptóticas, la inhibición o supresión de la proliferación celular es necesaria para sensibilizar a las células cancerígenas hacia la apoptosis. Entre algunas proteínas críticas relevantes para tal efecto, se encuentran NF- κ B y Akt. La activación de NF- κ B bloqueó la apoptosis al interferir con la función de TNF α /TRAIL y/o a través de la activación de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2. De manera similar, Akt media la sobrevivencia celular a partir de la regulación de proteínas de sobrevivencia celular y

mediante el bloqueo de la función de Bad proapoptótico al fosforilarlo. La alteración de la expresión de Akt a partir de constructos negativos dominantes o por la expresión del homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) interfieren con su función (Kumar et al., 2004).

Los neuroblastomas son resistentes a TRAIL, debido a que carecen de la caspasa 8. Sin embargo, la inducción de la expresión de esta proteína no restablece la sensibilidad hacia TRAIL en todos los casos. Esto se debe a que varios neuroblastomas no presentan receptores a TRAIL. La adriamicina y el etoposido inducen la expresión de receptores de TRAIL. Se pueden complementar con IFN- γ , el cual induce la producción de caspasa 8 y la sensibilidad a TRAIL (Yang et al., 2003).

La resistencia *in vitro* de células de NB a la doxorubicina y a MDL-28842, está acompañada por una disminución en la señalización a través de la ruta de efectores de la *cinasa de la proteína activada por mitógenos* (MAPK) (Mattingly et al., 2001; Mattingly, 2003).

Las células resistentes a la doxorubicina tienen efectores de señalización Stat3 así como de Bcl-XL sobrerregulados. La inhibición de la señalización en la ruta de Jak/Stat3 conduce a un incremento de la sensibilidad hacia la doxorubicina. Las células sensibles a la doxorubicina, incubadas con medio proveniente de células resistentes a la doxorubicina, adquieren resistencia a este fármaco y muestran activación de la ruta de Stat3 (Rebbaa et al., 2001). Este es otro ejemplo de la actividad de un factor de resistencia presumiblemente secretado, que induce resistencia en células previamente sensibles (Schor, 2009).

La inhibición de PKC β disminuye la quimioresistencia de líneas celulares de NB resistentes a la doxorubicina, al etoposido, a paclitaxel y vincristina, excepto al carboplatino. No tiene efecto sobre la sensibilidad de líneas de NB no resistentes (Svensson y Larsson, 2003).

La geldanamicina es un fármaco efectivo contra NB que inhibe la protección contra la apoptosis inducida por proteínas de choque térmico. La diferenciación de células de NB con ácido retinóico inhibe la actividad de la geldanamicina, presumiblemente debido a que interfiere en la translocación de p53 y la activación de ERK y Akt (Shen et al., 2007).

4.2.9 Agentes antineoplásicos dirigidos

Varias aproximaciones experimentales en NB explotan las características neurales de las células del tumor. Se han dirigido anticuerpos monoclonales murinos anti-humanos hacia el diasilgangliósido selectivo de neuroblastoma, GD2. Las células de NB que se unen a

anticuerpos son marcadas para el sistema reticuloendotelial del hospedero en virtud de los anticuerpos, antimurinos humanos endógenos, y de las células T killer movilizadas por las células cancerosas marcadas con el anticuerpo. Se hipotetiza que esta aproximación tendrá como resultado la erradicación de las células de neuroblastoma portadoras de GD2 con poca o nula toxicidad para el hospedero. El anticuerpo 3F8 IgG3 murino anti-GD2 mata las células de neuroblastoma mediante citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos. Factores genéticos influyen en la respuesta clínica hacia 3F8 y polimorfismos específicos predicen eventos de recuperación excelente (Cheung et al., 2006). El marcaje de 3F8 con el isótopo 131 de fósforo, ha sido utilizado para dirigir radioactividad citotóxica hacia células de neuroblastoma (Dauer et al., 2007).

Con base en la hipótesis de que la señalización de neurotrofinas a través de receptores en la superficie de las células de NB confiere a estas células efectos protectores, ligandos inhibidores competitivos han sido estudiados como agentes coadyuvantes potenciales en la terapia de neuroblastomas quimioresistentes. Además, se ha propuesto el desarrollo de ligandos agonistas de receptores neurotróficos proapoptóticos putativamente como agentes quimioterapéuticos primarios (Guillemard y Saragovi, 2004). La utilidad clínica de estos agentes se complica en función de la variabilidad de la función pro y antiapoptótica del mismo tumor. Es de esperarse que el alcance efectivo de rutas de señalización tendrá que esperar a la identificación de los efectores río-abajo selectivos de NB (Schor, 2009).

Como un modo de terapia, se ha propuesto la explotación del sistema de absorción de catecolaminas en la superficie de la mayoría de las células de NB. El análogo de la dopamina, generador de radicales de oxígeno 6-hidroxidopamina, ha sido utilizado *ex vivo* para “purgar” las células de NB fuera de la médula ósea de pacientes, previamente al trasplante de médula ósea después de quimioterapia post-ablativa. A pesar de que el régimen de purga en realidad elimina las células de NB, mientras que las células de la médula ósea remanentes se injertan, la mayoría de los pacientes desarrolla enfermedad recurrente en los sitios originales del tumor, lo cual implica que la tan llamada quimioterapia ablativa no libere al paciente por completo del tumor. El uso de 6-hidroxidopamina *in vivo* está limitado por la toxicidad hacia el SNS normal. Varios estudios representan intentos para administrar 6-hidroxidopamina en conjunto con agentes que selectivamente protegen a las células normales (Schor, 2009).

El producto antimetabólico natural, neocarzinostatina, es un profármaco que, al ser activado por reducción del sulfhidrilo, induce apoptosis en células de NB. Schor (1992) utilizó 6-mercaptodopamina, un análogo de dopamina con un grupo sulfhidrilo libre, para cargar selectivamente células de NB con equivalentes reductores, antes de tratarlas con

neocarzinostatina. A pesar de que este avance es efectivo *in vitro*, la 6-mercaptodopamina forma una goma muy higroscópica y es poco manejable farmacológicamente.

La sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, incluyendo a Bcl-XL, es un mecanismo común de resistencia quimioterapéutica en las células de NB (Dole et al., 1995). La sobreexpresión de Bcl-2 en células de la cresta neural está asociada al incremento del contenido de GSH y a la capacidad de su contraparte oxidada para reciclarlo (Tyurina et al., 1997). Este potencial reductor optimizado condujo a la hipótesis de que la actividad de la neocarzinostatina induce el corte de Bcl-2 (26 kDa) por medio de la caspasa 3, para formar un fragmento proapoptótico (19 kDa) (Liang et al., 2002). Este hallazgo permite predecir en qué tumores podría ser eficaz la neocarzinostatina ya que los tumores deben expresar tanto caspasa 3 como Bcl-2, con el fin de que el efecto de inducción de la apoptosis se vea incrementado (Mi et al., 2006; Rogers et al., 2008).

4.2.10 Agentes anti-migración y/o anti-adhesión

El gen *nm23-H1* codifica para la *nucleósido difosfato cinasa A* (NDPK-A), su sobreexpresión y la mutación S120G frecuentemente ocurren en pacientes con neuroblastoma metastásico. Estas alteraciones en NDPK-A, incrementan la migración celular *in vitro* y promueven la metástasis *in vivo*. Después de explorar varias drogas anticancerígenas chinas, fue posible aislar un compuesto puro llamado DSNC. Se observó que éste inhibe no sólo la proliferación, sino también la migración de células de neuroblastoma humanas. De manera similar, DSNC inhibió la migración de células de neuroblastoma que sobreexpresan el tipo silvestre y el NDPK-A mutante S120G. Esto sugiere que DSNC puede ser un agente terapéutico potencial para el tratamiento de pacientes con neuroblastoma metastásico, especialmente aquellos con alteraciones genéticas en NDPK-A (Almreng y Chang, 2004).

El *factor de crecimiento derivado de plaquetas* (PDGF) es capaz de estimular la proliferación de células humanas de neuroblastoma SH-SY5Y, así como su migración e invasión a través de una barrera de matriz extracelular. Se ha evaluado el efecto de la somatostatina sobre la movilidad y la invasión de células SH-SY5Y estimuladas por PDGF, y se encontró que éste inhibe en forma potente y eficiente, la migración y la invasión, mediante un mecanismo que depende parcialmente de la inhibición de ERK, así como de la inhibición de la pequeña proteína-G Rac. Por lo tanto, se sugiere que la somatostatina puede ser útil para controlar el crecimiento invasivo en neuroblastoma (Pola et al., 2003).

La quimioresistencia adquirida en NB está acompañada por la desregulación de la *molécula de adhesión celular neural* (N-CAM), la cual conduce a un aumento en la adhesión endotelial y la invasión. La quimioresistencia está relacionada con el aumento de comportamiento maligno. La transfección de N-CAM en células de NB y de glioma, ha mostrado reducir la invasión de las células tumorales. El tratamiento de células de NB con ácido retinóico genera un incremento en la expresión de N-CAM, lo cual puede estar relacionado con la disminución de la malignidad de estas células después de dicho tratamiento (Blaheta et al., 2006). La expresión de N-CAM está regulada por el receptor neurotrófico p75, antagonista del *factor de crecimiento neural* (NGF) que se une a dicho receptor y puede influir no solo en la sobrevivencia de células tumorales, sino también en su adhesión (Mirnics et al., 2005).

4.2.11 Compuestos metálicos (Casiopeínas)

Se conoce que el neuroblastoma, al igual que varios otros tumores del sistema nervioso, tales como los gliomas malignos, es resistente a diferentes tipos de quimioterapia, lo cual coincide con evidencia que demuestra que las células de NB son proclives a desarrollar resistencia a los fármacos durante el tratamiento. Por lo tanto, la búsqueda de agentes quimioterapéuticos más efectivos que puedan ser usados contra estos tumores ha adquirido relevancia. Más aún, el concepto de que el uso de fármacos basados en componentes metálicos (esenciales) endógenos puede ser más efectivo y menos tóxico que el de otros agentes actualmente utilizados, impulsó a varios grupos a desarrollar drogas basadas en el cobre para ser empleadas como agentes terapéuticos. Así, surgen los compuestos de cobre quelantes mixtos, denominados Casiopeínas®, los cuales presentan la fórmula: Cu (N-N)(A-A)]NO₃ (A-AN-O, O-O) (Ruiz et al., 1993; Ruiz et al., 1995).

Además, se ha demostrado que algunos compuestos genéricos basados en el cobre pueden exhibir un potencial antineoplásico mayor que el de drogas como el cisplatino en diferentes tipos de cáncer como el carcinoma ovárico humano (CH1), leucemia murina (L1210), así como varios carcinomas cérvico-uterinos (De Vizcaya-Ruiz et al., 2000; Gracia-Mora et al., 2001). No obstante, las casiopeínas necesitan ser caracterizadas para evaluar sus propiedades en tumores del sistema nervioso. Hasta ahora, solamente se han probado en el meduloblastoma (Mejia y Ruiz, 2008) y se ha observado que inducen apoptosis. Se han probado los efectos de la Casiopeína II-gly (Cas IIgly) [Cu(4,7-dimethyl-1, 10-phenanthroline)(glycine)(H₂O)]NO₃ en ratas con glioma C6 y en cultivos celulares de células de glioma C6. Los datos obtenidos muestran que Cas IIgly inhibió el crecimiento celular e indujo MCP *in vivo* e *in vitro*, involucrando la formación de EROs como uno de los

efectos positivos de la casiopeína a través de mecanismos tanto dependientes como independientes de caspasas (Trejo et al., 2005).

Avances recientes en la investigación sobre el cáncer, sugieren que varios estímulos apoptóticos comparten rutas caracterizadas por la generación de EROs y por la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, con cambios subsecuentes en la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa y la liberación del factor apoptogénico (Siro et al., 1998; Decaudin et al., 1997). La translocación mitocondrio-nuclear de AIF parece ser una característica constante de la apoptosis, independientemente de las condiciones que la desencadenan (inhibición de proteína cinasas, sobreexpresión de c-myc, ceramida, etc.) (Murahashi et al., 2003). Esto sugiere que las casiopeínas pueden tener un papel y efecto potencial similar sobre las células de NB. Más aún, su relevante actividad citotóxica, citoestática y antineoplásica, junto con su demostrada baja toxicidad (Trejo et al., 2005) han generado grandes expectativas en el tratamiento del NB en el futuro.

4.2.12 Inmunoterapia

La destrucción *in vivo* de células de NB a partir de su reconocimiento por células T, el reconocimiento facilitado por anticuerpos o por células del sistema inmune innato, ha demostrado ser efectivo en modelos preclínicos murinos. El beneficio antitumoral al utilizar esta estrategia parece ser mayor cuando la carga tumoral es mínima (Cheung y Sondel, 2005).

