



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACIÓN *in vitro* DE APOPTOSIS Y AUTOFAGIA EN LA LÍNEA  
CELULAR CHP-212 DE NEUROBLASTOMA BAJO TRATAMIENTO  
CON CASIOPEÍNAS®

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

**ADRIANA VÁZQUEZ AGUIRRE**

ASESORES:

MVZ. HÉCTOR SALVADOR SUMANO LÓPEZ  
DRA. MARÍA DEL CARMEN MEJÍA VÁZQUEZ  
DRA. LENA RUIZ AZUARA



MÉXICO, D. F.

2015



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.

## AGRADECIMIENTOS

Ahora estamos aquí...

A mi familia, tengo todo y no tengo nada que decir... mamá, papá, neki, minkys...

**Gracias familia Guzzi... Chuuu ... Fighting???**

Neki me divertí mucho, cuantos recuerdos tengo, no hay mejor esquema de trabajo-relajación que el que teníamos, cubría todos los aspectos. Lo que es bien cierto es que definitivamente sin ti no hubiera logrado esto, sabes que desde que recuerdo te admiro y te quiero siempre. Papá y mamá, muchas gracias por su apoyo y su respeto. **Minkys** (Ahi y Tai)... gracias. **Momen**, te extraño, algún día nos veremos de nuevo.

**Obesito, Mitzi, Marco**, mis amigos de siempre, gracias.

Gracias a la **FMYZ-UNAM**, por proveerme de conocimiento, retarme constantemente y por permitir mi desarrollo en múltiples aspectos profesionales y personales.

**Dra. Carmen Mejía**, muchas gracias por creer en mí y confiarme este proyecto, aprendí mucho; gracias por su apoyo en todo momento. **Dra. Lena Ruíz**, gracias por su confianza, apoyo y guía. Es un orgullo poder trabajar con ustedes.

**Laboratorio A-119**, porque el lugar donde trabajas no solo contribuye a la formación profesional, también a la personal, gracias a todos. Gracias **Gonzalo Acero** por siempre tomarte el tiempo para explicarnos, ayudarnos, etc, eres una gran persona no cabe duda. **Anlly**, que te puedo decir, día 1 y hasta la fecha... muchas gracias por tu apoyo, enseñanza (mis WB no serían lo mismo sin ti), tiempo (incontables horas revelando placas), tenemos mil anécdotas increíbles que no cambio por nada, pero sobre todo gracias por tu gran amistad. **Luis**, mon ami, gracias por tu amistad, por todo tu

apoyo, por tus consejos, anécdotas, eres un gran amigo, definitivamente. Anlly, Luis, Rafa, horas platicando y pasándola genial, terapias, consejos, bullying, mil bromas, etc. Rox, ya sabes..., que alegría poder contar con tu amistad, con tu confianza, gracias por todo; vayamos por panecitos???? Rafa, por animar con tus canciones, por tu amistad. Jessi y Dulce, gracias por su amistad, platicar con ustedes siempre fue un gusto. **AMIGOS!!!!** Que gran grupo formamos, que orgullo, hicimos de todo, videojuegos, películas, hasta nos convertimos en actores, bailarines, cantantes...

Paty muchas gracias por todo tu apoyo en el laboratorio, sin duda, fue de gran ayuda.

A la **SQM**, gracias por recibirme excelentemente desde el primer día. **Mtra. Olivia Sparza**, muchas gracias por toda la confianza que me ha brindado, por creer en mí, por todo su apoyo. **Dra. Lena**, muchas gracias por confiar en mí al desempeñar mis labores, gracias por su apoyo. **Daff** (Hey you??), **Liz** (por un cielo sin logística), **Mau** (por un último corneo que dura 3 horas), muchas gracias por todo amigos, por su confianza, apoyo y amistad. A todos muchas gracias porque no podría pedir mejores compañeros de trabajo, gracias por crear un excelente ambiente en todo momento.

**Angela**, muchas gracias por ser una gran amiga, por todo tu apoyo, confianza, por toda tu ayuda, por ofrecerme tu casa.

**Familia, amigos, todos**, muchas gracias, sigamos haciendo recuerdos, es un placer conocerlos.

Vaya que suerte, algo grande habré hecho en mi otra vida...

**GRACIAS a DIOS!!!!**

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN .....	01
I. INTRODUCCIÓN .....	02
II. ANTECEDENTES .....	04
1. EL NEUROBLASTOMA.....	04
1.1. EL NEUROBLASTOMA EN MEDICINA HUMANA.....	04
1.2. EL NEUROBLASTOMA EN MEDICINA VETERINARIA.....	10
2. TRATAMIENTOS ANTINEOPLÁSICOS.....	12
2.1. CASIOPEÍNAS® .....	13
3. MUERTE CELULAR PROGRAMADA.....	15
3.1. APOPTOSIS.....	16
3.2. AUTOFAGIA.....	19
4. REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR.....	24
5. JUSTIFICACIÓN.....	28
6. HIPÓTESIS.....	29
7. OBJETIVO GENERAL.....	29
7.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
III. MATERIAL Y MÉTODOS .....	31
1. CULTIVO CELULAR.....	31
2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE TRABAJO.....	32
3. PREPARACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS.....	33

4. ADMINISTRACIÓN DE TRATAMIENTOS E INCUBACIÓN.....	34
5. FRACCIONAMIENTO CELULAR.....	34
6. CUANTIFICACIÓN PROTÉICA.....	35
7. WESTERN BLOT.....	35
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	38
IV. RESULTADOS .....	39
1. EVALUACIÓN DE APOPTOSIS.....	39
2. EVALUACIÓN DE AUTOFAGIA.....	51
3. EVALUACIÓN DE SOBREVIVENCIA/PROLIFERACIÓN CELULAR.....	59
V. DISCUSIÓN .....	63
VI. CONCLUSIONES .....	67
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
ABREVIATURAS.....	82

## RESUMEN

**VÁZQUEZ AGUIRRE ADRIANA.** EVALUACIÓN *in vitro* DE APOPTOSIS Y AUTOFAGIA EN LA LÍNEA CELULAR CHP-212 DE NEUROBLASTOMA BAJO TRATAMIENTO CON CASIOPEÍNAS<sup>®</sup>. (Bajo la dirección de: MVZ Héctor Salvador Sumano López, Dra. María del Carmen Mejía Vázquez, Dra. Lena Ruiz Azuara)

El neuroblastoma (NB) es un tipo de cáncer infantil que suele diagnosticarse de manera tardía; lo que complica la elección de un tratamiento, compromete su efectividad y empobrece el pronóstico de los pacientes. Las Casiopeínas<sup>®</sup> (Cas) son una familia de compuestos con centro activo de Cobre(II) que han demostrado actividad antiproliferativa, citotóxica, citostática y genotóxica con un bajo índice de efectos colaterales sobre el paciente, en comparación con tratamientos tradicionales de diversas neoplasias. Mediante la técnica de Western blot se determinó el momento en el que se presentan los procesos de apoptosis, autofagia y sobrevivencia/proliferación, en cultivos de la línea celular de neuroblastoma CHP-212 tratada con 3 diferentes Casiopeínas<sup>®</sup> (IIgly, IIIEa y IIIia) y Cisplatino<sup>®</sup> como control de muerte celular. Se demostró que a las 2 h de postratamiento, únicamente las Casiopeínas<sup>®</sup> IIgly y IIIEa promueven muerte celular por apoptosis (vía intrínseca), mientras que las Casiopeínas<sup>®</sup> IIIEa y IIIia promueven la autofagia celular. A las 10 h postratamiento ninguna Cas promueve apoptosis, mientras que las tres Cas promueven la autofagia. Finalmente, los resultados obtenidos para demostrar el proceso de sobrevivencia/proliferación no fueron concluyentes.

## I. INTRODUCCIÓN

El neuroblastoma (NB) es una neoplasia que se origina de las células de la cresta neural y que migra a lo largo del sistema nervioso simpático (SNS), estableciéndose frecuentemente en las glándulas adrenales.<sup>1,2</sup> Esta neoplasia se presenta durante la infancia y representa el 15% de la mortalidad por cáncer en niños.<sup>1,2,3,4,5</sup> El comportamiento del NB es muy heterogéneo y va desde un rápido crecimiento, hasta la regresión espontánea. Se ha propuesto que este último evento se debe al fenómeno de apoptosis.<sup>1,4,5,6,7</sup>

Tradicionalmente, los tratamientos contra el cáncer se han centrado en la terapia citotóxica mediante el intento de inducir apoptosis. Sin embargo, el cáncer puede mostrar resistencia a la apoptosis promoviendo mutaciones que lleven a la sobrevivencia a través de la *autofagia*. Lo anterior marca importantes blancos para el desarrollo de nuevas terapias antineoplásicas, como la habilidad de inducir múltiples caminos de muerte celular y así superar aquellas capacidades de mutagénesis que presentan las células malignas. Idealmente, los agentes quimioterapéuticos deberían tener como único blanco a las células neoplásicas mediante un efecto citotóxico y/o citostático con mínimos efectos colaterales en las células normales. Sin embargo, los efectos de la quimioterapia son múltiples, llegando a inducir toxicidad sistémica, falta de especificidad, rápido metabolismo del fármaco y resistencia al fármaco del tipo adquirido e intrínseco.<sup>9,10,11</sup>

Las investigaciones basadas en la utilización de compuestos metálicos, originó el uso del Cisplatino como uno de los antineoplásicos más exitosos. Sin embargo,

otros metales han sido también empleados para combatir el cáncer, entre ellos se encuentra el cobre.<sup>12</sup>