Se han implementado pruebas clínicas para tratar de incrementar hasta donde sea posible la especificidad y eficacia de citocinas mediante el uso de células tumorales autólogas transfectadas con citocinas, tales como IL-2 (Pertl et al., 2003), IL-12, GM-CSF e interferón gama (Bausero et al., 1996; Yoshida et al., 1999), o linfotactina, como vacunas para estimular la respuesta inmunológica del hospedero hacia el neuroblastoma. Otros avances incluyen el uso de vacunas de DNA (Pertl et al., 2003), o vacunas de células dendríticas (Chen et al., 2003).

La ciclofosfamida junto con iridotecan o topotecan/vincristina, puede ser utilizada efectivamente en la preparación de pacientes para inmunoterapia en casos de neuroblastoma refractario (Kushner et al., 2004). Se sintetizó una nueva IL-2 blanco mediante su unión a un anticuerpo monoclonal a GD2. La toxicidad fue tolerable, no se observaron respuestas parciales ni completas, pero fue posible demostrar la inmunoreactividad hacia el tumor en este estudio de Fase-I (Osenga et al., 2006).

4.2.13 Efectos adversos

No obstante la implementación de nuevas terapias, se siguen presentando efectos no deseados observados con varios de los agentes quimioterapéuticos convencionales (Tabla 2).

Tabla 2. Agentes quimioterapéuticos utilizados en las nuevas terapias para el tratamiento del NB.

Fármaco	Efectos adversos
Etopósido	<ul style="list-style-type: none">- Disminución de la presión sanguínea- Disminución del hematocrito- Alopecia- Sabor metálico, diarrea
Onconasa	<ul style="list-style-type: none">- Fatiga- Alopecia- Náusea
BBR3464	<ul style="list-style-type: none">- Diarrea- Espasmos musculares (calambres)- Vómito
CPEC	<ul style="list-style-type: none">- Cardiotoxicidad severa (hipotensión)
Temozolomida	<ul style="list-style-type: none">- Ansiedad, trastornos del sueño, cinetosis- Cefalalgia, dolor articular, debilidad- Alopecia, aumento de peso- Vómito, constipación, diarrea
ATRA	<ul style="list-style-type: none">- Disnea, fiebre- Edema periférico, aumento de peso
Acido Retinóico	<ul style="list-style-type: none">- Resequedad en mucosas y piel- Fluctuaciones en la presión arterial- Dolor muscular y articular, cefalalgia, debilidad- Aumento de enzimas hepáticas

Tabla 2. Continuación...

Fármaco	Efectos adversos
Fenretinida	<ul style="list-style-type: none">- Nictalopia- Resequedad en mucosas y piel
Trióxido de Arsénico	<ul style="list-style-type: none">- Desórdenes en la coagulación- Inflamación de hígado y pulmones- Alopecia- Abortos, bajo peso en recién nacidos- Dolor abdominal, vómito, diarrea, hemorragia gastrointestinal
Acido Docosahexanoico	<ul style="list-style-type: none">- Hemorragia cerebral- Alteraciones en el habla, visión, adormecimiento de extremidades- Debilidad, cefalalgia severa
Ciclodextrina	<ul style="list-style-type: none">- Náusea, vómito, diarrea- Dolor abdominal
Neocarzinostatina	<ul style="list-style-type: none">- Hipertensión- Fiebre, confusión mental- Disfunción renal y hepática
Casiopeínas	<ul style="list-style-type: none">- Disminución de la presión arterial- Taquipnea- Taquicardia alternada con bradicardia- Edema pulmonar

Tabla 2: CPEC: Ciclopentenil citosina; ATRA: Acido retinóico todo-trans.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El reconocimiento de que aberraciones en la apoptosis pueden constituir un obstáculo clínico mayor que sortear en el tratamiento del cáncer, ha generado una gran variedad de estrategias encaminadas a explotar esta ruta con la esperanza de ser capaces de desencadenar una muerte celular tumor-selectiva. La meta de cualquier estrategia terapéutica es impactar en las células tumorales blanco con un efecto nocivo mínimo a la función celular normal. Es muy común observar que la perturbación de la función celular en un tumor, a menudo compromete severamente la homeostásis celular normal, de tal forma que la intervención terapéutica llega a ser de valor clínico limitado. El reto radica en el hecho de que todas las células normales también poseen la capacidad de entrar en el programa apoptótico y, más aún, a menudo lo hacen más eficientemente que sus contrapartes tumorigénicas.

El problema de obtener selectividad farmacológica, no está más claramente demostrado que en varios de los quimioterapéuticos convencionales que están diseñados para explotar la respuesta proliferativa acelerada observada en varios tipos de tumores, con consecuencias devastadoras para células proliferativas saludables. Así que la pregunta es: ¿realmente se puede esperar explotar la apoptosis como una estrategia terapéutica y alcanzar la destrucción tumoral selectiva sin comprometer la función celular normal? En principio, eso puede ser posible si podemos explotar la expresión y/o la función de moléculas relacionadas con la apoptosis, las cuales se encarguen exclusivamente de mantener la función celular tumoral o bien, moléculas que sean reguladas de una manera diferente en células tumorales que en células normales.

A pesar de que se ha logrado un progreso sustancial en las aproximaciones del tratamiento hacia los pacientes con NB de riesgo bajo e intermedio, las tasas de cura para aquellos niños con neuroblastoma metastático permanecen insatisfactorias. La mayoría de los pacientes de bajo riesgo son tratados con éxito únicamente mediante cirugía, y algunos infantes no requieren tratamiento porque sus tumores tienen una alta frecuencia de regresión espontánea. Aún en aquellos infantes con un estadio de NB IV, la sobrevivencia a largo plazo, más del 90 %, es típica si el gen tumoral *N-MYC* no se ve amplificado. De manera similar, entre aquellos pacientes con tumores en estadio de riesgo medio, existe una expectativa de vida mayor del 90 % después de una quimioterapia de dosis moderada y cirugía. En contraste, el éxito permanece pobre en aquellos niños mayores de un año con NB metastático, con o sin amplificación de *N-MYC*, y durante la



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

década pasada ha habido solamente una mejoría modesta en las tasas de curación. Además, a pesar de haber logrado una remisión clínica completa, la mayoría de los niños con la enfermedad en estadio de alto riesgo reincidirán debido a la enfermedad residual producto de la fármaco-resistencia. La erradicación de la enfermedad microscópica recurrente permanece como el reto más significativo en el tratamiento del NB metastásico.

Una variedad de complicaciones agudas y tardías originadas a partir del NB y su tratamiento pueden ocurrir; estas incluyen efectos a largo plazo de la quimioterapia, radioterapia y cirugía. Los pacientes de alto riesgo se encuentran mayormente expuestos debido a las estrategias intensivas de los tratamientos multimodales que actualmente se utilizan

El cáncer es una enfermedad sumamente compleja, definida por un colectivo heterogéneo de lesiones genéticas que inician y mantienen la tumorigénesis. La disección molecular de estas lesiones ha identificado objetivos clave para el descubrimiento de fármacos. Los defectos en la regulación de la apoptosis juegan un papel fundamental al mediar la progresión del tumor y la quimioresistencia que impide la eficacia de las terapias en una gran proporción de neuroblastomas de alto riesgo. Las células de NB manifiestan varios procesos moleculares aberrantes que deberían comprometerse en rutas apoptóticas autoregulatorias, incluyendo la desregulación de oncogenes como *N-MYC*, defectos en la segregación cromosómica (aneuploidía), pérdida de contactos célula-célula (metástasis) y la privación de nutrientes *in situ* (hipoxia, acidosis y privación de neurotrofinas). Estas aberraciones hacen a estas células más dependientes de la supresión de la apoptosis que sus contrapartes normales, proveyendo de una fuerte exposición razonable para que las terapias proapoptóticas reestablezcan la quimiosensibilidad e incrementen las tasas de supervivencia.

Una característica distintiva del neuroblastoma es la heterogeneidad, con un amplio espectro de comportamiento clínico, el cual varía de acuerdo con la edad de diagnóstico, el estadio de la enfermedad, y la biología del tumor. Ésta heterogeneidad es más evidente en los numerosos cambios genéticos ligados a la transformación identificados en líneas celulares y tumores. Algunas de estas aberraciones son factores predictivos de la respuesta y el éxito del tratamiento. Aunque se ha logrado un progreso substancial en la aproximación terapéutica en pacientes con NB de bajo y medio riesgo, la tasa de cura en niños con NB metastásico permanece insatisfactoria.

La investigación futura que involucre pruebas preclínicas y clínicas necesariamente tendrá que contemplar puntos de eficacia tanto biológicos como clínicos. La naturaleza de las terapias ruta-objetivo también ofrece oportunidades para la utilización de estrategias sinérgicas, no solamente con citotóxicos tradicionales, sino con otros agentes de ruta específicos para optimizar el tratamiento de manera conjunta.

ALCANCES ACTUALES Y PERSPECTIVAS

Avances futuros en las tasas de supervivencia requerirán de aproximaciones innovadoras en los tratamientos, basadas en un mejor entendimiento de las lesiones genéticas moleculares, responsables de la progresión del neuroblastoma y de las fallas en los tratamientos. Idealmente, dichos compuestos innovadores deberán ser capaces de aumentar o restablecer la eficacia de los citotóxicos utilizados actualmente, no presentar resistencia cruzada con agentes actuales, y tener distintas toxicidades no-aditivas o ninguna toxicidad.

La investigación debe enfocar sus esfuerzos en el descubrimiento de nuevos genes y rutas críticas en la tumorigénesis y la fármaco-resistencia del NB. Se espera que los alcances basados en tratamientos biológicos sean más efectivos y menos tóxicos que los regímenes actuales. Por otro lado, si la progresión clínica de un tumor pequeño de NB local hacia una enfermedad metastásica no ocurre en forma general, entonces la terapia citotóxica coadyuvante probablemente no sea necesaria para la mayoría de estos pacientes. Por otro lado, a pesar de la sensibilidad general de NB a la quimioterapia, la cura de la metástasis residual mínima sigue siendo difícil. Debe hacerse énfasis en la investigación enfocada en su evaluación, control y erradicación. Lo más importante de todo, con la lista creciente de terapias promisorias, los esfuerzos para integrarlas de manera oportuna y efectiva en una estrategia general de cura deben ser una prioridad.

Uno de los avances más importantes en la investigación del cáncer en los últimos años, es el reconocimiento de que la muerte celular, en la mayoría de los casos por apoptosis, está involucrada de manera crucial en la regulación de la formación de tumores, al mismo tiempo que determina de manera crítica la respuesta a los tratamientos. La destrucción de células tumorales a partir de la mayoría de las estrategias anticáncer utilizadas actualmente en la oncología clínica, por ejemplo, quimioterapia, radioterapia, terapia de genes suicidas o inmunoterapia, ha sido ligada a la activación de rutas de traducción de señales de la apoptosis en las células cancerosas. Por lo tanto, las fallas en la inducción de la apoptosis pueden resultar en resistencia a los tratamientos. El entendimiento de los eventos moleculares que regulan la apoptosis en respuesta a la terapia contra el cáncer, y de cómo las células cancerosas evaden la muerte apoptótica, provee de nuevas oportunidades para lograr una aproximación más racional en el desarrollo de terapias moleculares dirigidas para combatir el cáncer.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

3F8: Anticuerpo monoclonal 3F8.

4-HPR: 4-hidroxifenil-retinamida (fenretinida).

A

$\alpha 3\beta 1$: Integrina alfa3beta1.

A1/Bfl-1: A1 o Bfl-1, homólogo de Bcl-2 aislado de hígado fetal humano. Miembro antiapoptótico de Bcl-2.

AIF: Factor inductor de la apoptosis.

Akt: Miembro de la familia de proteín—quinasas B (PKB).

ALK: Cinasa de linfoma anaplásico.

ANT: Proteína de membrana mitocondrial interna translocadora de nucleótidos.

AP-1: Proteína activadora 1.

Apaf-1: Factor activador de la peptidasa apoptótica 1.

APC: Célula presentadora de antígenos.

AR: Acido retinóico.

AR-13-cis: Acido retinóico 13-cis.

Ara-C: Citosina arabinósida.

ATP: Adenosín trifosfato.

ATRA: Acido retinóico todo-trans.

B

Bad: Proteína d asociada a Bcl-2.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Bag-1: Regulador de la chaperona molecular 1, perteneciente a la familia BAG.

Bak: Asesino antagonista de Bcl-2. Miembro pro-apoptótico de Bcl-2.

Bax: Proteína x asociada a Bcl-2.

BBR3464: Tetranitrato de triplatino.

Bcl-2: Proteína de linfoma 2 de células B.

Bcl-w: Proteína similar a Bcl-2. Miembro anti-apoptótico de Bcl-2.

Bcl-XL: Proteína de linfoma de células B "extra grande". Miembro anti-apoptótico de la familia Bcl-2.

Bcl-XS: Proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2.

BDNF: Factor de necrosis tumoral derivado de cerebro.

BH: Dominio de homología a Bcl-2.

BHA: Hidroxianisol butilado.

BHLHzip: Motivo estructural protéico "base-hélice-loop-hélice-cierre" que caracteriza a una familia de factores de transcripción.

Bid: Dominio agonista de muerte que interactúa con BH3. Miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2.

Bik: Proteína de muerte que interactúa con Bcl-2. Miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2.

Bim: Proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2.

BIR: Repetición de IAP de baculovirus.

Bok: Proteína ovárica de muerte relacionada con Bcl-2. Miembro pro-apoptótico de Bcl-2.

BSO: Butionil sulfoximina.

C

Ca⁺: Símbolo del elemento químico Calcio.

CAD: DNasa activada por caspasas.

CD1d: Miembro de la familia de glicoproteínas “conglomerado de diferenciación 1”.

CD55: Complemento factor acelerador del decaimiento.

CD59: Protectina, proteína regulatoria de complemento.

CD95: Receptor de Fas (También conocido como APO-1).

cDNA: DNA complementario.

Ced3: Gen de muerte celular descubierto en *Caenorhabditis elegans*. Promueve la apoptosis y es un homólogo de Apaf-3/caspasa-9 y caspasa-3.

c-IAP: Proteína contenedora de una repetición de la proteína baculoviral inhibidora de la apoptosis

CAD: DNasa activada por caspasas.

Cit c: Citocromo c

c-myc: Oncogen relacionado a la mielocitomatosis viral.

CPEC: Ciclopentenil citosina.

CTLs: Sistemas de antígenos reconocidos por linfocitos T citotóxicos.

D

DcR: Receptor señuelo.

dCTP: Desoxicitidina trifosfato.

DD: Dominio de muerte.

DED: Dominio efector de muerte.

DIABLO: Proteína de unión directa a IAP con bajo punto isoeléctrico.

DISC: Complejo de señalización inductor de muerte.

DNA: Acido desoxirribonucleico.

DR: Receptor de muerte.

DR3: Receptor de muerte 3.

DR6: Receptor de muerte 6.

dUTP: Desoxiuridin trifosfatasa.

E

Eda: Ectodisplasina.

EDAR: Receptor a ectodisplasina.

Egl1: Gen de la endo-beta-1,4-gluconasa.

ERK: Cinasa extracelular regulada por señales.

ERO: Especie reactiva de oxígeno.

F

FADD: Dominio de muerte asociado a Fas.

Fas: También conocido como CD95 y Apo-1. Es un miembro de la familia del receptor de TNF y promueve la apoptosis.

FasL: Fas ligando, también conocido como ligando de APO-1.

FLICE: Enzima convertidora de interleucina-1 beta similar a FAAD.

FLIPL: Forma larga de la proteína inhibidora similar a FLICE.

G

GAAD153: Gen de arresto del crecimiento y daño al DNA 153.

GD1a: Gangliósido 1a.

GD2: Disialogangliósido.

GDNF: Factor neurotrófico derivado de la línea celular glial.

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos.

GN: Ganglioneuroma.

GNB: Ganglioneuroblastoma.

GSH: Glutación.

H

HA14-1: 2-Amino-6-bromo-a-ciano-3- (etoxicarbonil)-4H-1-benzopiran-4-ácido acético etil éster.

HDM2: Proteína doble minuto-2 humana.

HIF-1 α : Factor de hypoxia inducible 1alfa.

hMLH1: Homólogo 1 MutL de cáncer colorectal no poliposo tipo 2.

HPV: Virus del papiloma humano.

Hrk : Activador de apoptosis harakiri. Miembro pro-apoptótico de Bcl-2.

I

IAPs: Proteínas inhibidoras de la apoptosis.

IBM: Motivo de unión a IAP.

ICAD: Inhibidor de la DNasa activada por caspasas.

Id2 Inhibidor de la proteína de unión al DNA.

IFN- γ : Interferón gama.

IgM: Inmunoglobulina M.

IKK: Cinasa I κ B.

IL-2: Interleucina 2.

ILP-2: Proteína similar a IAP-2.

IMID: Muerte mediada por integrinas.

J

JNK: Cinasa N-terminal que fosforila a c-Jun.

K

kDa: Kilo-Dalton.

Killer/Dr5: Ligando inductor de la apoptosis relacionado a TNFR 2.

L

L-MYC: Oncogen relacionado a la mielocitomatosis viral, "L" por derivado de pulmón.

M

MAPc: Proteína asociada a microtúbulos.

MAPK: Proteína cinasa activada por mitógenos.

MAX: Proteína bHLH-cierre relacionada con c-Myc, L-Myc y N-Myc.

Mcl-1: Proteína de diferenciación celular de leucemia mieloide 1. Miembro anti-apoptótico de Bcl-2.

MCP: Muerte celular programada.

MDM2: Proteína doble minuto 2-murina.

MDR1: Factor de resistencia a múltiples fármacos 1

MEK: Cinasa activada por mitógenos.

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.

mRNA: Acido ribonucleico mensajero.

MRP: Proteína de resistencia a múltiples fármacos.

MYC: Proteína de mielocitomatosis viral

N

NB: Neuroblastoma.

N-CAM: Molécula de adhesión celular neural.

NDPK-A: Nucleósido difosfato cinasa A.

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de células B activadas.

NGF: Factor de crecimiento neuronal.

NGFR: Receptor del factor de crecimiento neuronal.

NIAP: Proteína inhibidora de la apoptosis neuronal.

NK: Célula *natural killer*.

NKT: Célula que comparte características de células T y *natural killer*.

nm23-H1: Gen supresor metastásico relacionado con la proteína nucleósido difosfatocinasa A (NDK A).

N-MYC: Oncogen relacionado a la mielocitomatosis viral, "N" por derivado de neuroblastoma.

O

ODC: Ornitina descarboxilasa.

Omi/HtrA2: Proteasa de serina mitochondrial conocida como Omi o HtrA2.

OPG: Osteoprotegerina.

P

p21WAF1: Proteína inhibidora de cinasas dependiente de ciclina.

p53: Gen supresor tumoral llamado así por su aparente masa molecular.

p63: Proteína relacionada a la transformación 63.

p73: Gen supresor tumoral relacionado con p53.

PARP: Poli adenosina ribosa fosfato polimerasa.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

Perp: Efecto de apoptosis por p53 relacionado a la proteína 22 de la mielina (PMP-22).

P-gp: Glicoproteína de permeabilidad.

PKC β : Isoforma beta de la proteína cinasa C.

PT: Poro mitocondrial de transición.

PTEN: Proteína de fosfatasa y tensina.

PUMA: Modulador de la apoptosis de p53 regulado a la alta.

R

Raf-1: Cinasa específica de serina/treonina.

RAR: Receptor a ácido retinóico.

RIP: Proteína que interactúa con receptores.

RNA: Acido ribonucléico.

RXR: Receptor al retinoide X.

S

sirt 1: Gen codificador de la proteína sirtuina 1.

Smac: Segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria.

SNS: Sistema nervioso simpático.

SSCP: Polimorfismo conformacional de una sola hebra.

STAT-1: Transductor de señal y activador de la transcripción 1.

SV40: Virus vacuolar de simios 40.

T

T CD4⁺: Linfocitos T que expresan la proteína de superficie CD4.

TAB2: Proteína 2 de unión a TAK1.

TAK1: Cinasa activada por el factor de crecimiento transformante 1.

tBid: Bid truncado.

TCR: Receptor de la célula T.

TERT: Telomerasa reverso transcriptasa.

TGF- β : Factor de crecimiento transformador beta.

Th: Linfocito T *helper*.

TL1A: Ligando similar a TNF que se une a DR3 y TR6/DcR3.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

TNFR: Receptor del factor de necrosis tumoral.

Top1: Topoisomerasa 1

Top1mt: Topoisomerasa 1 del DNA, mitocondrial.

TRADD: Dominio de muerte asociado a TNFR 1.

TRAF: Factor asociado a TNFR.

TRAIL: Ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF.

TRAILR: Receptor ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF.

TrkB: Receptor neurotrófico de tirosina cinasa tipo 2.

TROY: Miembro número 19 de la superfamilia TNFR.

V

VDAC: Canal aniónico dependiente de voltaje.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

X

XEDAR: Receptor de ectodisplasina A2 ligado al cromosoma X.

XIAP: Proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X.

LITERATURA CITADA

- **Abbas, A. K.** 1996. Die and let live: eliminating dangerous lymphocytes. *Cell* **84**: 655–657.
- **Abemayor, E. y Sidell, N.** 1989. Human Neuroblastoma Cell Lines as Models for the *In Vitro* Study of Neoplastic and Neuronal Cell Differentiation. *Environmental Health Perspectives* **80**: 3-15.
- **Adida, C., Berrebi, D., Peuchmaur, M., Reyes-Mugica, M. y Altieri, D. C.** 1998. Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* **351**: 882–883.
- **Almreng, M. A. y Chang, C. L.** 2004. Ancient Chinese drug targets the migration of human neuroblastoma cells. *American Association of Cancer Research* **45**.
- **Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W. y Yuan, J.** 1996. Human ICE/CED3 Protease Nomenclature. *Cell* **87**: 171.
- **Altieri, D. C.** 2001. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends in Molecular Medicine* **7**: 542–547.
- **Altieri, D. C.** 2003. Validating surviving as a cancer therapeutic target. *Nature Reviews Cancer* **3**: 46-54.
- **Altieri, D. C., Li, F.** 1999. The cancer antiapoptosis mouse survivin gene: characterization of locus and transcriptional requirements of basal and cell cycle-dependent expression. *Cancer Research* **59**: 3134–3151.
- **Ameisen, J. C.** 1996. The origin of programmed cell death. *Science* **272**: 1278–1279.
- **Ameisen, J. C.** 2002. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death and Differentiation* **9**: 367–393.
- **Ameisen, J. C.** 2004. Looking for death at the core of life in the light of evolution. *Cell Death and Differentiation* **11**: 4-10.
- **Ameisen, J. C. y Capron, A.** 1991. Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunology Today* **12**: 102–105.
- **Anderson, C. D. y Reynolds, C. P.** 2002. Synergistic cytotoxicity of buthionin sulfoximine (BSO) and intensive melphalan (L-PAM) for neuroblastoma cell lines established at relapse after myeloablative therapy. *Bone Marrow Transplantation* **30**: 135-140.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

- **Anderson, C. D., Anissimov, Y. G., Doubrovsky, A., Roberts, M. S., Siebert, G. A., Smithers, B. M. y Thompson, J. F.** 2001. Mycrodialysis and response during regional chemotherapy by isolated limb infusion of melphalan for limb malignancies. *British Journal of Cancer* **85**: 157-165
- **Anmol, C., Vandna, P., Jayashree, C. J., Ravi, S. y Padma, R. S.** 2004. Upregulation of Survivin in G2/M Cells and Inhibition of Caspase 9 Activity Enhances Resistance in Staurosporine-Induced Apoptosis. *Neoplasia* **6**:29-40.
- **Antonsson, B. y Martinou, J.C.** 2000. The Bcl-2 protein family, *Experimental Cell Research* **256**: 50–57.
- **Armstrong, M. B., Bian, X., Liu, Y., Subramanian, C., Ratanaproska, A. B., Shao, F., Yu, V. C., Kwok, R. P. S., Oipari, A. W., Jr. y Castle, V. P.** 2006. Signaling from p53 to NF- κ B Determines the Chemotherapy Responsiveness of Neuroblastoma. 2006. *Neoplasia* **8**: 964-974.
- **Ashkenazi, A.** 2002. Targeting death and decoy receptors of the tumor-necrosis factor superfamily. *Nature Reviews Cancer* **2**: 420-430.
- **Ashkenazi, A. y Dixit, V.** 1999. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Current Opinion in Cell Biology* **11**: 265-60.
- **Ashkenazi, A. y Dixit, V. M.** 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. **281**: 1305–1308.
- **Attiyeh, E. F., London, W.B., Mosse, Y. P., Wang, Q., Winter, C. y Khazi, D.** 2005. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *New England Journal of Medicine* **353**: 2243–2253.
- **Bargonetti, J. y Manfredi, J. J.** 2002. Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Current Opinion in Oncology* **14**: 86–91.
- **Bart, A. J. J., Jaap, B. y Jan, R.** 2002. Glutathione induces cellular resistance against cationic dinuclear platinum anticancer drugs. *Journal of Inorganic Biochemistry* **89**: 197-202.
- **Bayés, M., Hartung, A. J., Ezer, S., Pispa, J., Thesleff, I., Srivastava, A. K. y Kere, J.** 1998. The anhidrotic ectodermal dysplasia gene (EDA) undergoes alternative splicing and encodes ectodysplasin-A with deletion mutations in collagenous repeats. *Human Molecular Genetics*. **7**: 1661–1669.
- **Beers, E. P.** 1997. Programmed cell death during plant growth and development. *Cell Death and Differentiation* **4**: 649–661.
- **Bénard, J., Raguénez, G., Kauffmann, A., Valent, A., Ripoche, H., Joulin, V., Job,**