Las Casiopeínas<sup>®</sup> (Cas) son una familia de compuestos de coordinación con un centro activo de cobre (II), que han sido evaluadas en varios modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, mostrando actividad antiproliferativa, citotóxica, citostática y genotóxica. Diferentes estudios demuestran que las Cas son capaces de inhibir la proliferación celular y producir muerte por apoptosis, la cual puede ser dependiente de caspasas o bien, estar mediada por la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO's) y toxicidad mitocondrial promoviendo la ruta intrínseca de apoptosis.<sup>11,12,13,14,15,16,17</sup>

## **II. ANTECEDENTES**

### **1. EL NEUROBLASTOMA**

La organización mundial de la salud (OMS), define al neuroblastoma (NB) como una neoplasia neuroepitelial periférica (PNET) con diferenciación neuronal limitada.<sup>17</sup> La familia de neoplasias de los PNET's está compuesta por células primitivas neuroepiteliales con apariencia morfológica embrionaria, originada de células madre multipotenciales que pueden diferenciarse hacia neuronas, endimocitos, células de la glía y posiblemente células mesenquimatosas. Tanto en animales como en humanos, esta familia de neoplasias desencadena signos neurológicos como convulsiones, pérdida de la conciencia, aumento de la presión intracraneal y déficit motor.<sup>18,19,20,21,22</sup>

#### **1.1. EL NEUROBLASTOMA EN MEDICINA HUMANA**

El NB representa del 8-10% de todos los tumores pediátricos en niños menores de 15 años; aproximadamente el 80% del mismo se presenta en niños menores de 5 años y es muy raro en niños mayores de 10 años.<sup>23</sup> Cerca del 40% de los pacientes tienen enfermedad metastásica refractiva a tratamiento, debido a que los tumores del SNP frecuentemente contienen alteraciones en las vías apoptóticas, produciendo enfermedad quimiorresistente. Esta neoplasia se desarrolla en etapa embrionaria o bien en etapas postnatales tempranas, como resultado de defectos del desarrollo durante la diferenciación normal de la cresta neural hacia células neuronales simpáticas, y se presenta con mayor frecuencia en las glándulas adrenales.<sup>3</sup> La mayoría de las veces el tumor se diagnostica

porque ha ocurrido un proceso metastásico severo y por lo tanto, su pronóstico es desfavorable; por otro lado, hay neonatos que en la zona de localización, presentan pequeños cúmulos de neuroblastos que eventualmente se diferenciarán hacia células nerviosas y de este modo, no se convierten en células cancerosas.<sup>24,25</sup>

El NB se disemina por vía sanguínea causando metástasis con mayor frecuencia en médula ósea, hueso, hígado y piel; o bien, por vía linfática hacia los linfonodos regionales. Las metástasis hacia pulmón son consideradas de tipo terminal; ya que representan cáncer de carácter diseminado. El proceso de metástasis es tan altamente selectivo y secuencial, que requiere cambios morfológicos celulares que favorecen la pérdida de la adhesión celular, aumento de la motilidad e invasividad, entrada y sobrevivencia a factores antineoplásicos en circulación sanguínea, salida hacia nuevos tejidos y colonización eventual hacia sitios distantes.<sup>1,24,25</sup>

El comportamiento del NB es variable, algunos tienden a diseminarse rápidamente, sobre todo en niños mayores de un año, mientras que otros crecen lentamente. Algunas veces en niños menores de 12 meses, las células cancerosas sufren regresión espontánea del tumor. Lo anterior sugiere que la regresión está parcialmente regulada por muerte celular neuronal programada y/o por diferenciación, que es un fenómeno similar a lo que ocurre en células neuronales simpáticas de manera fisiológica durante el desarrollo. En otros casos, las células maduran dando origen a la neoplasia conocida como ganglioneuroma.<sup>3,4,5</sup>

## CLASIFICACIÓN DEL NB

Debido a que el NB en estado embrionario es una neoplasia del neuroectodermo derivada de las células de la cresta neural, de acuerdo a sus características morfológicas se clasifica en:

- *Neuroblastoma (NB)*. Morfológicamente indiferenciado y maligno.<sup>23,24,25</sup>
- *Ganglioneuroblastoma (GNB)*. Es un tumor transicional que contiene células de tipo mixto. Tiene neuroblastos que pueden crecer y diseminarse anormalmente de manera similar al NB, y también está formado por zonas de tejido maduro similar al ganglioneuroma.<sup>23,24,25</sup>
- *Ganglioneuroma (GN)*. Es un tumor benigno conformado por células ganglionares maduras y células nerviosas en vaina. Esta neoplasia es usualmente removida quirúrgicamente y no necesita de otro tratamiento.<sup>23,24,25</sup>

## ESTADIOS Y GRUPOS DE RIESGO

A mediados de los años 90's se ha utilizado el sistema internacional de estadios del NB (INSS). Los estadios establecen el grado de desarrollo o diseminación del tumor. El conocimiento del estadio ayuda a determinar el plan terapéutico a llevar a cabo. Los estadios del NB son:

- *Estadio 1*. La neoplasia se encuentra localizada en su sitio de origen en un solo lado del cuerpo y no ha sufrido metástasis. Puede ser removida quirúrgicamente en su totalidad.<sup>5,24,25,26</sup>

- *Estadio 2A.* La neoplasia continúa localizada en su sitio de origen, sin embargo, no puede ser removida quirúrgicamente debido a su tamaño y localización. No ha habido diseminación a linfonodos.<sup>5,24,25,26</sup>
- *Estadio 2B.* Ha habido diseminación hacia los linfonodos cercanos del mismo lado del cuerpo en que se encuentra la neoplasia.<sup>5,24,25,26</sup>
- *Estadio 3.* Ha habido diseminación a partes distantes del cuerpo, pudiendo incluir linfonodos. La neoplasia no puede removerse quirúrgicamente por completo.<sup>5,24,25,26</sup>
- *Estadio 4.* Hay metástasis a linfonodos distales y órganos como hígado, piel y médula ósea, entre otros.
- *Estadio 4S.* Considerado un caso especial y con mejor pronóstico que los demás estadios. En este caso el paciente es menor de 1 año de edad al momento del diagnóstico. La neoplasia se encuentra en un lado del cuerpo, puede haberse diseminado hacia los linfonodos de ese mismo lado y/o hacia hígado, piel y/o médula ósea pero no hacia los huesos, y no más del 10% de las células de la médula ósea son células neuroblásticas.<sup>5,24,25,26</sup>

## **ASPECTOS QUE INFLUYEN EN LA TASA DE SOBREVIVENCIA**

La sobrevivencia de un paciente con diagnóstico de NB depende de una gran variedad de factores, principalmente el grupo de riesgo en que se encuentre el paciente y el estadio de la enfermedad, por lo tanto, aquellos que se encuentran en el grupo de bajo riesgo tienen una tasa de sobrevivencia de 95%; en los pacientes que pertenecen al grupo intermedio, la tasa de sobrevivencia es de 80-

90%; sin embargo, los niños mayores de 1 año de edad con enfermedad metastásica ampliamente diseminada o con neoplasia localizada de comportamiento agresivo y de gran tamaño, tienen una tasa de supervivencia pobre a largo plazo que es aproximadamente del 30%, correspondiente a los pacientes en el grupo de alto riesgo.<sup>24,25</sup>

- *Edad.* Niños menores a los 18 meses tienen mayor probabilidad de recuperación que niños mayores de esta edad.
- *Histología neoplásica.* Basado en el grado de diferenciación celular, aquellas neoplasias con mayor cantidad de células normales tienen un mejor pronóstico; por otro lado, las neoplasias cuyas células están pobremente diferenciadas tienen un mal pronóstico.<sup>4,7</sup>

## TRATAMIENTO

El tratamiento depende del estadio de desarrollo de la enfermedad, la edad del paciente y los aspectos que influyen en la tasa de supervivencia. Aquellos pacientes que se encuentran en el estadio 4S, pueden no necesitar tratamiento, debido a que en estos pacientes se puede presentar regresión tumoral espontánea.<sup>24</sup>

Existen varios tipos de tratamiento, los cuales pueden ser utilizados de forma independiente o combinados:

- *Quirúrgico.* Este tratamiento es utilizado para remover la totalidad de la neoplasia o la mayor parte de la misma, dependiendo de la localización de ésta. Si la neoplasia no se ha diseminado y es posible removerla por completo, este será

el único tratamiento empleado, sin embargo, en caso contrario, será necesario llevar una quimioterapia adjunta a este tratamiento.<sup>24,25,26</sup>

- *Quimioterapéutico.* Utiliza fármacos antineoplásicos. Generalmente se aplica una combinación de fármacos, siendo los más utilizados la ciclofosfamida o ifosfamidato; cisplatino o carboplatino; vincristina; doxorubicina. Se suele utilizar etoposido; topotecan; busulfan y melfalan, cuando se realiza trasplante de médula ósea.<sup>24,25</sup>

- *Radioterapia.* Basado en el empleo de radiación ionizante.
- *Medicina nuclear:* Mediante la utilización del análogo noradrenalínico de la aralquilo guanidina, conocido como MIBG (meta-yodobencilguanidina).
- *Medicina alternativa:* Utilizando retinoides, que son sustancias químicas relacionadas con la vitamina A. Particularmente se utiliza la isotretinoína (ácido 13-cis-retinoico), que disminuye el riesgo de recidiva después de tratamientos con quimioterapia o trasplante de médula ósea. Se cree que los retinoides ayudan a la diferenciación de las células cancerosas en células normales.
- *Trasplante de médula ósea.*