- B., Danglot, G., Cantais, S. y Robert, T.** 2008. MYCN-non-amplified metastatic neuroblastoma with good prognosis and spontaneous regression: A molecular portrait of stage 4S. *Molecular Oncology* **2**: 261-271.
- **Berthold, F. y Hero, B.** 2000. Neuroblastoma: Current Drug Therapy Recommendations as Part of the Total Treatment Approach. *Drugs* **59**: 1261-1277.
 - **Berthold, F., Schneider, A., Schumacher, R. y Bosslet, K.** 1989. Detection of Minimal Disease in Bone Marrow of Neuroblastoma Patients by Immunofluorescence. *Pediatric Hematology-Oncology* **6**: 73-83.
 - **Bhardwaj, A. y Aggarwal, B. B.** 2003. Receptor-mediated choreography of life and death. *Journal of Clinical Immunology* **23**: 317-332.
 - **Biedler, J. L., Lazarova, D. L., Ross, R. A. y Spengler, B. A.** 1997. Cell lineage and differentiation state are primary determinants of MYCN gene expression and malignant potential in human neuroblastoma cells. *Oncology Research* **9**: 467-476.
 - **Bierau, J.** 2003. The pivotal role of CTP synthetase in the metabolism of (deoxy)nucleosides in neuroblastoma. Tesis, **133** pp.
 - **Blaheta, R. A., Daher, F. H., Michaelis, M., Hasenberg, C., Weich, E. M., Kotchetkov, R., Doerr, H. W. y Cinatl jr, J.** 2006. Chemoresistance induces enhanced adhesion and transendothelial penetration of neuroblastoma cells by downregulating NCAM surface expression. *BioMed Central Cancer* **6**: 294.
 - **Blanc, E., Goldschneider, D., Ferrandis, E., Barrois, M., Le Roux, G., Leonce, S., Douc-Rasy, S., Bénard, J. y Raguénez, G.** 2003. MYCN Enhances P-gp/*MDR1* Gene Expression in the Human Metastatic Neuroblastoma IGR-N-91 Model. *American Journal of Pathology* **163**: 321-331.
 - **Boon, K.** 2001. N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. *EMBO Journal* **20**:1383–1393.
 - **Brennecke, J., Hipfner, D. R., Stark, A., Russell, R. B. y Cohen, S. M.** 2003. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* **113**: 25–36.
 - **Brodeur, G. M., Seeger, R. C., Schwab, M., Varmus, H. E. y Bishop, J. M.** 1984. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* **224**:1121–1124.
 - **Chai, J., Du, C., Wu, J. W., Kyin, S., Wang, X. y Shi, Y.** 2000. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* **406**: 855–862.
 - **Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L. y Lenardo, M. J.** 2000. A Domain in TNF receptors that Mediates Ligand-Independent Receptor Assembly

and Signaling. *Science* **288**: 2351-2354.

- **Chen, D. Xia, J., Tanaka, Y., Chen, H., Koido, S., Wernet, O., Mukherjee, P., Gendler, S. J. Kufe, D. y Gong, J.** 2003. Immunotherapy of spontaneous mammary carcinoma with fusions of dendritic cells and mucin 1-positive carcinoma cells. *Immunology* **109**: 300-307.
- **Cheung, I. Y. y Cheung, N. K.** 2001. Detection of microscopic disease: comparing histology, immunocytology, and RTPCR of tyrosine hydroxylase, GAGE, and MAG. *Medical and Pediatric Oncology* **36**: 210-212.
- **Cheung, N. K. y Sondel, P. M.** 2005. Capítulo 14: Immunology and Immunotherapy, Cheung, N. K. y Cohn, S. editores. Neuroblastoma. Springer. ISBN: 3-540-40841-x.
- **Cheung, N. K., Kushner, G. H. y Gulati, S. C.** 1998. Effective purging of neuroblastoma from bone marrow (BM) using IgG3 monoclonal antibody (MoAb) that mediate human complement dependent as well as cell-mediated cytotoxicities. *Blood* **72**: 394a.
- **Cheung, N. K., Neely, J. E., Landmeier, B., Nelson, D. y Miraldi, F.** 1987. Targeting of ganglioside GD2 Monoclonal Antibody to Neuroblastoma. *The Journal of Nuclear Medicine* **28**: 1577-1583.
- **Cheung, N. K., Sowers, R., Vickers, A. J., Cheung, I. Y., Kushner, B. H. y Gorlick, R.** 2006. FCGR2A polymorphism is correlated with clinical outcome after immunotherapy of neuroblastoma with anti-GD2 antibody and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Journal of Clinical Oncology* **24**: 2885-2890.
- **Chinnaiyan, A. M. y Dixit, V. M.** 1996. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**: 505-512.
- **Chu, F., Chou, P. M., Zheng, X., Mirkun, B. L. y Rebbaa, A.** 2005. Control of multidrug resistance to chemotherapy by the longevity gene sirt 1. *Cancer Research* **65**: 10183-10187.
- **Cole, M. D. y Cowling, V. H.** 2008. Transcription-independent functions of MYC: Regulation of translation and DNA replication. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**: 810-815.
- **Colucci, F., Caligiuri, F. A., Di Santo, J. P.** 2003 What does it take to make a natural killer? *Nature Reviews Immunology* **3**: 413-425.
- **Conradt, B. y Horvitz, H. R.** 1998. The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* **93**:

519–529.

- **Cory, S.** 1995. Regulation of Lymphocyte Survival by the BCL-2 Gene Family. Annual Review of Immunology **513**: 513-543.
- **Crompton, M., Virji, S. y Ward, J.** 1998. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. European Journal of Biochemistry **258**: 729-735.
- **Cryns, V. L., Bergeron, L., Zhu, H., Li, H. y Yuan, J.** 1996. Specific cleavage of alpha-fodrin during Fas and tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by an interleukin-1-beta converting enzyme/Ced-3 protease distinct from poly(ADP-ribose) polymerase protease. Journal of Biological Chemistry **271**: 31277-31282.
- **Cummings, J., Ranson, M., Lacasse, E., Ganganagari, J. R., St-Jean, M., Jayson, G., Durkin, J. y Dive, C.** 2006. Method validation and preliminary qualification of pharmacodynamic biomarkers employed to evaluate the clinical efficacy of an antisense compound (AEG35156) targeted to the X-linked inhibitor of apoptosis protein XIAP. British Journal of Cncer **95**: 42-48.
- **Dae Won, K., Song Ho, A. y Tae Young, K.** 2007. Enhancement of Arsenic Trioxide (As₂O₃)-Mediated Apoptosis Using Berberine in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. Journal of Korean Neurosurgical Society **42**: 392-399.
- **Das, Y. Yeger, H., Tsuchida, R., Torkin, R., Gee, M. F. y Thomer, P. S.** 2005. A hypoxia-driven vascular endothelial growth factor/Fit 1 autocrine loop interacts with hypoxia-inducible factor-1alpha through mitogen activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase ½ pathway in neuroblastoma. Cancer Research **65**: 7267-7275.
- **Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. y Greenberg, M. E.** 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. Cell **91**: 231-241.
- **Dauer, L. T., St Germain, J., Williamson, M. J., Zanzonico, P., Modak, S. y Cheung, N. K.** 2007. Whole-body clearance kinetics and external dosimetry of 1311-3F8 monoclonal antibody for radioimmunotherapy of neuroblastoma. Health Physiology **92**: 33-39.
- **Davidoff, A. M., Pence, J. C., Shorter, N. A., Igleheart, J. D. y Marks, J. R.** 1992. Expression of p53 in human neuroblastoma- and neuroepithelioma-derived cell lines. Oncogene **7**: 127-133.

- **De Vizcaya-Ruiz, A., Rivero-Muller, A., Ruiz-Ramirez, L., Kass, G. E., Kelland, L. R. y Orr, R. M. 2000.** Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, casiopeina II, in L1210 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells. *Toxicology In Vitro* **14**: 1-5.
- **Decaudin, D., Geley, S., Hirsch, T., Castedo, M., Marchetti, P., Macho, A., Kofler, R. y Kroemer, G. 1997.** Bcl-2 and Bcl-XL antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Research* **57**: 62-67.
- **Deckwerth, T. L. y Johnson, E. M. Jr. 1993.** Temporal analysis of events associated with programmed cell death (apoptosis) of sympathetic neurons deprived of nerve growth factor. *Journal of Cell Biology* **123**: 1207-1222.
- **Deveraux, Q. L. y Reed, J. C. 1999.** IAP family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes and Development* **13**: 239–252.
- **Di Francesco, A. M., Meco, D., Torella, A. R., Barone, G., D’Incalci, M. Y Pisano, C. 2007.** The novel atypical retinoid ST1926 is active in ATRA resistant neuroblastoma cells acting by a different mechanism. *Biochemical Pharmacology* **73**: 643-655.
- **Diefenbach, A. y Raulet, D. H. 2002.** Strategies for target cell recognition by natural killer cells. *Immunological Reviews* **181**: 170-184.
- **Dijkhuis, A. J., Klappe, K., Jacobs, S., Kroesen, B. J., Kamps, W. y Sietsma, H. 2006.** PDMP sensitizes neuroblastoma to paclitaxel by inducing aberrant cell cycle progression leading to hyperploidy. *Molecular Cancer Therapy* **5**: 593-601.
- **Dole, M. G., Jasty, R., Cooper, M. J., Thompson, C. B., Nunez, G. y Castle, V. P. 1995.** Bcl-XL is expressed in neuroblastoma cells and modulates chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Research* **55**: 2576-2582.
- **Don, S., Verrills, N. M., Liaw, T. I. E., Liu, M. L. M., Norris, M. D. y Haber, M. 2004.** Neuronal-associated microtubule proteins class 3 b-tubulin and MAP2c in neuroblastoma: role in resistance to microtubule-targeted drugs. *Molecular Cancer Therapeutics* **3**: 1137-1146.
- **Drew, Y. y Calvert, H. 2008.** The potential of PARP inhibitors in genetic breast and ovarian cancers. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1138**: 136-145.
- **Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. y Wang, X. 2000.** Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**: 33–42.
- **Dyer, M. A. 2004.** Mouse models of childhood cancer of the nervous system. *Journal of clinical Pathology* **57**: 561-576.
- **Eggert, A., Grotzer, M. A., Zuzak, T. J., Wiewrodt, B. R., Ho, R., Ikegaki, N, y**

- Brodeur, G. M.** 2001. Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Cancer Research* **61**: 1314–19.
- **Ekert, P. G. y Vaux, D. L.** 1997. Apoptosis and the immune system. *British Medical Bulletin* **53**: 591-603.
 - **el-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W. y Vogelstein, B.** 1992. Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Genetics* **1**: 45–49.
 - **Ellis, H. M. y Horvitz, H. R.** 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*. **44**: 817-829.
 - **Elmore, S.** 2007. Invited Review, Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* **35**: 495–516.
 - **Emran, M. A., Rebbaa, A. y Mirkin, B. L.** 2002. Doxorubicin resistant neuroblastoma cells secrete factors that activate AKT and attenuate cytotoxicity in drug-sensitive cells. *Cancer Letters* **182**: 53-59.
 - **Erdreich-Epstein, A., Tran, L. B., Bowman, N. N., Wang, H., Cabot, M. C., Durden, D. L., Vickova, J., Reynolds, C. P., Stins, M. F., Groshen, S. y Millard, M.** 2002. Ceramide Signaling in Fenretinide-induced Endothelial Cell Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 49531-49537.
 - **Evan, G. y Littlewood, T.** 1998. A matter of life and cell death. *Science* **281**: 1317–1322.
 - **Evans, A. E., Gerson, J. y Schnauffer, L.** 1976. Spontaneous regression of neuroblastoma. *National Cancer Institute Monographs* **44**: 49-54.
 - **Fang, M., Li, Y., Li, L. y Wang, X.** 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**: 33-42.
 - **Fearnhead, H. O., McCurrach, M. E., O'Neill, J., Zhang, K., Lowe, S. W. y Lazebnik, Y. A.** 1997. Oncogene-dependent apoptosis in extracts from drug-resistant cells. *Genes and Development* **11**: 1266-1276.
 - **Filomeni, G. Rotilio, G. y Cirolio, M. R.** 2005. Disulphyde relays and phosphorilative cascades: partners in redox-mediated signaling pathways. *Cell Death and Differentiation* **12**: 1555-1563.
 - **French, L. E. y Tschopp, J.** 2003. Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. *Cell Death and Differentiation* **10**, 117-123.
 - **Frisch, L. P., Kerbl, R., Lackner, H. y Urban, C.** 2004. "Wait and see" strategy in localized neuroblastoma in infants: an option not only for cases detected by mass screening. *Pediatric Blood and Cancer*. **43**: 679–682.