## **TIPOS CELULARES DE NEUROBLASTOMA**

Varias líneas celulares establecidas de NB, contienen variantes morfológicas que contribuyen a su heterogeneidad<sup>7</sup>, dividiéndose en 3 tipos celulares:

- *Neuroblásticas (N).* Expresan proteínas neurofilamentosas.<sup>7</sup>

- *Planas o sustrato adherentes (S)*. Crecen en agregados celulares, sintetizan colágeno y fibronectina de manera similar a las células de Schwann. Morfológicamente se parecen a las células progenitoras melanocíticas o gliales, a las células derivadas ectomesenquimales y a las células de Schwann.<sup>2,7</sup>
- *Intermedias (I)*. Expresan proteínas neurofilamentosas, pueden diferenciarse hacia células tipo neuroblásticas o bien hacia células tipo sustrato adherente.<sup>7</sup>

## **1.2. EL NB EN MEDICINA VETERINARIA**

El NB es poco frecuente en animales, hay algunos estudios de su aparición principalmente en ganado vacuno y perros, siendo la glándula adrenal su principal sitio de origen.<sup>18</sup> Aunque en humanos el NB es la neoplasia neuroepitelial periférica más frecuente en la edad infantil; en animales el meduloblastoma es el PNET más común, principalmente en becerros y perros. También hay estudios de casos de NB en caballos, cerdos, hurones, borregos, venados, gatos y ajolotes.<sup>19,21,27,28</sup>

Hay informes de casos de neuroblastoma en perros de todas las edades y en becerros prematuros y mortinatos; siendo en ambos casos la aparición más común en médula adrenal, ganglios simpáticos o tracto olfatorio, caracterizándose también por su rápido crecimiento, invasividad y metástasis. Los tumores de la glándula adrenal son difíciles de diagnosticar clínicamente. Aunque el NB es de rara aparición, comúnmente son lesiones benignas y aisladas en las glándulas adrenales, encontradas como hallazgos a la necropsia.<sup>18,29,30</sup>

Si se llega a sospechar de una presentación en medula adrenal, es necesario realizar el diagnóstico diferencial, lo que también representa una complicación para el diagnóstico clínico, debido a que la glándula adrenal es un sitio común de aparición de neoplasias en animales.<sup>29,30,31</sup>

Además de la invasión local y la diseminación a los linfonodos, el NB tiene tendencia a diseminarse vía sanguínea hacia hígado, pulmones y huesos. En algunos informes de casos, se mencionan como sitios de metástasis a los linfonodos regionales, mesenterio, bazo, hígado, cerebelo, nasofaringe, piel y canal vertebral.<sup>32</sup> De este modo, los sitios de mayor ocurrencia están divididos entre las glándulas adrenales, los ganglios simpáticos del abdomen, pecho o cuello o los ganglios parasimpáticos de la pelvis.<sup>20,33</sup>

En perros, los estudios de NB, se restringen a tumores en el tejido nervioso del SNC y SNP, incluyendo médula adrenal y red ganglionar simpática.<sup>29,30,33,34</sup>

## **HISTOPATOLOGÍA**

El NB es un tumor muy infiltrante, con formación de vasos sanguíneos prominentes; se caracteriza por estar formado por pequeñas células redondas con nucleos hipercromáticos, acomodadas alrededor de procesos neuronales formando pseudorosetas de Homer Wrigth, así mismo se observan áreas con trabéculas densas y ocasionalmente hay zonas donde las fibras están dispuestas en líneas paralelas o en forma de abanico conectándose a las células.<sup>31,32,35</sup>

Hay muy pocos informes sobre el panel de anticuerpos para NB en medicina veterinaria.<sup>36</sup>

## 2. TRATAMIENTOS ANTINEOPLÁSICOS

Inicialmente el desarrollo de agentes quimioterapéuticos se basó en la observación de que las células neoplásicas proliferan más rápido que las normales, por lo que se desarrollaron fármacos que interfieren con la replicación del ADN o el metabolismo celular; sin embargo, como se pudo predecir, éstos afectan también a las células normales en división constante como las de médula ósea y epitelios, por lo que se redujo el uso terapéutico de estos agentes.<sup>9,11</sup>

Los agentes quimioterapéuticos en general, pueden inducir numerosas respuestas celulares que impactan directamente en la proliferación y sobrevivencia celular. Una de las respuestas más estudiadas es la apoptosis, que es la muerte celular fisiológica y programada que controla la proliferación de las células normales durante el desarrollo, crecimiento y en la enfermedad.<sup>9,10</sup>

Desarrollos recientes en la quimioterapia dependen de agentes que además de interferir con el ciclo celular de las células proliferantes, disparan la vía apoptósica inhibiendo así el desarrollo del cáncer. En ciertas neoplasias malignas ocurre muerte por apoptosis de manera espontánea, lo que ha llevado a realizar estudios que confirman que muchos agentes quimioterapéuticos matan a las células por esta vía.<sup>10</sup> Esto ha llevado a la búsqueda de nuevos fármacos que puedan inducir específicamente este proceso.<sup>10,11</sup>

El desarrollo y uso de antineoplásicos basados en metales, lleva al origen del cisplatino<sup>®</sup> como uno de los antineoplásicos más exitosos para el tratamiento de neoplasias testiculares y ováricas. El cisplatino y la segunda generación derivada del platino, el carboplatino<sup>®</sup>, han permitido la generación de nuevos agentes basados en metales debido a su actividad antineoplásica. De este modo, fármacos

basados en compuestos metálicos como el galio, germanio, bismuto, complejos metálicos de transición temprana como el titanio, vanadio, niobio, molibdeno y renio; y complejos metálicos de transición tardía como el rutenio, rodio, iridio, platino, cobre y oro han mostrado potencial quimioterapéutico.<sup>12</sup>

## 2.1. CASIOPEÍNAS®

La búsqueda de nuevos agentes antineoplásicos bajo el supuesto de que los fármacos basados en metales endógenos son menos tóxicos, ha llevado al desarrollo de fármacos basados en cobre; culminando en la síntesis de una serie de compuestos de coordinación con cobre (II) denominados Casiopeínas® (Cas) (Figura 1).<sup>12,37,38</sup> Algunos de estos agentes han demostrado poseer características antineoplásicas en estudios *in vivo* e *in vitro* y en una gran variedad de líneas celulares neoplásicas<sup>11,13,19,37,39,44,48,49,51,63</sup> (Cuadro 1). Lo anterior sugiere que estos agentes disminuyen los efectos secundarios.<sup>11,12,13</sup> Estos compuestos tienen la fórmula general:  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{N-O})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$  y  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$ .

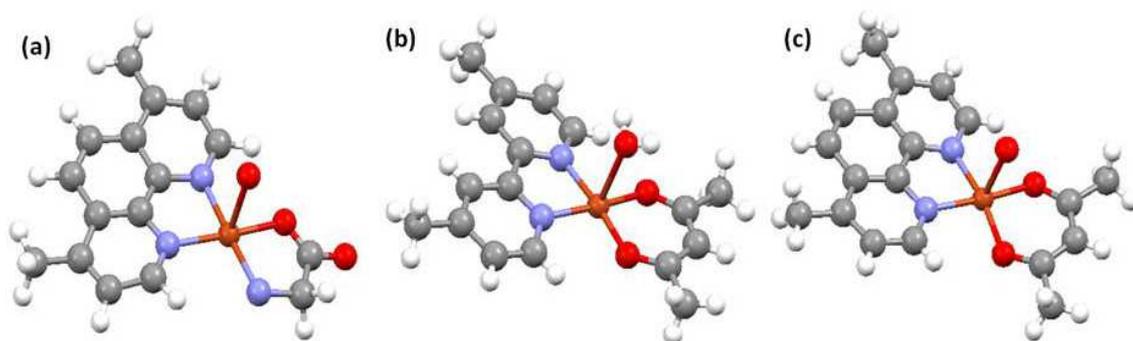


Figura 1. Estructura de las Casiopeínas®. A) Cas IIgly, B) Cas IIIia, C) Cas IIIEa.<sup>117</sup>

Se ha observado que las Cas promueven un incremento en las especies reactivas de oxígeno (ERO's) que causan un daño subsecuente a la mitocondria, seguido de muerte celular por apoptosis a través de sus 2 cascadas de señalización.<sup>13,17,38,39,40</sup> Sin embargo, además del daño mitocondrial, hay otros blancos potenciales en los que las Cas pueden tener efecto, como lo es el daño al ADN con ligeras diferencias basadas en la estructura de la molécula, el mecanismo potencial puede ser mediante la promoción de una reacción parecida a la de Fenton y Harber-Weiss, así como a la reducción del cobre coordinado (II) a cobre (I), con la subsecuente generación de las ERO's radical superóxido e hidroxilo, que pueden reaccionar con diferentes moléculas como ácidos nucleicos, proteínas o lípidos de membrana, causando un daño oxidativo general al interior de la célula.<sup>12,39,41,42</sup>

Cuando el cobre(II) se encuentra en el citosol, se reduce mediante la interacción con agentes reductores intracelulares como el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH), el dinucleotido de Flavina-adenina (FAD), glutatión (GSH) o superóxido dismutasa (SOD), de modo que eventualmente entra al núcleo. Se ha propuesto que debido a su estructura plana, las Cas pueden intercalarse entre las dobles hélices del ADN y mediante la reacción de Fenton, generan ERO's y provocan daño genético *in situ* que se expresa como fragmentación de ADN.<sup>12,13,37,39,42</sup>

Casiopeína	Línea Celular	Tipo de neoplasia	Ref.
Cas IIgly	C6	Glioma	19
Cas IIgly	A549, H157	Carcinoma de pulmón	39
Cas IIIia	HCT-15	Adenocarcinoma colorrectal	48
Cas IIgly y Cas IIIia	Daoy	Meduloblastoma desmoplásico cerebelar	49
Cas IIgly, Cas II Ea y Cas IIIia	CHP-212, SK-N-SH	Neuroblastoma	63
Cas IIgly	L1210	Leucemia linfocítica murina	
Cas IIgly	CH1	Linfoma	11
Cas IIgly, Cas III Ea	HeLa	Adenocarcinoma de cérvix	13
Cas IIgly, Cas IIIia	AS-30D	Hepatoma murino	37
	HeLa	Adenocarcinoma de cérvix	
	SiHa	Carcinoma de cérvix de células escamosas, grado II	
	CaSki	Carcinoma epidermoide de cérvix	
Cas IIgly	CaLo	Carcinoma de cérvix de células escamosas, grado IIB	51
	C-33 A	Carcinoma cervical	
	B-16	Melanoma	
	LL/2 (LLC1)	Carcinoma de pulmón- Lewis	

Cuadro 1. Casiopeínas y su actividad en el cáncer. Estudios *in vivo* e *in vitro* realizados en diferentes líneas celulares de Cáncer.

### 3. MUERTE CELULAR PROGRAMADA

La muerte celular programada es un proceso fisiológico que mantiene la homeostasis tisular mediante el balance de la regeneración celular y la eliminación de células alteradas tales como aquellas con mutaciones genómicas de potencial

dañino, linfocitos autoreactivos y células infectadas con virus.<sup>47,48,49</sup> Pueden definirse dos tipos de muerte celular programada:

- Apoptosis (Muerte celular programada Tipo I).<sup>47,49,50</sup>
- Autofagia (Muerte celular programa Tipo II).<sup>49,50</sup>

### **3.1. APOPTOSIS**

La apoptosis, también conocida como muerte celular tipo I, es un proceso activo de muerte celular fisiológica, donde se describe de manera detallada la activación de enzimas catabólicas (proteasas), en cascadas de señalización que llevan a cambios de la estructura celular y ultraestructural.<sup>9,51</sup> Este proceso culmina con la disminución del tamaño celular, condensación nuclear de la cromatina (picnosis) y fragmentación nuclear o cariorexis en unidades oligonucleosómicas. Los cambios morfológicos y bioquímicos que la caracterizan son mediados por una familia de proteasas de cisteína que rompen a nivel de un residuo de aspartato conocidas como caspasas. Estas enzimas existen como zimógenos conocidos como procaspasas, que se convierten en su forma activa mediante la ruptura proteolítica interna de los residuos de ácido aspártico, lo que permite la separación de la caspasa en una unidad catalítica grande (p10) y una pequeña (p20).<sup>9,52,53</sup>

El proceso apoptótico se desencadena por una gran variedad de estímulos como el daño al ADN, pérdida de la señalización de factores de crecimiento, toxinas, radiación, etc. Una vez que se activa la señal membranal, se produce una señalización intracelular que deriva en la activación de las caspasas, que a su vez romperán sustratos clave y llevarán a las características apoptóticas antes descritas.<sup>9,51</sup>

De acuerdo a su estructura primaria, las procaspasas pueden dividirse en 2 clases:

a) *Iniciadoras*, que contienen prodominios largos amino-terminales, entre las que se encuentran las caspasas -2, -8, -9 y -10.<sup>9,51,52,53</sup>

b) *Efectoras*, que tienen prodominios cortos que incluyen a las caspasas -3, -6 y -7.<sup>9,51,52,53</sup>

Se han determinado algunas vías de activación de caspasas y los receptores que intervienen en este proceso (Figura 2):

**1. Vía Intrínseca o mitocondrial.** Esta vía intracelular está mediada por la familia Bcl-2. Es activada por diversos factores de estrés, por la presencia de proteínas sin desdoblar y otros estímulos que pueden llevar a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. Esto permitirá la liberación de factores mediadores de la apoptosis (proteínas apoptogénicas) al citosol desde el espacio intermembranario de la mitocondria, como lo son el citocromo c (cit. C), el factor inductor de la apoptosis (AIF), las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP's), la segunda proteína mitocondrial activadora de caspasa/proteína de unión directa a las IAP (Smac/DIABLO), la proteasa sérica mitocondrial (HtrA2/Omi) y la endonucleasa G (endo G). Una vez liberado el cit. C, jugará un papel primordial en esta vía, pues se activará al interactuar con el desoxiadenosina trifosfato (dATP) y el factor-1 activador de proteinasas (Apaf-1), uniéndose para formar un complejo conocido como *apoptosoma* que junto con nucleótidos de adenina, promoverá la autoactivación de la procaspasa -9, que a su vez activará a las caspasas -2, -3, -6, -8 y -10.<sup>47,48,51,53</sup>

La familia Bcl-2 contiene al menos una región protéica homóloga denominada BH (Bcl-2 homóloga). Esta familia se divide en proteínas antiapoptósicas multidominio (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> y Mcl-1) que contienen los dominios BH1, BH2, BH3 y BH4; el otro grupo está formado por proteínas proapoptósicas multidominio (Bax y Bak) que contienen los dominios BH1, BH2 y BH3; y finalmente el grupo proapoptósico uniprotéico BH3 (Bid, Noxa, PUMA, Bad, Bim). Las proteínas BH3 se encargan de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, permitiendo entre otras cosas la activación de Bax y Bak para la formación del poro de la membrana que permiten la salida de diferentes proteínas al espacio citosólico.<sup>9,51</sup>

**2. Vía extrínseca.** Es activada por señales de otras células e iniciada por la asociación de receptores de muerte transmembranales como el gen antiapoptósico no. 1 (FAS/APO1/CD95), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y su ligando extracelular (FAS-L ó TNF- $\alpha$ L). En esta asociación, el receptor trimeriza y recluta moléculas adaptadoras de muerte en el espacio citosólico de la membrana mitocondrial. Dicha asociación llevará a la formación del complejo señalizador inductor de muerte (DISC), siendo su ligando la procaspasa iniciadora -8 ó -10 que activarán a las caspasas efectoras -7 y -3 (que activará a caspasa -6), activando a otras proteínas celulares como el factor de fragmentación de ADN (DFF), que inducirá a la condensación de la cromatina y además actúa como una DNAsa. La ruptura de otras proteínas estructurales incluye láminas nucleares, actina,  $\alpha$ -fodrina, polimerasa de poliadenosilfosfato-ribosa (PARP), ribonucleoproteína U1, etc., facilitando el desensamble estructural de las células bajo un proceso apoptósico.<sup>47,51,55</sup>

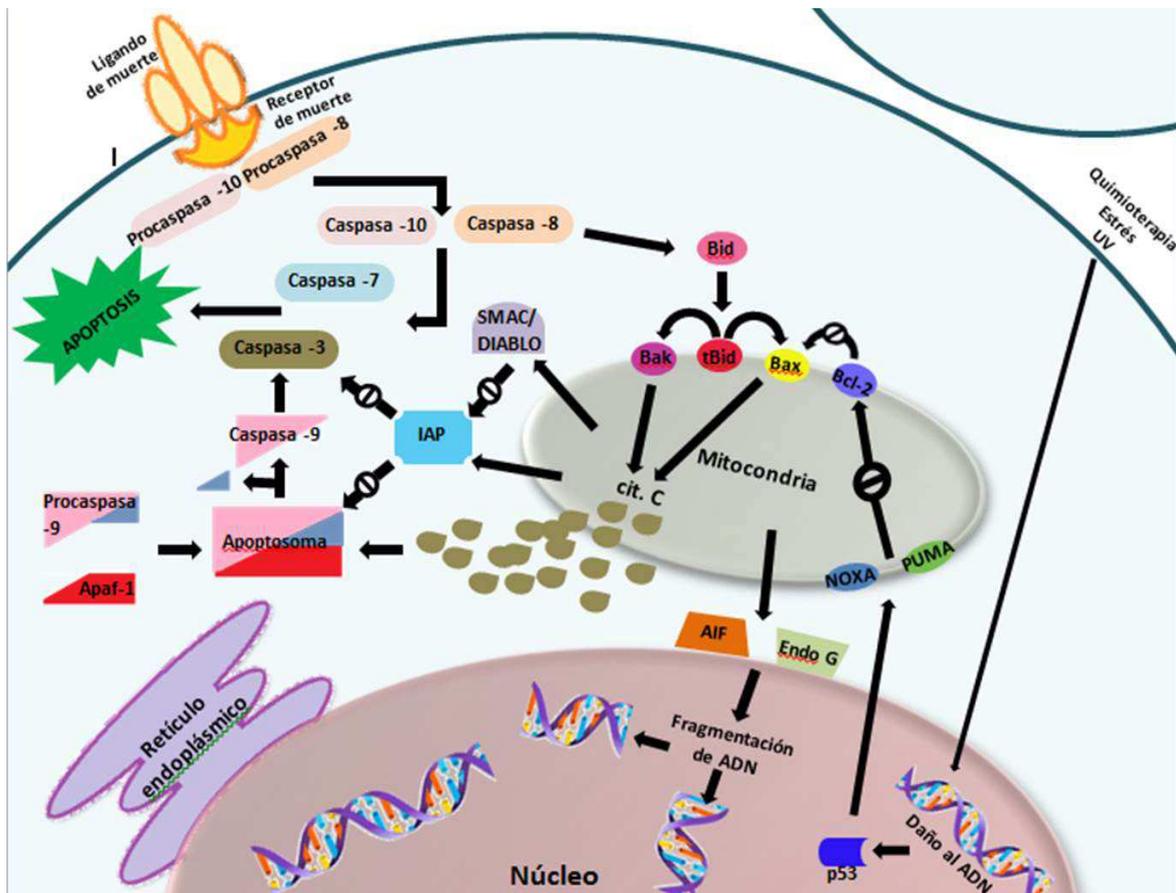


Figura 2. Muerte celular Tipo I o muerte celular por Apoptosis. Vías de señalización.