- **Fulda, S. y Debatin, K. M.** 2002 a. IFN-gamma sensitizes for apoptosis by upregulating caspase-8 expression through the Stat1 pathway. *Oncogene* **21**: 2295–308.
- **Fulda, S. y Debatin, K. M.** 2003. Apoptosis pathways in neuroblastoma therapy. *Cancer Letters* **197**:131-135.
- **Fulda, S. y Debatin, K. M.** 2006. Extrinsic versus intrinsic pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**:4798-4811.
- **Fulda, S., Debatin, K. M.** 2002 b. Caspase activation in cancer therapy, in: M. Los, H. Walczak (Eds.), *Caspases—Their Role in Cell Death and Cell Survival*, Kluwer Academic Press **35**: 185-196.
- **Fulda, S., Debatin, K. M., Wick, M. y Weller, K. M.** 2002. Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nature Medicine* **8**: 808–815.
- **Fulda, S., Küfer, M. U., Meyer, E., van Velen, F., Dockhorn-Dworniczak, B. y Debatin, K. M.** 2001. Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 by demethylation of gene transfer. *Oncogene* **20**: 5865-5877.
- **Gao, Z., Tian, Y., Wang, J., Yin, Q., Wu, H., Li, Y.M. y Jiang, X.** 2007. A dimeric Smac/diablo peptide directly relieves caspase-3 inhibition by XIAP. Dynamic and cooperative regulation of XIAP by Smac/Diablo. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 30718–30727.
- **Garcia-Carbonero, R. y Supko J. G.** 2002. Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins. *Journal of the American Association for Cancer Research* **8**: 641-661.
- **Georger, B., Vassal, G., Doz, F., O’Quigley, J., Wartelle, M. y Watson, A. J.** 2005. Dose finding and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase study of cisplatin combined with temozolomide in pediatric solid malignancies. *British Journal of Cancer* **93**: 529-537.
- **Gordon, G. J., Appasani, K., Parcels, J. P., Mukhopadhyay, N. K., Jaklitsch, M. T., Richards, W. G., Sugarbaker, D. J. y Bueno, R.** 2002. Inhibitor of apoptosis protein 1 promotes tumor cell survival in mesothelioma. *Carcinogenesis* **23**: 1017-1024.
- **Goto, H. Keshelava, N., Matthay, K. K., Lukens, J. N., Gerbing, R. B. y Stram, D. O.** 2000. Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) expression in neuroblastoma cell lines and primary tumors. *Medical and Pediatric Oncology* **35**: 619-622.
- **Goto, H., Yang, B., Petersen, D. Pepper, K. A., Alfaro, P. A. y Kohn, D. B.** 2003.

Transduction of green fluorescent protein increased oxidative stress and enhanced sensitivity to cytotoxic drugs in neuroblastoma cell lines. *Molecular Cancer Therapeutics* **2**: 911-917.

- **Goyal, L.** 2001. Cell death inhibition: keeping caspases in check. *Cell*. **104**: 805–808.
- **Green, D. R. y Kroemer, G.** 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*. **5684**: 626-629.
- **Greenberg, J.T.** 1996. Programmed cell death: a way of life for plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**: 12094–12097.
- **Griffith T. S. y Lynch, D. H.** 1998. TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Current Opinion in Immunology* **10**:559–63.
- **Guillemard, V. y Seragovi, H. U.** 2004. Novel approaches for targeted cancer therapy. *Current Cancer Drug Targets* **4**: 313-326
- **Gurney, M.** 2000. Neurobiology. Stay the executioner's hand. *Science*. **288**: 283–284.
- **Haase, G., Pettmann, B., Raoul, C. y Henderson, C.** 2008. Signalling by death receptors in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology* **18(3)**: 284-291.
- **Hainaut, P., Soussi, T., Shomer, B., Hollstein, M. y Greenblatt, M.** 1997. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospects. *Nucleic Acids Research* **25**: 151–157.
- **Hansford, L. M. y Marshall, G. M.** 2005. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) family ligands reduce the sensitivity of neuroblastoma cells to pharmacologically induced cell death, growth arrest and differentiation. *Neuroscience Letters* **389**: 77-82.
- **Headon, D. J., Emmal, S. A., Ferguson, B. M., Tucker, A. S., Justice, M. J., Sharpe, P. T., Zonana, J. y Overbeek, P. A.** 2001. Gene defect in ectodermal dysplasia implicates a death domain adapter in development. *Nature* **414**: 913–916.
- **Hengartner, M.O.** 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770–777.
- **Hopkins-Donaldson, S. Yan, P., Boursoud, K. B., Muhlethaler, A., Bodmer, J. y Gross, N.** 2002. Doxorubicin-induced death in neuroblastoma does not involve death receptors in S-type cells and is caspase-independent in N-type cells. *Oncogene* **21**: 6132-6137.
- **Hopkins-Donaldson, S., Bodmer, J. L, Boursoud, K. B., Brognara, C. B., Tschopp, J. y Gross, N.** 2000. Loss of caspase-8 expression in highly malignant human neuroblastoma cells correlates with resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Research* **60**: 4315–19.
- **Horvitz, H.R.** 1999. Genetic control of programmed cell death in the nematode

Caenorhabditis elegans. Cancer Research (Supplement) **59**: 1701–1706

- **Hunter, A. M., La Casse, E. C. y Korneluk, R. G.** 2007. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* **12**: 1543-1568.
- **Hunter, J.J. y Parslow, T.G.** 1996. A Peptide Sequence from Bax that converts Bcl-2 into an Activator of Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **271**:8521-8524.
- **Hussein, D., Estlin, E. J., Dive, C. y Markin, G. W.** 2006. Chronic hypoxia promotes hypoxia-inducible factor-1 α -dependent resistance to etoposide and vincristine in neuroblastoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics* **5**: 2241-2250.
- **Hymowitz, S. G., Compaan, D. M., Yan, M., Wallweber, H. J, Dixit, V. M., Starovasnik, M. A. y de Vos, A. M.** 2003. The crystal structures of EDA-A1 and EDA-A2: splice variants with distinct receptor specificity. *Structure* **11**:1513–1520.
- **Hyun, J. Y., Chun, Y. S., Kim, T. Y. Kim, H. L., Kim, M. S. y Park, J. W.** 2004. Hypoxia-inducible factor 1 α mediated resistance to phenolic anticancer. *Chemotherapy* **50**: 119-126.
- **Igney, F. H. y Krammer, P. H.** 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer* **2**:277–88.
- **Iolascon, A., Borriello, A., Giordani, L., Cucciolla, V., Moretti, A. y Monno, F.** 2003. Caspase 3 and 8 deficiency in human neuroblastoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **146**: 41-47.
- **Ishida, H., Matsumura, T., Salgaller, M. L., Ohmizono, Y., Kadono, Y. y Sawada, T.** 1996. MAGE-1 and MAGE-3 or -6 expression in neuroblastoma-related pediatric solid tumors. *International Journal of Cancer* **69**: 375-380.
- **Islam, A., Kageyama, H., Takada, N., Kawamoto, T., Takayasu, H., Isogai, E., Ohira, M., Hashizume, K., Kobayashi, H., Kaneko, Y. y Nakagawara, A.** 2000. High expression of Survivin mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene* **19**: 617-623.
- **Iwasaki, I., Sugiyama, H., KanaZawa, S. y Hemmi, H.** 2002. Establishment of cisplatin-resistant variants of human neuroblastoma cell lines, TGW and GOTO, and their drug cross-resistance profiles. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **49**: 438-444.
- **Jaboin, J., Kim, C. J., Kaplan, D. R. y Thiele, C. J.** 2002. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkBprotects neuroblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3' kinase pathway. *Cancer Research* **62**: 6756-6763.
- **Jacobson, M. D., Weil, M. y Raff, M. C.** 1997. Programmed cell death in animal

development. *Cell* **88**: 347-354.

- **Jaffe, R. B., Mesiano, S., Smith, R., Coulter, C. L., Spencer, S. J. y Chakravorty, A.** 1998. The Regulation and Growth of Fetal Adrenal Development in Human Pregnancy. *Endocrine Research* **24**: 919-926.
- **Jameson, J. Witherden, D. y Havran, W. L.** 2003. T-cell effector mechanisms gammadelta and CD1d-restricted subsets. *Current Opinion in Immunology* **15**: 349-353.
- **Janeway, C. A., Travers, P. y Walport M.** 2001. *Immunobiology-5 the immune system in health and disease: 5a edición.* Garland Publishing, Taylor and Francis Group, Nueva York.
- **Juárez-Ocaña, S., Palma-Padilla, V., González-Miranda, G., Siordia-Reyes, A. G., López-Aguilar, E., Aguilar-Martínez, M., Mejía-Arangur, J. M., Carreón-Cruz, R., Rendón-Macías, M. E. y Fajardo-Gutiérrez, A.** 2009. Epidemiological and some clinical characteristics of neuroblastoma in Mexican children. *BMC Cancer* **9**: 266
- **Karin, M. y Lin, A.** 2002. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nature Immunology* **3**: 221-227.
- **Karlsson, J., Edjso, A., Pahlman, S. y Petterson, H. S.** 2005. Multidrug-resistant neuroblastoma cells are responsive to arsenic trioxide at both normoxia and hypoxia. *Molecular Cancer Therapeutics* **4**: 1128-1135.
- **Kasibhatla, S., y Tseng, B.** 2003. Why Target Apoptosis in Cancer Treatment? *Molecular Cancer Therapeutics. Minireview.* **2**: 573-580.
- **Kaspar, B., Sherkat, J. L. N., Rothstein, J. D. y Gage, F. H.** 2003. Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* **301**: 839-842.
- **Kawasaki, H., Altieri, D. C., Lu, C. D., Toyoda, M., Tenjo, T. y Tanigawa, N.** 1998. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Research* **58**: 5071-5074.
- **Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Nakayama, M., Eto, H., Okumura, K. y Yagita, H.** 1999. Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells. A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *Journal of Experimental Medicine* **189**:1451-60.
- **Kelekar, A. y Thompson, C. B.** 1998. Bcl-2 family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends in Cell Biology* **8**: 324-330.
- **Kerr, J. F.** 1971. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *Journal of Pathology* **105**: 13-20.
- **Kerr, J. F. R. y Harmon, B. V.** 1991. Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective, en: *Apoptosis: the Molecular Basis of Cell Death.* L. D. Tomei y

F. O. Cope editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 5-31.

- **Keshelava, N., Groshen, S. y Reynolds, C. P.** 2006. Cross-resistance of topoisomerasa I and II inhibitors in neuroblastoma cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **45**: 1-8.
- **Keshelava, N., Zuo, J. J., Chen, P., Waidyaratne, S., N., Luna, M. C., Gomer, C., J., Triche, T. J. y Reynolds, C. P.** 2001. Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cells. *Cancer Research* **61**: 6185-6193.
- **Kirsch, D. G. y Kastan, M. B.** 1998. Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. *Journal of Clinical Oncology* **16**: 3158-3168.
- **Kitanaka, C., Kato, K., Ijiri, R., Sakurada, K., Tomiyama, A., Noguchi, K., Nagashima, Y., Nakagawara, A., Momoi, T., Toyoda, Y., Kigasawa, H., Nishi, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Tanaka, Y. y Kuchino, Y.** 2002. Increased Ras Expression and Caspase-Independent Neuroblastoma Cell Death: Possible Mechanism of Spontaneous Neuroblastoma Regression. *Journal of the National Cancer Institute*. **94**: 358-368.
- **Knudson, C. M., Tung, K. S. K., Tourtellotte, W. G., Brown, G. A. y Korsmeyer, S. J.** 1995. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* **270**: 96-99.
- **Kohl, N. E., Gee, C. E. y Alt, F. W.** 1984. Activated expression of the N-myc gene in human neuroblastomas and related tumors. *Science* **226**: 1335–1337.
- **Komuro, H., Hayashi, Y., Kawamura, M., Hayashi, K., Kaneto, Y., Kamoshita, S., Hanada, R., Yamamoto, K., Hongo, T., Yamada, M. y Tsuchida, Y.** 1993. Mutations of the p53 gene are involved in Ewing's sarcomas but not in neuroblastomas. *Cancer Research* **53**: 5284-5288.
- **Koppen, A.** 2007. Direct regulation of the minichromosome maintenance complex by MYCN in neuroblastoma. *European Journal of Cancer* **43**:2413–2422.
- **Korsmeyer, S. J., Wei, M. C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K. J. y Schlesinger, P. H.** 2000. Pro-apoptotic cascade activated BID, which oligomerises BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death and Differentiation* **12**: 1166-1173.
- **Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T. J., Kirschner, M. W., Koths, K., Kwiatkowski, D. J. y Williams, L. T.** 1997 Caspase-3 generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* **5336**: 294-298.
- **Krammer, P.** 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**: 789–

795.