### 3.2. AUTOFAGIA

En muchos escenarios, la autofagia constituye un proceso de adaptación al estrés que evita la muerte celular (suprimiendo el mecanismo de apoptosis); mientras que en otros casos constituye una vía alterna para la muerte celular, conocida como muerte celular autofágica o muerte celular tipo II.<sup>50,56</sup>

Para que el proceso autofágico se lleve a cabo, se requiere de la formación del autofagosoma. Comienza cuando una membrana plana (fagóforo) se elonga y envuelve una porción de citoplasma o carga específica, formando una doble membrana conocida como autofagosoma, que posteriormente recibirá

constituyentes lisosomales como proteínas de membrana lisosomal y bombas de protones, mediante la fusión de los cuerpos multivesiculares o endosomas tardíos.<sup>60,61</sup> Finalmente, los autofagosomas se fusionan con los lisosomas recibiendo el nombre de autofagolisosomas (autolisosoma), y si se fusiona con endosomas, recibirá el nombre de anfisoma. El contenido en el interior será degradado por hidrolasas y los productos de degradación son transportados de vuelta al citoplasma, donde pueden ser reutilizados para biosíntesis o producción de energía.<sup>58,59,60,61</sup>

Durante una extensiva autofagia el volumen que las vacuolas autofágicas ocupan, puede ser igual o mayor que los organelos y el citosol libre, es por ello que es posible que tan alto grado de destrucción pueda llevar a la muerte celular.<sup>62,63,64</sup>

Hay 3 rutas autofágicas conocidas dependiendo de la ruta de entrega del material citoplasmático al lumen lisosomal (Figura 3):

1. *Macroautofagia o autofagia*, donde una porción del citoplasma que será degradado es envuelto en un organelo especializado como el autofagosoma.<sup>49,56,57</sup>

2. *Microautofagia*, la propia membrana lisosomal secuestra una porción del citoplasma por un proceso semejante al pinzamiento de los fagosomas de la membrana plasmática.<sup>56,57</sup>

3. *Autofagia mediada por chaperonas*, donde las proteínas que procesan una señal son transportadas del citoplasma a través de la membrana lisosomal hasta el lumen del lisosoma.<sup>57</sup>

La autofagia puede contribuir a la supervivencia y establecimiento neoplásico permitiendo la adaptación a condiciones metabólicas adversas o favoreciendo la quimioresistencia; adicionalmente, concentraciones reducidas o la ausencia de las proteínas requeridas para el proceso autofágico, se han asociado con la progresión neoplásica tanto en humanos como en animales, por lo que la autofagia puede representar un mecanismo de supresión neoplásica.<sup>62,64</sup>

Hay al menos 3 hipótesis que pueden explicar en qué momento la autofagia puede estimular la tumorigénesis:

1. La inhibición autofágica aumenta la muerte celular por necrosis dentro de las neoplasias y por consiguiente, promoverá el crecimiento tumoral mediante el aumento de la inflamación local, donde las citosinas angiogénicas contenidas en el citoplasma de las células inflamatorias, inducirán la formación de vasos sanguíneos que proveerán de nutrientes y oxígeno al tumor, para asegurar el crecimiento y metástasis tumoral.<sup>56</sup>

2. Una autofagia comprometida puede promover la inestabilidad cromosómica, en particular en células sometidas a estrés metabólico que puede llevar a la activación de oncogenes y a la progresión neoplásica.<sup>56</sup>

3. Una deficiencia en el mecanismo autofágico, puede promover tumorigénesis mediante la acumulación de organelos viejos o dañados, que actuarán como fuente intrínseca tumorigénica y de especies químicas genotóxicas; esto significa que si la síntesis proteica predomina a la degradación, el crecimiento neoplásico se verá estimulado.<sup>56</sup>

Hay múltiples moléculas que se observan especialmente en autofagia, como Beclina 1 (BECN1). BECN1 es una proteína que interactúa bajo condiciones de no

estrés con Bcl-2 y sus homólogos antiapoptóticos (Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1). Dado que BECN1 tiene un receptor parecido al BH3, es importante destacar que únicamente la proteína Bcl-2 que se une a BECN1 es aquella que se encuentra en el retículo endoplásmico (RE).<sup>56,66</sup> Particularmente los miembros antiapoptóticos de Bcl-2 suprimen la autofagia mediante su interacción con BECN1, inhibiéndola. Es posible que la liberación de Bcl-2 y la proteína inhibitoria FLICE (FLIP) de los complejos de activación de la autofagia, bloqueen las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis.<sup>49,56,67</sup>

La unión de BECN1 a moléculas antiapoptóticas disminuye la actividad de la fosfoinositol-3 cinasa (PI3-K) asociada con BECN1 inhibiendo la formación del autofagosoma. La falta de nutrientes induce la fosforilación de Bcl-2, que inhibe la unión de esta a BECN1, y lleva a la activación del proceso autofágico.<sup>57,61,68</sup>

Cuando la autofagia está bloqueada, se acelera la apoptosis o en el caso de apoptosis deficiente, las células atraviesan por una catástrofe metabólica y mueren por necrosis.<sup>49,69</sup>

Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP o MAPK) son una familia que coordina la señal de una variedad de estímulos extra e intracelulares para regular la expresión génica, el metabolismo celular y la dinámica del citoesqueleto. Los miembros de las MAPK: MAPK1/ERK2, MAPK8/JNK y MAPK14/p38 $\alpha$ , están involucrados en el control del proceso autofágico.<sup>70</sup>

El desarrollo del fagóforo hacia el autofagosoma, requiere de la integración de la cadena ligera proteica-3 asociada al microtúbulo (LC3B), sintetizada como precursor proteico y presente en el citosol.<sup>63,64</sup> La proteasa de la cinasa relacionada a autofagia no. 4 (Atg4) rompe a LC3B en el extremo C-terminal de su

cadena de aminoácidos, dejando expuesto el aminoácido glicina, para producir LC3B-I citosólico. Posteriormente, el extremo expuesto es conjugado por Atg7, Atg3 y el multímero Atg12-Atg5-Atg16 con la altamente lipofílica fosfatidiletanolamina (PE) generando LC3B-II y promoviendo la integración de LC3B-II dentro de las membranas lipídicas del fagóforo y el autofagosoma. En el autofagosoma, LC3B-II tiene un papel seleccionando la carga a degradar y también promoviendo la fusión de la membrana.<sup>59,60,61,64,71</sup>

Durante un periodo corto de falta de nutrientes, la cantidad total de LC3B-I disminuye y la de LC3B-II aumenta; sin embargo, si las células pasan por un periodo más largo de falta de nutrientes, tanto LC3B-I como LC3B-II desaparecen. LC3B-II está presente tanto en la membrana interna como externa del autofagosoma. En la membrana interna, LC3B-II se degradará dentro de los autolisosomas y en la membrana externa, Atg4 lo desconjugará del multímero Atg12-Atg5-Atg16 para retornar al citosol.<sup>60,64,71,72,73,74</sup>

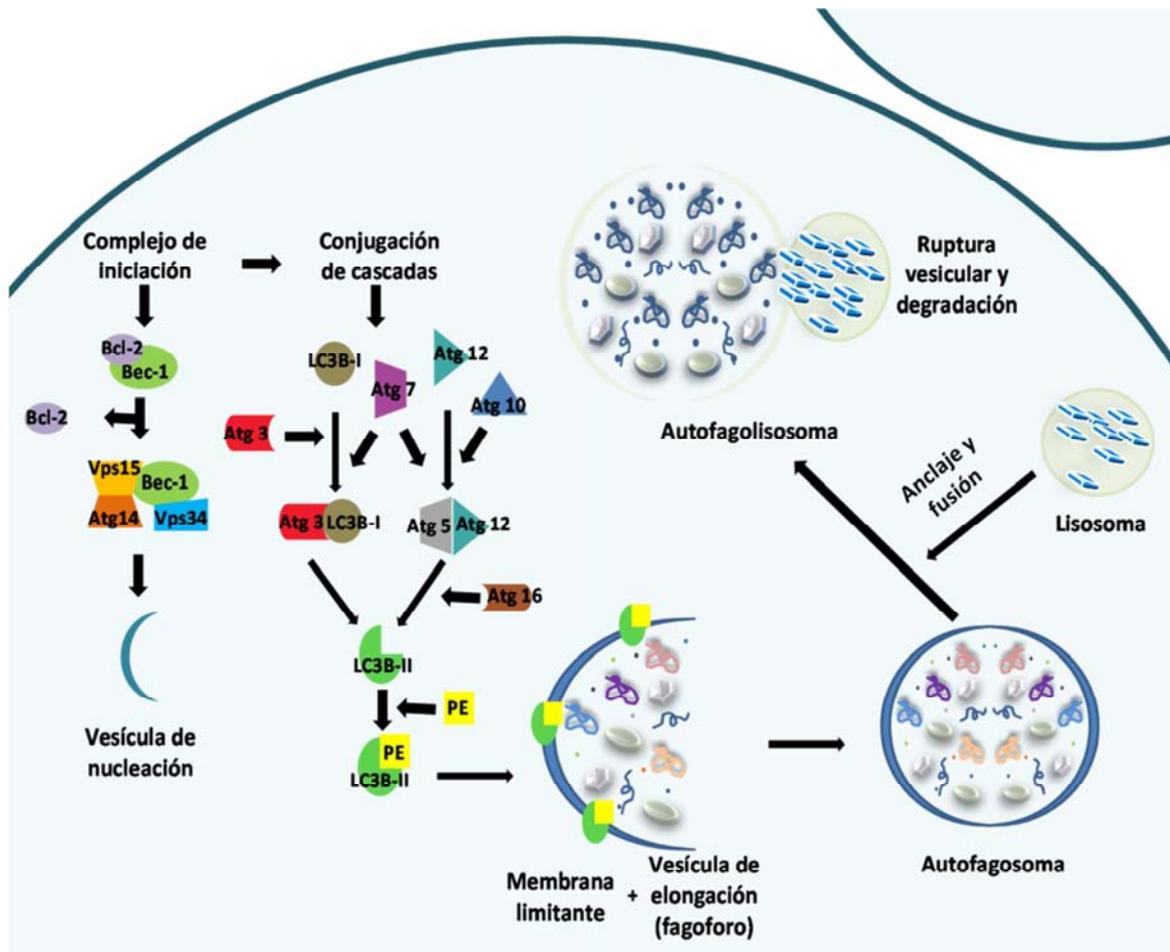


Figura 3. Muerte celular Tipo II o Autofagia.

#### 4. REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR

Las MAPK son componentes de señalización importantes en la respuesta celular debido a diferentes estímulos extracelulares.

La subfamilia de cinasas extracelulares reguladas por señales (ERK), tiene 2 isoformas: ERK1 y ERK2, también conocidas como MAPK p44 (p44ERK1) y p42 (p42ERK2) respectivamente, y oficialmente nombradas MAPK 1 y MAPK 3. Estas isoformas son componentes cruciales en la regulación de la proliferación celular normal y maligna (Figura 4).<sup>75,76</sup>

Las MAPK de ERK1 y ERK2 son activadas por mitógenos y se encuentran sobrerregulados en neoplasias de humanos.<sup>74</sup> Otras dos vías de MAPK, la cinasa Jun N-terminal (JNK) y p38, son activadas por estrés ambiental y genotóxico y tienen papeles clave en la inflamación y en la homeostasis tisular, pues controlan la proliferación celular, diferenciación, sobrevivencia y la migración de tipos celulares específicos.<sup>61,66,75</sup>

Tanto ERK1 como ERK2, se coexpresan en todos los tejidos pero en concentración variable. Sin embargo, se sugiere que puede haber diferencias cuantitativas en su dinámica, lo cual juega un papel importante en su regulación. Se sugiere que ERK1 actúa en complejo, atenuando la actividad de ERK2. La inhibición de ERK2 reduce dramáticamente el crecimiento celular y la pérdida de ERK1, facilita significativamente la proliferación.<sup>77</sup>

Dependiendo de la duración, la magnitud y la localización subcelular, la activación de ERK controla varias respuestas celulares como proliferación, migración, diferenciación y muerte.<sup>75</sup> La fosforilación y activación de ERK1 y ERK2 (ERK1/2) toma lugar generalmente en la membrana celular en un módulo de señalización que incluye a la GTPasa Ras, a la proteína cinasa de serina-treonina Raf y a la cinasa de proteína cinasa activada por mitógeno MEK en su forma fosforilada.

La activación de MEK 1/2 lleva a la fosforilación de los residuos de treonina y tirosina de ERK 1/2 con los sitios de reconocimiento Treo-Glu-Tir.<sup>78</sup> La actividad de ERK también puede promover la liberación del cit. C mediante la modulación de la expresión de la familia de proteínas Bcl-2. La actividad de MEK/ERK se ha asociado con la sobrerregulación y desregulación de los miembros proapoptóticos

de Bcl-2. Adicionalmente, la caspasa -8 activada por ERK, induce la liberación de cit. C a través de la activación proteolítica de Bid (tBid).<sup>75,78,79,80</sup>

El secuestro citoplásmico de ERK se ha asociado a diferentes formas de muerte celular, cuando ocurre mediante la unión con la proteína astrocítica-15 (PEA-15) promueve autofagia; mientras que la actividad sostenida de ERK citoplásmico, induce senescencia en fibroblastos primarios de humanos.<sup>75</sup>

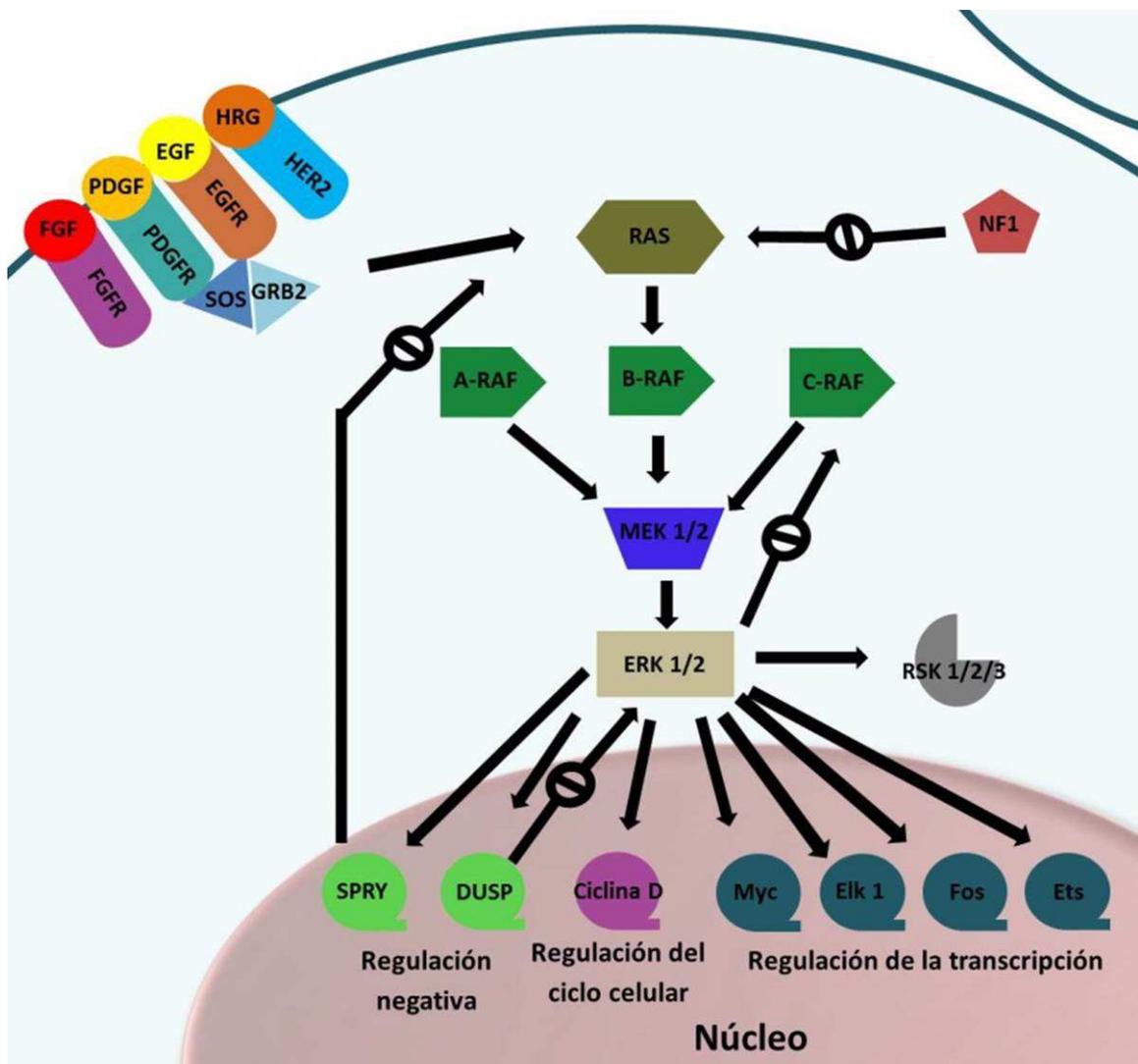


Figura 4. Vía de señalización de ERK 1/2.

El factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de células B (NF- $\kappa$ B) regula la expresión de una variedad de genes críticos para la proliferación celular, angiogénesis, replicación viral, tumorigénesis, metástasis, inflamación, ciclo celular, antiapoptosis y varias enfermedades autoinmunes.<sup>81,82,83,84,85,86,87</sup> En células no estimuladas o en reposo, el NF- $\kappa$ B inactivo se encuentra presente en el citoplasma como un heterodímero de 2 subunidades (p50 y p65) y está unido a proteínas inhibitoras conocidas como I $\kappa$ B, dentro de las que se encuentran: I $\kappa$ Ba, I $\kappa$ Bb, I $\kappa$ Bg y el protooncogen Bcl-3.<sup>85,87,88,89</sup> Cuando I $\kappa$ B es fosforilado y subsecuentemente degradado proteolíticamente por el proteosoma 26S, NF- $\kappa$ B es liberado de su anclaje junto con I $\kappa$ B y se trasloca hacia el núcleo, donde regula la expresión génica.<sup>85,88,89</sup>

Hay tres caminos de señalización de NF- $\kappa$ B con diferentes estímulos y blancos transcripcionales:

1. **Clásico:** Esta vía de señalización se lleva a cabo mediante dímeros de Rel A y NF- $\kappa$ Ba.<sup>83,85,87,88</sup>
2. **Alternativo:** Esta vía es requerida para la organogénesis linfocítica e involucra a dímeros de Rel B - NF- $\kappa$ B2.<sup>83,87</sup>
3. **Híbrido:** Se postula un nuevo mecanismo para la activación de NF- $\kappa$ B (p100) en la vía canónica de dimerización y su potencial para su interrelación con otros caminos de señalización.<sup>83</sup>

La mayoría de los agentes quimioterapéuticos causan apoptosis en células cancerosas; sin embargo, algunas células neoplásicas suelen evadir este mecanismo mediante la sobreexpresión de proteínas como Bcl-2, NF- $\kappa$ B y la

proteína cinasa A (Akt).<sup>81,90</sup> Akt suprime la apoptosis mediante la activación de NF- $\kappa$ B.<sup>81</sup> Por otro lado, al igual que la quimioterapia, la radioterapia también puede inducir la fosforilación de I $\kappa$ B $\beta$ , resultando en la translocación de NF- $\kappa$ B hacia el núcleo, activando genes involucrados en la supervivencia y proliferación celular. La sensibilidad a la quimioterapia está determinada por los genes Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> que regulan el proceso apoptótico y que a su vez están reguladas por NF- $\kappa$ B, donde este factor de transcripción se encuentra sobrerregulado en muchas neoplasias.<sup>82,86</sup> La activación de NF- $\kappa$ B estimula la angiogénesis y promueve por tanto la supervivencia neoplásica.<sup>87,91</sup>

El gen supresor tumoral p53 tiene un papel importante, demostrándose que el bloqueo de NF- $\kappa$ B induce la expresión de p53 derivando en la regulación de proteínas proapoptóticas como PUMA, cuya activación por daño al ADN depende de p53.<sup>90</sup>

## **5. JUSTIFICACIÓN**

Diversos estudios han demostrado que las células neoplásicas tienen la capacidad de promover mutaciones que permitan su supervivencia. Lo anterior ha generado la necesidad de desarrollar nuevas terapias anticancerosas en las cuales los fármacos induzcan la muerte celular al activar diferentes rutas de señalización para conseguir la destrucción de las células neoplásicas, superando sus mecanismos de supervivencia.<sup>12,37</sup> Sin embargo, diversos estudios demuestran que la quimioterapia es poco específica afectando también a las células no cancerosas.<sup>12,17,38</sup> De ahí que se hayan iniciado nuevas líneas de

investigación para evaluar la eficiencia de nuevos fármacos como los basados en compuestos metálicos. Entre estos fármacos se encuentran las Casiopeínas<sup>®</sup>, aunque su valor en el proceso autofágico, aún no ha sido evaluado.

La efectividad y mecanismo de acción específico de las Cas sobre el NB, aún debe ser dilucidado para establecer las bases que fundamenten su utilización como alternativa en el tratamiento de este tipo de cáncer.

## **6. HIPÓTESIS**

El tratamiento de la línea celular de neuroblastoma CHP-212 con tres diferentes Casiopeínas<sup>®</sup>, permitirá evidenciar los fenómenos de apoptosis, autofagia y proliferación/sobrevivencia *in vitro* a través de una cinética de tres tiempos, en un estudio de tipo experimental.

## **7. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la expresión de los procesos apoptótico, autofágico y de proliferación/sobrevivencia, *in vitro*, en la línea celular de neuroblastoma CHP-212, bajo el tratamiento con la concentración inhibitoria media de las Casiopeínas<sup>®</sup> IIgly, IIIa y IIIEa.

### **7.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

a) Evidenciar mediante una cinética de tres tiempos, la presencia de apoptosis, *in vitro*, en la línea celular CHP-212 de neuroblastoma, luego del tratamiento independiente con la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) de las Casiopeínas<sup>®</sup> IIgly, IIIa y IIIEa.

**b)** Evidenciar mediante una cinética de tres tiempos, la presencia de autofagia, *in vitro*, en la línea celular CHP-212 de neuroblastoma, luego del tratamiento independiente con la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) de las Casiopeínas<sup>®</sup> IIgly, IIIia y IIIEa.

**c)** Evidenciar mediante una cinética de tres tiempos, la proliferación/sobrevivencia celular, *in vitro*, en la línea celular CHP-212 de neuroblastoma, luego del tratamiento independiente con la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) de las Casiopeínas<sup>®</sup> IIgly, IIIia y IIIEa.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 1. CULTIVO CELULAR

Se preparó el medio de cultivo DMEM/F-12 (GIBCO®) en polvo (1 L), (procedimiento D, de la hoja de indicaciones de GIBCO®) y se suplementó con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO®), 1% de aminoácidos no esenciales (GIBCO®) y 1% de antibiótico-antimicótico (anti-anti) (GIBCO®). El medio se conservó en refrigeración a 4°C.

El cultivo celular se comenzó a partir de un stock congelado y mantenido en N<sub>2</sub> líquido. Se descongelaron las células conforme al protocolo y se determinó la viabilidad celular de las mismas mediante tinción con azul de tripano en cámara de Neubauer (Figura 5). El conteo de células vivas se realizó por duplicado en ambos lados de la cámara y en sus cuatro cuadrantes.

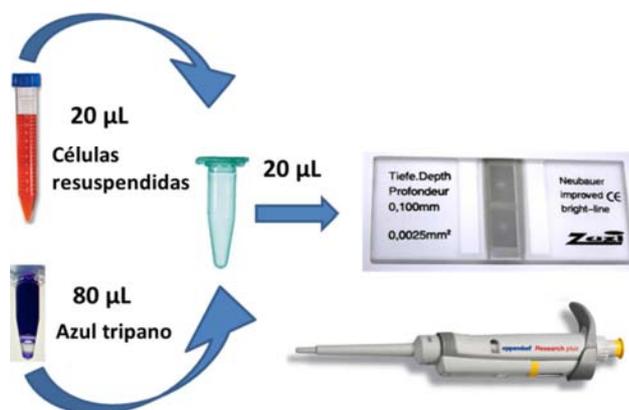


Figura 5. Procedimiento para realizar el conteo celular en cámara de Neubauer. En un vial se homogenizan 20 µL de la solución de células previamente resuspendidas y 80 µL de azul tripano. De la suspensión obtenida se colocan 10 µL en cada lado de la cámara de Neubauer y se realiza el conteo al microscopio óptico a un aumento de 10X.

Se obtuvo la media de los resultados del conteo para conocer el número de células vivas por mililitro, mediante la siguiente ecuación:

$$\text{No. de células/ml} = (\bar{x})(FC)(FD)$$

$\bar{x}$ = Media del conteo celular

FD= Factor de dilución, 100/20

FC= Factor de conversión de la cámara,  $10^3$

**Ecuación 1. Fórmula para determinar el No. de células vivas por mililitro en la cámara de Neubauer.**

Se sembraron las células en cajas de Petri o botellas de cultivo con suficiente medio, para asegurar su crecimiento y se llevaron a incubación con las siguientes condiciones: 5% CO<sub>2</sub>, 37°C .

El crecimiento celular se verificó cada 2-3 días. Para las cajas de Petri de 55 cm<sup>2</sup> (Corning®), se utilizó un volumen de recambio de 8 mL de medio suplementado con SFB 10%, mientras que para las botellas de cultivo (Corning®) de 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> y 175 cm<sup>2</sup>, se utilizaron volúmenes de recambio de 5, 12 y 18 mL de medio suplementado, respectivamente.

La propagación celular en cajas de Petri de 55 cm<sup>2</sup> y botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> a botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> y 175 cm<sup>2</sup> se hizo mediante el uso de tripsina al 0.25% (GIBCO®), utilizando de 1 a 3 mL de tripsina, previo retiro del medio de cultivo y lavado con PBS 1x estéril (GIBCO®).

El ciclo incubación-mantenimiento/crecimiento celular-propagación, se continuó hasta obtener la confluencia requerida ( $60 \times 10^6$  células) para cada tiempo en la cinética y para cada variable de tratamiento.

## **2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE TRABAJO**

Una vez que se obtuvo la confluencia celular adecuada, se propagó a cajas de Petri de 55 cm<sup>2</sup> que fueron utilizadas para colocar los tratamientos. El esquema de siembra en las cajas de cultivo correspondió a dos cajas de Petri para cada

tratamiento (control, cisplatino, Cas IIgly, Cas IIIEa, Cas IIIia), conteniendo  $10 \times 10^6$  células por variable. Este esquema se siguió por cuadruplicado para cada punto de la cinética.