- **Krammer, P. H., Arnold, R. y Lavrik, I. N.** 2007. Life and death in peripheral T cells. *Nature Reviews Immunology* **7**:532–542.
- **Kroemer, G.** 1997. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Medicine* **3**: 614-620.
- **Kroemer, G. y Reed, J.** 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine* **6**: 513–519.
- **Kumar, M. V., Shirley, R., Ma, Y., y Lewis, R. W.** 2004. Role of genomics-based strategies in overcoming chemotherapeutic resistance. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **5**: 471-480.
- **Kushner, B. H. Krammer, K., Modak, S y Cheung, N. K.** 2004. Captopotecin analogs (irinotecan or topotecan) plus high-dose cyclophosphamide as preparative regimens for antibody-based immunotherapy in resistant neuroblastoma. *Clinical Cancer Research* **10**: 84-87.
- **Kuss, B. J., Corbo, M., Lau, W. M., Fenell, D. A., Dean, N. M. y Cotter, F. E.** 2002. In vitro and in vivo downregulation of MRP1 by antisense oligonucleotides: a potential role in neuroblastoma therapy. *International Journal of Cancer* **98**: 128-133.
- **Lacasse, E. C., Kandimalla, E. R., Winocur, P., Sullivan, T., Agrawal, S., Gillard, J. W. y Duncan, J.** 2005. Application of IAP antisense to cancer and other proliferative disorders: development of AEG35156/GEM640. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1058**: 215-234.
- **Lacayo, N. J., Marina, N. y Davis, K. L.** 2009. Neuroblastoma. *eMedicine*. Actualización julio 2009.
- **Lamhamedi-Cherradi S-E, Zheng S-J, Maguschak KA, Peschon J, Chen YH.** 2003. Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL^{-/-} mice. *Nat Immunol.* **4**:255–60.
- **Lange, B., Schroeder, U., Huebener, N., Jikai, J., Wenkel, J. y Strandsby, A.** 2003. Rationally designed hydrolytically activated etoposide prodrugs, a novel strategy for the treatment of neuroblastoma. *Cancer Letters* **197**: 225-230.
- **Lasorella, A., Nosedà, M., Beyna, M. y Iavarone, A.** 2000. Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. *Nature* **407**: 592–598.
- **Lavrik, I., Golks, A. y Krammer, P.** 2005. Death receptor signaling. *Journal of Cell Science* **118**: 265-267.
- **Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G. y Earnshaw, W. C.** 1994. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties

like ICE. *Nature* **6495**: 346-347.

- **Lazebnik, Y. A., Takahashi, A., Moir, R. D., Goldman, R. D., Poirier, G. C., Kaufmann, S. H. y Earnshaw, W. C.** 1995. Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**: 9042-9046.
- **Levchenko, A., Metha, B. M., Niu, X., Kang, G., Villafania, L. y Way, D.** 2005. Intercellular transfer of P-glycoprotein mediates acquired multidrug resistance in tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **102**: 1933-1938.
- **Li, F., Ambrosini, G., Chu, E. Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P. C. y Altieri, D. C.** 1998. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* **396**: 580–583.
- **Li, H., Llera, A., Malchiodi, E. L. y Mariuzza, R. A.** 1999. Th estructural basis of T cell activation by superantigens. *Annual Reviews of Immunology* **17**: 435-466.
- **Li, L. Y., Luo, X. y Wang, X.** 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **6842**: 95-99.
- **Li, Z., Jaboin, J., Dennis, P. A. y Thiele, C. J.** 2005. Genetic and pharmacologic identification of Akt as a mediator of brain-derived neurotrophic factor/TrkB rescue of neuroblastoma cells from chemotherapy-induced cell death. *Cancer Research* **65**: 2070–2075
- **Liang, Y., Nylander, K. D., Yan, C. y Schor, N. F.** 2002. Role of caspase-3 dependent bcl-2 cleavage in potentiation of apoptosis by bcl-2. *Molecular Pharmacology* **61**: 142-149.
- **Lindskog, M., Gleissman, H., Ponthan, F., Castro, J., Kogner, P. y Johnsen, J. I.** 2006. Neuroblastoma cell death in response to docosahexanoic acid: Sensitization to chemotherapy and arsenic-induced oxidative stress. *International Journal of Cancer* **118**: 2584-2593.
- **Liston, P., Fong, W. G. y Korneluk, R. G.** 2003. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene* **22**: 8568-8580.
- **Liu, J., Na, S., Glasebrook, A., Fox, N., Solenberg, P.J., Zhang, Q., Song, H. Y. y Yang, D. D.** 2001. Enhanced CD4⁺ T cell proliferation and Th2 cytokine production in DR6-deficient mice. *Immunity*. **15**:23–34.
- **Locksley, R. M., Killeen, N. y Lenardo, M. J.,** 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**: 487-501.
- **Lovat, P. E., Corazzari, M., Goranov, B., Piacentini, M. y Redfern, C. P.** 2004. Molecular mechanisms of fenretinide-induced apoptosis of neuroblastoma cells.

Annals of the New York Academy of Sciences **1028**: 81-89.

- **Lovat, P. E., Oliverio, S., Corazzari, M., Ranalli, M., Pearson, A. D., Melino, G., Piacentini, M. y Redfern C. P.** 2003. Induction of GADD153 and Bak: novel molecular targets of fenretinide-induced apoptosis of neuroblastoma. *Cancer Letters* **197**: 157-163.
- **Lovat, P. E., Oliverio, S., Ranalli, M., Corazzari, M., Rodolfo, C., Bernassola, F., Aughton, K., Macarrone, M., Hewson, Q. D., Pearson, A.D., Melino, G., Piacentini, M. y Redfern, C. P.** 2002. GADD153 and 12-lipoxygenase mediate fenretinide-induced apoptosis of neuroblastoma. *Cancer Research* **62**: 5158-5167.
- **Martinez-Morales, J. R., Henrich, T., Ramialison, M., Widttbrodt, J. y Martinez-Morales, J. R.** 2007. New genes in the evolution of the neural crest differentiation program. *Genome Biology* **8**: R36.
- **Martinou, J. C. y Green, D.** 2001. Breaking the mitochondrial barrier. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**: 63–67.
- **Mashima, T., Naito, M., Fujita, N., Noguchi, K. y Tsutuo, T.** 1995. Identification of actin as a substrate of ICE and an ICE-like protease and involvement of an ICE-like protease but not ICE in VP-16-induced U937 apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **217**: 1185-1192.
- **Matsuo, T. y Thiele, C. J.** 1998. p27Kip1: a key mediator of retinoic acid induced growth arrest in the SMS-KCNR human neuroblastoma cell line. *Oncogene* **16**: 3337-3343.
- **Mattingly, R. R.** 2003. Mitogen-activated protein kinase signaling in drug-resistant neuroblastoma cells. *Methods in Molecular Biology* **218**: 71-83
- **Mattingly, R. R., Milstein, M. L. y Mirkin, B. L.** 2001. Down-regulation of growth factor-stimulated MAP kinase signaling in cytotoxic drug resistant neuroblastoma cells. *Cell Signal* **13**: 499-505.
- **Maurer, B. J., Kalous, O., Yesair, D. W., Wu, X., Janeba, J., Maldonado. V., Klankalyan, V., Frgala, T., Sun, B. C., McKee, R. T., Burgess, S. W., Shaw, W. A. y Reynolds, C. P.** 2007. Improved oral delivery of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide with a novel LYM-X-SORB organized lipid complex. *Clinical Cancer Research* **13**: 3079–86.
- **Maurer, B., Melton, L., Billups, C., Cabot, M. C. y Reynolds, C. P.** 2000. Synergistic cytotoxicity in solid tumor cell lines between N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and modulators of ceramide metabolism. *Journal of the National Cancer Institute* **92**: 1897-1909.
- **Maurer, B., Metelitsa, L., Seeger, R., Cabot, M. y Reynolds, C.** 1999. Increase of

ceramide and induction of mixed apoptosis/necrosis by N-(4-hydroxyphenyl) retinamide in neuroblastoma cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* **91**: 1138-1146.

- **Meier, P.** 2000. Apoptosis in development. *Nature* **407**: 796–801.
- **Mejia, C. y Ruiz-Azuara, L.** 2008. Casiopeinas Ilgly and Illia induce apoptosis in medulloblastoma cells. *Pharmacology and Oncology Research* **14**: 467-472.
- **Mejia, C., Navarro, S., Pellin, A., Ruiz, A., Castel, V. y Llombart-Bosch, A.** 1999. A New Mutation of the p53 Gene in Human Neuroblastoma, Not Correlated with N-myc Amplification. *International Journal of Surgical Pathology* **7**: 149-154
- **Metelitsa, L. S., Gillies, S. D. y Super, M.** 2001. Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by introducing IL-2 to activate NK cells. *Journal of immunology* **167**: 3114-3122.
- **Meyer, N., Kim, S. S. y Penn, L. Z.** 2006. The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis. *Seminars in Cancer Biology* **16**:275–287.
- **Michaelis, M., Cinatl, j., Anand, P., Rothweiler, F., Kotchetkov, R. y Deimling, A.** 2007. Onconase induces caspase-independent cell death in chemoresistant neuroblastoma cells. *Cancer Letters* **250**: 107-116.
- **Michaelis, M., Cinatl, J., Vogel, J. U., Poukova, P., Driever, P. H. y Cinatl, J.** 2001. Treatment of drug-resistant human neuroblastoma cells with cyclodextrin inclusion complexes of aphidicolin. *Anti Cancer Drugs* **12**: 467-473.
- **Micheau, O. Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D. W., Briand, C. y Grutter, M. G.** 2002. The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death –inducing signaling complex. 2002. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 45162-45171
- **Micheau, O. y Tschopp, J.** 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **114**: 181-190.
- **Migone, T. S., Zhang, J., Luo, X., Zhuang, L., Chen, C., Hu, B., Hong, J. S., Perry, J. W., Chen, S. F. y Zhou, J. X.** 2002. TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator. *Immunity* **16**:479–492.
- **Mikkola, M. L, Thesleff, I.** 2003. Ectodysplasin signaling in development. *Cytokine Growth Factor Reviews.* **14**: 211–224.
- **Miller, L. K.** 1999. An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends in Cell Biology* **9**: 323–328.
- **Mirkin, B. L., Clark, S., Zheng, X., Cu, F., White, B. D. y Greene, M.** 2005. Identification of midkine as a mediator for intercellular transfer of drug resistance.

Oncogene **24**: 4965-4974.

- **Mirnics, Z. K., Yang, C., Portugal, C., Kim, T. W., Saragovi, H. U., Sisodia, S. S., Mirnics, K. y Schor, N. F.** 2005. P75 neurotrophin receptor regulates expression of neural cell adhesion molecule 1. *Neurobiology of Disease* **20**: 969-985.
- **Morlon A, Munnich A, Smahi A.** 2005. TAB2, TRAF6 and TAK1 are involved in NF-kappaB activation induced by the TNF-receptor, Edar and its adaptator Edaradd. *Human Molecular Genetics*. **14**: 3751–3757.
- **Mukherjee, B., Morgenbesser, S. D. y DePinho, R. A.** 1992. Myc family oncoproteins function through a common pathway to transform normal cells in culture: cross-interference by Max and trans-acting dominant mutants. *Genes and Development* **6**: 1480–1492.
- **Murahashi, H., Azuma, H., Zamzami, N., Furuya, K. J., Ikebuchi, K. y Yamaguchi, M.** 2003. Possible contribution of apoptosis-inducing factor (AIF) and reactive oxygen species (ROS) to UVB-induced-caspase-independent cell death in the T cell line Jurkat. *Journal of Leukocyte Biology* **73**: 399-406.
- **Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S. y Dixit, V. M.** 1998. An Induced Proximity Model for Caspase-8 Activation. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 29-26.
- **Nachmias, B., Ashhab, Y. y Ben-Yehuda, D.** 2004. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Seminars in Cancer Biology* **14**: 231-243.
- **Nagata, S.** Apoptosis by death factor. 1997. *Cell* **88**:355–365.
- **Nakamura, K., Tanaka, Y. y Shitara, K.** 2001. **Construction of humanized anti-ganglioside monoclonal antibodies with potent immune effector functions.** *Cancer Immunology and Immunotherapy* **50**: 275-284.
- **Nakamura, M., Matsuo, T., Stauffer, J., Neckers, L., Thiele, C. J.** 2003. Retinoic acid decreases tarheting of p27 for degradation via an N-myc-dependent decrease in p27 phosphorylation an an N.myc-independent decrease Skp2. *Cell Death and Differentiation* **10**: 230-239.
- **Nicholson, D. W.** 2000. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* **407**: 810–816.
- **Nikolovska-Coleska, Z., Meagher, J. L., Jiang, S., Kawamoto, S. A., Gao, W., Yi, H., Quin, D., Roller, P. P., Stuckey, J. A. y Wang, S.** 2008. Design and characterization of bivalent Smac-based peptides as antagonists of XIAP and development and validation of a fluorescence polarization assay for XIAP containing both BIR2 and BIR3 domains. *Analytical Biochemistry* **374**: 87-98.

- **Norris, M. D., Smith, J. Tanabe, K., Tobin, P., Flemming, C., y Scheffer, G. L.** 2005. Expression of multidrug transporter MRP4/ABCC4 is a marker of poor prognosis in neuroblastoma and confers resistance to irinotecan in vitro. *Molecular Cancer Therapeutics* **4**: 547-553.
- **Nuchtern, J. G., Russell, H. V. y Shohet, J. M.** 2005. Neuroblastoma. Adrenal glands. Springer Berlin Heidelberg. 211-222.
- **Obexer, P., Hagenbuchner, J., Unterkircher, T., Sachsenmaier, N., Seifarth, C., Böck, G., Porto, V., Geiger, K. y Ausserlechner, M.** 2009. Repression of BIRC5/Survivin by FOXO3/FKHRL1 Sensitizes Human Neuroblastoma Cells to DNA Damage-induced Apoptosis. *Molecular Biology of the Cell* **1 20**: 2041–2048.
- **Ohnuma-Ishikawa, K., Morio, T., Yamada, T., Sugawara, y., Ono, M. y Nagasawa, M.** 2007. Knockdown of XAB2 enhances all-trans retinoic acid-induced cellular differentiation in all-trans retinoic acid-sensitive and –resistant cancer cells. *Cancer Research* **67**: 1019-1029.
- **Ollert, M. W., David, K. y Schmitt, C.** 1996. Normal human serum contains a natural IgM antibody cytotoxic for human neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**: 4498-4503.
- **Osenga, K. L., Hank, J. A., Albertini, M. r., Gan, J., Sternberg, A. G. y Eikhoff, J.** 2006. A phase I clinical trial of the hu 14.18-IL2 (EMD 273063) as a treatment for children with refractory or recurrent neuroblastoma and melanoma: a study of the children’s oncology group. *Clinical Cancer Research* **12**: 1750-1759.
- **Oue, T., Inoue, M., Yoneda, A., Kubota, A., Okuyama, H., Kawahara, H., Nishikawa, M., Nakayama, M. y Kawa, K.** 2004. Profile of neuroblastoma detected by mass screening, resected after observation without treatment: results of the wait and see pilot study. *Journal of Pediatric Surgery* **40**: 359–363.
- **Paffhausen, T., Schwab, M. y Westermann, F.** 2007. Targeted MYCN expression affects cytotoxic potential of chemotherapeutic drugs in neuroblastoma cells. *Cancer Letters* **250**: 17-24.
- **Pan, G., Bauer, V., Haridas, S., Wang, D., Liu, G., Yu, C., Vincenz, B. B., Aggarwal, J. y Dixit, V. M.** 1998. Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS*. **431**: 351–356.
- **Papadakis, K. A., Prehn, J. L, Landers, C., Han, Q., Luo, X., Cha, S. C., Wei, P., Targan, S. R.** 2004. TL1A synergizes with IL-12 and IL-18 to enhance IFN-gamma production in human T cells and NK cells. *Journal of Immunology*.**172**:7002–7007.
- **Park, D. M. y Rich, J. N.** 2009. Biology of glioma cancer stem cells. *Molecules and cells* **28**: 7-12.

- **Parkin, D. M., Kramárová, E., Draper, G. J., Masuyer, E., Michaelis, J., Neglia, J., Qureshi, S. y Stiller, C.** 1998. International incidence of childhood cancer. IARC Scientific Publications. **2**:366
- **Passoni, L., Scardino, A. y Bertazzoli, C.** 2002. ALK as a novel lymphoma-associated tumor antigen: identification of 2HLA-2.1-restricted CD8+ T cell epitopes. **Blood** **99**: 2100-2106.
- **Patel, J. H., Loboda, A. P., Showe, M. K., Showe, L. C. y McMahon, S. B.** 2004. Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC. *Nature Reviews Cancer* **4**: 562–568.
- **Pertl, U., Wodrich, H. y Ruehlmann, J. M.** 2003. Immunotherapy with a posttranscriptionally modified DNA vaccine induces complete protection against metastatic neuroblastoma. *Blood* **101**: 649-654.
- **Peter, M. E. y Krammer, P. H.** 2003. The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death and Differentiation* **10**: 26-35.
- **Peter, M. E., Budd, R. C., Desbarats, J., Hedrick, S. M., Hueber, A. O., Newell, M. K., Owen, L. B., Pope, R. M., Tschopp, J. y Wajant, H.** 2007. The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell* **128**: 129–447.
- **Petterson, H. M., Karlsson, J., Pietras, A., Ora, I. y Pahlman, S.** 2007. Arsenic trioxide and neuroblastoma cytotoxicity. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **39**: 35-41.
- **Peverali, F. A.,** 1996. Retinoic acid-induced growth arrest and differentiation of neuroblastoma cells are counteracted by N-myc and enhanced by max overexpressions. *Oncogene* **12**: 457-462.
- **Philchenkov, A.** 2004. Caspases: potential targets for regulating cell death. *Journal of cellular and molecular medicine* **8**: 432-444.
- **Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A. y Ashkenazi, A.** 1996. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 12687-90.
- **Pola, S., Cattaneo, M. G., Vicentini, I. M.** 2003. Anti-migratory and anti-invasive effect of somatostatin in human neuroblastoma cells: involvement of Rac and MAP kinase activity. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 40601-40606.
- **Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W. y Vogelstein, B.** 1997. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389**: 300–305.
- **Ponzoni, M., Bocca, P., Chiesa, V., Decensi, A., Pistoia, V., Raffaghello, L., Rozzo, C. y Montaldo, P. G.** 1995. Differential effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and retinoic acid on neuroblastoma cells. Apoptosis versus differentiation. *Cancer*

Research **55**: 853–61.

- **Qiu, Y. Y., Mirkin, B. L. y Dwivedi, R. S.** 2005. Inhibition of DNA methyltransferase reverses cisplatin induced drug resistance in murine neuroblastoma cells. *Cancer Detection and Prevention* **29**: 456-463.
- **Rathmell, J. C., Townsend, S. E., Xu, J.C., Flavell, R. A. y Goodnow. C. C.** 1996. Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell* **87**: 319–329.
- **Rebbaa, A., Chou, P. M. y Mirkin, B. L.** 2001. Factors secreted by human neuroblastoma mediated doxorubicin resistance by activating STAT3 and inhibiting apoptosis. *Molecular Medicine* **7**: 393-400.
- **Reed, J. C.** 1999. Dysregulation of apoptosis in cancer. *Journal of Clinical Oncology* **17**: 2941–2953.
- **Reed, J.C.** 1994. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *Journal of Cell Biology*. **124**: 1-6.
- **Reynolds, C. P. y Lemons, R. S.** 2001. Retinoid therapy of childhood cancer. *Hematology/Oncology Clinics of North America* **15**: 867-910.
- **Reynolds, C. P., Maurer, B. J. y Kolsenick, R.** 2004. Ceramide synthesis and metabolism as a target of cancer chemotherapy. *Cancer Letters* **206**: 169-180.
- **Reynolds, C. P., Wang, Y., Melton, L. J., Einhorn, P. A., Slamon, D. J. y Maurer, B. J.** 2000. Retinoic-acid-resistant neuroblastoma cell lines show altered *MYC* regulation and high sensitivity to fenretinide. *Medical and Pediatric Oncology* **35**:597–602.
- **Ribatti, D.** 2001. Inhibition of neuroblastoma-induced angiogenesis by fenretinide. *International Journal of Cancer* **94**: 314-321.
- **Rogers, D., Nylander, K. D., Mi, Z., Hu, T. y Schor, N. F.** 2002. Molecular predictors of human nervous system cancer responsiveness to enediyne chemotherapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **62**: 699-706.
- **Rothenberg, A. B., Berdon, E. E., D'Angio, G. J., Yamashiro, D. J. y Cowles, R. A.** 2009. *Pediatric Radiology* **39**: 723-726.
- **Ruiz-Ramírez, L., De La Rosa, M. E., Gracia-Mora, I., Mendoza, A., Pérez, G. y Ferrer-Sueta, G.** 1995. Casiopeinas, metal-based drugs a new class of antineoplastic and genotoxic compounds. *Journal of Inorganic Biochemistry* **207**: 2–3.
- **Ruiz-Ramírez, L., Gracia-Mora, I., De La Rosa, M. E., Sumano, H., Gómez, C., Pimentel. E.** 1993. Cytostatic, mutagenic, antineoplastic activities and preliminary toxicity of copper (II) drugs: casiopeinas I, II, III. *Journal of Inorganic Biochemistry*

406: 1–2.

- **Russel, J. y Ling, C. C.** 2003. Studies with cytotoxic agents suggest that apoptosis is not a major determinant of clonogenic death in neuroblastoma cells. *European Journal of Cancer* **39**: 2234-2238.
- **Ryan, K. M., Phillips, A. C. y Vousden, K. H.** 2001. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Current Opinion in Cell Biology* **13**: 332–337.
- **Sakahira, H., Enari, M. y Nagata, S.** 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**: 96-99.
- **Sarkar, A. K. y Nuchtern, J. G.** 2000. Lysis of MYCN-amplified neuroblastoma cells by MYCN peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Research* **60**: 1908-1913.
- **Sauer, H., Wartenberg, M. y Hescheler, J.** 2001. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiology and Biochemistry* **11**: 173-186.
- **Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Korsmeyer, S. J., Wei, M. C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K. J. y Schlesinger, P. H.** 1998. Proapoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death and Differentiation* **7**: 1166-1173.
- **Schilbach, K. E., Geiselhart, A. y Wessels, J. T.** 2000. Human gammadelta T lymphocytes exert natural and IL-2 induced cytotoxicity to neuroblastoma cells. *Journal of immunotherapy* **23**: 536-548.
- **Schmidt, C. S., Liu, J., Zhang, T., Song, H. y., Sandusky, G., Mintze, K., Benschop, R. J., Glasebrook, A., Yang, D. D. y Na, S.** 2003. Enhanced B cell expansion, survival and humoral responses by targeting death receptor 6. *Journal of Experimental Medicine* **197**: 51-62.
- **Schönmann, S. M., Iyer, J., Laeng, H., Gerber, H. a., Käser, H y Blaser, K.** 1986. Production and characterization of monoclonal antibodies against human neuroblastoma. *International Journal of Cancer* **37**: 255-262.
- **Schor, N. F.** 2002. *Neurology of neuroblastoma: Neuroblastoma as a neurobiological disease.* Boston. Kluwer Academic Publishers.
- **Schor, N. F.** 2009. Novel approaches to pharmacotherapy of tumors of the nervous system during childhood and adolescence. 2009. *Pharmacology and Therapeutics* **122**: 44-55.
- **Schott, A. F., Apel, I. J., Nuñez. G. y Clarke, M. F.** 1995. Bcl-xL protects cancer cells from p53-mediated apoptosis. *Oncogene* **11**: 1389-1394.

- Schwab, M., Varmus, H. E., Bishop, J. M., Grzeschik, K. H., Naylor, S. L., Sakaguchi, A. Y., Brodeur, G. y Trent, J. 1984. Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature* **308**:288–291.
- Screaton, G. R., Xu, X. N., Olsen, A. L., Cowper, A. E., Tan, R., McMichael, A. J. y Bell, J. I. 1997. LARD: a new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **94**: 4615–4619.
- Sedger, L. M., Shows, D. M., Blanton, R. A., Peschon, J. J., Goodwin, R. G., Cosman, D. y Wiley, S. R. 1999. IFN- γ mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *Journal of Immunology* **163**:920–6.
- Sedlak, T. W., Oltvai, Z. N., Yang, E., Wang, K., Boise, L. H., Thompson, C. B. y Korsmeyer, S. J. 1995. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**: 7834-7838.
- Seeger, R. C, Brodeur, G. M., Sather, H., Dalton, A., Siegel, S. E., Wong, K. Y. y Hammond, D. 1985. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *New England Journal of Medicine* **313**: 1111–1116.
- Servidei, T., Ferlini, C., Riccardi, A., Meco, D., Scambia, G. y Segni, G. 2001. The novel trinuclear platinum complex BBR3463 induces a celular response different from cisplatin. *European Journal of Cancer* **37**: 930-938.
- Shailaja, K. y Tseng, B. 2003. Why target apoptosis in cancer treatment? *Molecular Cancer Therapeutics* **2**: 573-580.
- Shakya, R., Peng, F., Liu, J., Heeg, M. J. y Verani, C. N. 2006. Synthesis structure and anticancer activity of gallium(III) complexes with asymmetric tridentate ligands: drug inhibition and apoptotic induction of cisplatin-resistant neuroblastoma cells. *Inorganic Chemistry* **45**: 6263-6268.
- Shen, J. H., Zhang, Y., Wu, N. h. y Shen, Y. F. 2007. Resistance to geldanamycin-induced apoptosis in differentiated neuroblastoma SH-SY5Y cell. *Neuroscience Letters* **414**: 110-114.
- Shen, W. y Ladisch, S. 2002. Ganglioside GD1a impedes lipopolysaccharide-induced maturation of human dendritic cells. *Cell Immunology* **220**: 125-133.
- Shimada, H., Ambros, I. M., Dehner, L. P., Hata, J-i., Joshi, V. V. y Roald B. 1999. Terminology and morphologic criteria of neuroblastoma tumors. *Cancer* **83**: 349-363.
- Shimada, H., Chatten, J., Newton, W. A., Sachs, N., Hamoudi, A. B.y Chiba, T.

1984. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *Journal of the National Cancer Institute* **73**: 405–416.

- **Shiozaki, E. N. y Shi, Y.** 2004. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms for structural biology. *Trends in biochemical sciences* **29**: 486-494.
- **Shurin, G. V., Shurin, M. R. y Bikovskaia S.** 2001. Neuroblastoma-derived gangliosides inhibit dendritic cell generation and function. *Cancer Research* **61**: 363-369.
- **Siddik, Z. H.** 2003. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **22**: 7265-7279.
- **Siegel, R. M., Frederiksen, J. K., Zacharias, D. A., Chan, F. K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R. Y. y Lenardo, M. J.** 2000. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* **288**: 2354-2357.
- **Sietsma, H., Dijkhuis, A. J., Kamps, W. y Kok, J. W.** 2002. Sphingolipids in neuroblastoma: Their role in drug resistance mechanisms. *Neurochemical Research* **27**: 665-674.
- **Siro, S., Minoru, T., Kazuo, U. y Masaya, I.** 1998. Requirement of caspase-3 (-like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 26900–26907.
- **Smyth, M.J., Takeda, K., Hayakawa, Y., Peschon, J. J., van den Brink, M. R. y Yagita, H.** 2003. Nature's TRAIL – on a path to cancer immunotherapy. *Immunity* **18**:1–6.
- **Soling, A., Schurr, P. y Berthold, F.** 1999. Expression and clinical relevance of NY-ESO-1, MAGE-1 and MAGE-3 in neuroblastoma. *Anticancer Research* **19**: 2205-2209.
- **Song, Z. y Steller, H.** 1999. Death by design: mechanism and control of apoptosis. *Trends in Cell Biology* **9**:49–52.
- **Sprick, M., Rieser, E., Stahl, H., Grosse-Wilde, A., Weigand, M. y Walczak, H.** 2002. Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but cannot functionally substitute caspase-8. *EMBO Journal* **21**: 4520-4530.
- **Srinivasula, S. M., Datta, P., Fan, X. J., Fernandes-Alnemri, T., Huang, Z. y Alnemri, E. S.** 2000. Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *Journal of Biological Chemistry*. **275**: 36152-36157.

- **Srinivasula, S.M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R. A., Robbins, P.D., Fernandes-Alnemri, T. y Shi Y.** 2001. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* **410**: 112–116.
- **Stiller, C. A. y Parkin, D. M.** 1992. International variations in the incidence of neuroblastoma. *International Journal of Cancer* **52**: 538-543.
- **Stupack, D. G., Teitz, T., Potter, M. D., Mikolon, D., Houghton, P. J., Kidd, V. J., Lahti, J. M. y Cheresch, D. A.** 2006. Potentiation of neuroblastoma metastasis by loss of caspase-8. *Nature Letters* **439**: 95–9.
- **Su, A. I., Wiltshire, T., Batalov, S., Lapp, H., Ching, K. A., Block, D., Zhang, J., Soden, R., Hayakawa, M. y Kreiman, G.** 2004. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 6062–6067.
- **Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M. y Kroemer, G.** 1999. Molecular characterisation of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **6718**: 387-389.
- **Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K. y Takahashi, R.** 2001. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Molecular Cell* **8**: 613-621.
- **Svensson, K. y Larsson, C.** 2003. A protein kinase cbeta inhibitor attenuates multidrug resistance of neuroblastoma cells. *BMC Cancer* **3**: 10.
- **Swettenham, E., Witting, P. K., Salvatore, B. A. y Neuzil, J.** 2005. Alpha-tocopheryl succinate selectively induces apoptosis in neuroblastoma cells: potential therapy of malignancies of the nervous system? *Journal of Neurochemistry*: **94**: 1448-1456.
- **Tada-Oikawa, S., Hiraku, Y., Kawanishi, M. y Kawanishi S.** 2003. Mechanism for generation of hydrogen peroxide and change of mitochondrial membrane potential during rotenone-induced apoptosis. *Life Sciences* **73**: 3277-3288.
- **Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, C. I., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Suda, T. y Nagata, S.** 1994. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the fas ligand. *Cell*, **76**: 969
- **Takamizawa, S., Okamoto, S. y Wen, J.** 2000. Overexpression of Fas-ligand by neuroblastoma: a novel mechanism of tumor-cell killing. *Journal of Pediatric Surgery* **35**: 375-379.
- **Tanaka, M., Itai, T, Adachi, M. y Nagata, S.** 1998. Downregulation of Fas ligand by

shedding. *Nature Medicine* **4**: 31–36.

- **Teitz, T., Lahti, J. M. y Kidd, V. J.** 2001. Aggressive childhood neuroblastomas do not express caspase-8: an important component of programmed cell death. *Journal of Molecular Medicine* **79**: 428-436.
- **Teitz, T., Stupack, D. G. y Lahti, J. M.** 2006. Halting neuroblastoma metastasis by controlling integrin-mediated death. *Cell Cycle* **7**: 681–5.
- **Teitz, T., Wei, T., Valentine, M. B.** 2000. Caspase-8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nature Medicine* **6**: 529–35.
- **Tewari, M. y Dixit, V. M.** 1995. Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus cmA gene product. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 3255-3260.
- **Thiele, C. J. e Israel, L. A.** 1988. Regulation of N.myc expression is a critical event controlling the ability of human neuroblasts to differentiate. *Experimental Cell Biology* **56**: 321-333.
- **Thiele, C. J., Reynolds, C. P. e Israel, M. A.** 2005. Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature* **313**: 404-406.
- **Thomas, W. D. y Hersey, P.** 1998. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells. *Journal of Immunology* **161**: 2195–200.
- **Thompson, C. B.** 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**: 1456-1462.
- **Trauth, B. C., Clas, C., Peters, A. M., Matzku, S., Möller, P., Falk, W., Debatin, K. M. y Kramer, P. H.** 1989. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* **245**: 301-305.
- **Trejo-Solís, C., Palencia, G., Zúñiga, S., Rodríguez-Ropon, A., Osorio-Rico, L., Sanchez Torres, L. y Gracia-Mora, I.** 2005. Cas IIgly Induces Apoptosis in Glioma C6 Cells *In Vitro* and *In Vivo* through Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms. *Neoplasia* **7**: 563-574.
- **Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Carta, G., Quinn, P. J., Svhor, N. F. y Kagan, V. E.** 1997. Direct evidence for antioxidant of bcl-2 in PC12 in rat pheochromocytoma cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **344**: 413-423.
- **Umansky, S.** 1982. The genetic program of cell death. Hypothesis and some applications: transformation, carcinogenesis, ageing. *Journal of Theoretical Biology* **97**: 591–602.

- **Urbani, A., Poland, J., Bernardini, S., Bellincampi, L., Biroccio, A. y Schnolzer, M.** 2005. A proteomic investigation into etoposide chemo-resistance of neuroblastoma cell lines. *Proteomics* **5**: 796-804.
- **Van Loo, G., Saelens, X., Van Gorp, M., MacFarlane, M., Martin, S. J. y Vandenabeele, P.** 2002. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death and Differentiation* **9**: 1031–1042.
- **Van Loo, G., Schotte, P., van Gorp, M., Demol, H., Hoorelbeke, B., Gevaert, K., Rodriguez, I., Ruiz-Carillo, A., Vandekerckhove, J., Declercq, W., Beyaert, R. y Vandenabeele, P.** 2001. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death and Differentiation* **8**: 1136-1142.
- **Van Roy, N., De Preter, K., Hoebeek, J., Van Maerken, T., Pattyn, F., Mestdagh, T., Vermeulen, J., Vandesompele, J. y Speleman, F.** 2009. The emerging molecular pathogenesis of neuroblastoma: implications for improved risk assesment and targeted therapy. *Genome Medicine* **1**: 74.
- **Varfolomeev, E. E. y Ashkenazi, A.** 2004. Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell* **116**: 491-497.
- **Vaux, D. L.** 1998. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and .cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**: 440–442.
- **Vaux, D. L. y Korsmeyer, J.** 1999. Cell death in development. *Cell* **96**: 245–254.
- **Verhagen, A. M., Coulson, E. J. y Vaux, D. L.** 2001. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRs. *Genome Biology* **2**: 3009-3010.
- **Villani, M. G., Appierto, V., Cavadini, E., Bettiga, A., Prinetti, A. y Clagett-Dame, M.** 2006. 4-oxo-fenretinide, a recently identified fenretinide metabolite, induces marked G-2M cell cycle arrest and apoptosis in fenretinide-sensitive and fenretinide-resistant cell lines. *Cancer Research* **66**: 3238-3247.
- **Vogan, K., Bernstein, M, Leclerc, J. M., Brisson, L., Brossard, J. Brodeur, G. M., Pelletier, J. y Gros, P.** 1993. Absence of p53 gene mutations in primary neuroblastomas. *Cancer Research* **53**: 5269-5273.
- **Vousden, K. H., Lu, X.** 2002. Live or let die: the cell’s response to p53. *Nature Reviews Cancer* **2**: 594–604.
- **Wajant, H.** 2003. Death receptors. *Essays in Biochemistry* **39**, 53-71.
- **Weiss, W. A., Aldape, K., Mohapatra, G., Feuerstein, B. G. y Bishop, J. M.** 1997. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *EMBO Journal* **16**: 2985–2995.
- **Wen, L., Zhuang, L., Luo, X. y Wei, P.** 2003. TL1A-induced NF-kappaB activation

and c-IAP2 production prevent DR3-mediated apoptosis in TF-1 cells. *The Journal of Biological Chemistry* **278**:39251–39258.

- **Wenzel, A., Cziepluch, C., Schurmann, J. y Schwab, M.** 1994. The N-myc oncoprotein is a transcriptional activator and associates with max and RB1 proteins. *Progress in Clinical Biological Research* **385**: 59–66.
- **Westermann, F. y Schwab, M.** 2002. Genetic parameters of neuroblastomas. *Cancer Letters*. **184**: 127–147.
- **Wiley, S.R., Schooley, K. y Smolak, P. J.** 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* **3**: 673-82.
- **Willis, S., Day, C. L., Hinds, M. G. y Huang, D. C.** 2003. The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. *Journal of Cell Science* **116**: 4053-4056.
- **Wolf, B .B. y Green, D. R.** 1999. Cell death by caspase family proteinases. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 20049-20052.
- **Wright, C. W. y Duckett, C. S.** 2005. Reawakening the cellular death program in neoplasia through the therapeutic blockade of IAP function. *Journal of Clinical Investigation* **115**: 2673-2678.
- **Wu, G., Chai, J., Suber, T.L., Wu, J.W., Du, C., Wang, X. y Shi, Y.** 2000. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* **408**:1008–1012.
- **Wyllie, A. H., Kerr, J. F. y Currie, A. R.** 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology* **68**: 251-306.
- **Xue, C., Haber, M., Flemming, C., Marshall, G. M., Lock, R. B. y MacKenzie, K. L.** 2007. P53 determines multidrug sensitivity of childhood neuroblastoma. *Cancer Research* **67**: 10351-10360.
- **Yan, M., Wang, L. C., Hymowitz, S. G., Schilbach, S., Lee, J., Goddard, A., de Vos A. M., Gao, W. Q. y Dixit, V. M.** 2000. Two-amino acid molecular switch in an epithelial morphogen that regulates binding to two distinct receptors. *Science* **290**: 523–527.
- **Yang, E. y Korsmeyer, S.J.** 1996. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood*. **88**: 386 - 401.
- **Yang, J. C., Cortopassi, G. A.** 1998. Induction of the mitochondrial permeability transition causes release of the apoptogenic factor cytochrome c. *Free Radical Biology and Medicine* **24**: 624-631.
- **Yang, Q. H. y Du, C.** 2004. Smac/DIABLO selectively reduces the levels of c-IAP1 and c-IAP2 but not that of XIAP and livin in HELA cells. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 16963-16970.
- **Yang, X., Merchant, M. S., Romero, M. E., Tsokos, M., Wexler, L. H., Kontny, U.,**

- Mackall, C. L. y Thiele, C. J.** 2003. Induction of caspase 8 by interferon gamma renders some neuroblastoma (NB) cells sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) but reveals that a lack of membrane TR1/TR2 also contributes to TRAIL resistance in NB. *Cancer Research* **63**: 1122–9.
- **Yoshida, H., Tanabe, M. y Miyauchi, M.** 1999. Induced immunity by expression of interleukin-2 or GM-CSF gene in murine neuroblastoma cells can generate antitumor response to established tumors. *Cancer Gene Therapy* **6**: 395-401.
 - **Zhang, C., Beckermann, B., Kallifatidis, G., Liu, Z., Rittgen, W. y Edler, L.** 2006. Corticosteroids induce chemotherapy resistance in the majority of tumor cells from bone, brain, breast, cervix, melanoma and neuroblastoma. *International Journal of Oncology*. **29**: 1295-1301.
 - **Zhao, H., M. Yan, H. Wang, S. Erickson, I.S. Grewal, and V.M. Dixit.** 2001. Impaired c-Jun amino terminal kinase activity and T cell differentiation in death receptor 6–deficient mice. *Journal of Experimental Medicine* **194**:1441–1448.
 - **Zheng, X., Chou, P. M., Mirkin, B. L. y Rebbaa, A.** 2004. Senescence-initiated reversal of drug resistance: specific role of cathepsin L. *Cancer Research* **64**: 1773-1780.
 - **Zindy, F., Knoepfler, P. S., Xie, S., Sherr, C. J., Eisenman, R. N. y Roussel, M. F.** 2006. N-Myc and the cyclin-dependent kinase inhibitors p18Ink4c and p27Kip1 coordinately regulate cerebellar development. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **103**: 11579–11583.