### 3. PREPARACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS

Se utilizaron las Casiopeínas<sup>®</sup> IIgly, IIIia y IIIIEa (provistas por la Dra. Lena Ruiz Azuara del Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, de la Facultad de Química de la UNAM), así como Cisplatino<sup>®</sup> (Sigma<sup>®</sup>) empleado como control positivo de muerte celular. Las dosis utilizadas correspondieron a las  $CI_{50}$  previamente reportadas para estos compuestos (Tabla 1).<sup>45</sup>

	$CI_{50}$	
	( $\mu\text{g/mL}$ )	$\mu\text{mol}$
Cisplatino <sup>®</sup>	68	226.7
Casiopeína <sup>®</sup> IIgly	14	31.5
Casiopeína <sup>®</sup> IIIia	21	47.2
Casiopeína <sup>®</sup> IIIIEa	8	18.6

Tabla 1.  $CI_{50}$  reportadas para las Cas IIgly, Cas IIIIEa y Cas IIIia en la línea celular de neuroblastoma CHP-212, a las 24 h de tratamiento.<sup>45</sup>

Se preparó un stock de  $2 \mu\text{g/mL}$  de cada Casiopeína<sup>®</sup> y de  $0.02 \mu\text{g/mL}$  de Cisplatino<sup>®</sup>, en un volumen final ( $V_2$ ) de 10 mL, utilizando agua bidestilada para disolver cada tratamiento. Se determinó el volumen de cada Cas y Cisplatino<sup>®</sup> que se debía tomar del stock, para obtener la  $CI_{50}$  de cada tratamiento en determinado volumen (Ecuación 2).

Una vez obtenido el  $V_1$  para cada tratamiento, este se filtró y se llevó a su respectivo  $V_2$ .

Los tratamientos fueron preparados el día de su administración.

$$V_1 = (V_2 C_2) / C_1$$

$V_1$  = Volúmen inicial

$V_2$  = volumen final

$C_1$  = Concentración inicial

$C_2$  = Concentración final

**Ecuación 2. Fórmula para determinar el volumen final ( $V_2$ ) o inicial ( $V_1$ ) de una sustancia.**

#### **4. ADMINISTRACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS E INCUBACIÓN**

Los diferentes tratamientos se aplicaron 24 h después de la siembra de las cajas de cultivo, para permitir así la recuperación de las células tras el proceso de tripsinización.

Se verificó la homogeneidad y adhesión de las células al microscopio y posteriormente se cambió el medio de cultivo a razón de 90% de medio y 10% del tratamiento. Así, para un  $V_2$  de 8 mL, se colocaron 7.2 mL de medio y 0.8 mL de tratamiento, homogenizando posteriormente.

Para cada tiempo de la cinética, se trabajaron a la vez 10 cajas de cultivo, hasta obtener las muestras por triplicado.

#### **5. FRACCIONAMIENTO CELULAR**

El fraccionamiento celular se llevó a cabo conforme a protocolo (BIO-RAD®) con la siguiente modificación: homogenización de las células por mezclado de vórtice continuo (manteniendo la cadena fría). Todas las determinaciones proteicas se llevaron a cabo en la fracción citosólica.

## 6. CUANTIFICACIÓN PROTEICA

La determinación de la concentración de la proteína se llevó a cabo mediante el método de Lowry por duplicado en una placa de 96 pozos (Corning<sup>®</sup>), se utilizó el kit Bio-Rad DC Protein Assay (BioRad Laboratories). Posteriormente se leyó la absorbancia en un lector de placa (DYNEX OPSYS<sup>™</sup>, DYNEX TECHNOLOGIES<sup>™</sup>) a 630 nm.

Una vez obtenidos los resultados se calculó la media para los valores de la curva patrón y se graficó por dispersión, obteniendo la línea de tendencia, regresión lineal y la ecuación de la recta, donde mediante despeje y sustitución, se obtuvo la concentración proteica de las muestras de interés expresada en µg/mL.

## 7. WESTERN BLOT

### Electroforesis

Utilizando la técnica de SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico), se prepararon los geles separadores y concentradores como se describe en la tabla 2.

Se montó la unidad de electroforesis adicionando buffer de corrida (Tris-Glicina) y se colocaron las muestras previamente desnaturalizadas durante 5 min a 94°C y adicionadas con buffer de carga en los pozos a razón de 10 µg de proteína por pozo. En paralelo se cargó el marcador de peso molecular de alto rango (12-225 KDa) (Rainbow, GE Healthcare<sup>®</sup>).

La electroforesis se llevó a cabo en cuarto frío (4°C), con los siguientes ajustes a la fuente de poder (GE Healthcare Life Sciences<sup>®</sup>): a 200 V, mA variable, durante 45 – 90 min, para 2 ó 4 geles respectivamente.

### GEL SEPARADOR

Reactivos	10%/8 mL*	10%/16 mL*
Bis/Acrilamida 0.8%/30% (Bio Rad®)	2.67 mL	5.34 mL
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2 mL	4 mL
ddH <sub>2</sub> O	3.17 mL	6.34 mL
10% SDS	80 µL	160 µL
TEMED (Bio Rad®)	5 µL	10 µL
APS (Bio Rad®)	60 µL	120 µL

### GEL CONCENTRADOR

Reactivos	4%/3 mL*	4%/6 mL*
Bis/Acrilamida 0.8%/30% (Bio Rad®)	400 µL	800 µL
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	750 µL	1.5 mL
ddH <sub>2</sub> O	1.8 mL	3.6 mL
10% SDS	30 µL	60 µL
TEMED (Bio Rad®)	5 µL	10 µL
APS (Bio Rad®)	20 µL	40 µL

Tabla 2. Características de los geles concentradores y separadores para la técnica de SDS-PAGE.

#### Transferencia

Se llevó a cabo utilizando membranas de nitrocelulosa (Bio Rad®), en transblot (GE Healthcare Life Sciences®) con buffer de transferencia (Tris-Glicina) 1X. Se cumplió con las siguientes características: 200 V y 400 mA / 50-75 min en el caso de 2 o cuatro pilas de montaje (papel filtro grueso, papel filtro delgado, membrana de nitrocelulosa, gel de electroforesis, papel filtro delgado, papel filtro grueso) empapadas en buffer de transferencia respectivamente. Se comprobó la transferencia mediante tinción con rojo de Ponceau, aplicándolo sobre las membranas de nitrocelulosa para evidenciar las bandas de proteína y posteriormente se lavaron con PBS 1X.

#### Bloqueo

Se cubrieron las membranas con solución de bloqueo: PBS 1x-leche (Svelty polvo 0% grasa) 2% y se incubaron a 4°C durante toda la noche en agitación continua en rocker (Daigger®).

### Anticuerpos

Las membranas se lavaron 3 veces con PBS 1X–Tween 20 (Sigma<sup>®</sup>) al 0.2% en agitación continua y en cuarto frío. Se colocó el anticuerpo primario en solución PBS 1X–Tween 20 (Sigma<sup>®</sup>) 0.2% -leche (Svelty polvo 0% grasa) 2% en la proporción 1:1000 de anticuerpo por solución. Se incubaron las membranas en agitación continua y en cuarto frío, durante toda la noche. Las membranas se lavaron nuevamente [con PBS 1X–Tween 20 (Sigma<sup>®</sup>) al 0.2%] y se colocó el anticuerpo secundario marcado para HRP, en una solución PBS 1X –Tween 20 (Sigma<sup>®</sup>) 0.2%-leche (Svelty polvo 0% grasa) 2%, en una proporción 1:2500 de anticuerpo secundario por solución. Las membranas se incubaron en agitación continua en cuarto frío durante toda la noche.

Para cada membrana se utilizó un anticuerpo diferente repitiendo el mismo procedimiento (Cuadro 2).

### Detección

Se detectó la expresión de los anticuerpos por quimioluminiscencia (Pierce<sup>®</sup>) en cuarto oscuro, realizando el proceso por triplicado sobre placas de rayos X (Amersham<sup>®</sup>).

### Análisis

Una vez obtenidas las placas de Western blot mediante revelado por quimioluminiscencia, se procesaron utilizando el programa ImageJ<sup>®</sup> v. 1.47e, para obtener la densidad óptica de las bandas correspondientes al peso molecular indicado para cada anticuerpo ( $\beta$ -tubulina, Bax, Bcl-2, Caspasa -3, Caspasa -7, Caspasa -10, citocromo C, BECN1, Map LC3-B, ERK 1/2, p-38  $\alpha$ , NF- $\kappa$ B) en todos

los tratamientos. La densidad óptica, se expresó en unidades relativas, lo cual permitió cuantificar indirectamente la concentración de las moléculas y realizar el análisis estadístico.

ANTICUERPO PRIMARIO		ANTICUERPO SECUNDARIO	
Anticuerpo	Descripción	Anticuerpo	Descripción
<b>β-Tubulina (Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>, H-235)</b>	Policlonal de conejo IgG	IgG de burro anti-conejo. (Santa Cruz Biotechnology <sup>®</sup> sc-2313).	
<b>Caspasa -10 (Sigma<sup>®</sup>)</b>	Policlonal de conejo		
<b>Anti MAP cinasa ERK1/ERK2 (Calbiochem<sup>®</sup>, 333-367)</b>	Policlonal de conejo		
<b>Bax (Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>, B-9)</b>	Monoclonal de ratón IgG <sub>2b</sub>	Burro anti-ratón (Santa Cruz Biotechnology <sup>®</sup> sc-2313).	
<b>Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>, C-2)</b>	Monoclonal de ratón IgG <sub>1</sub>		
<b>Caspasa -7 (Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>, B-5)</b>	Monoclonal de ratón, p20 IgG		
<b>NFκB (Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>, E-10)</b>	Monoclonal de ratón p50 IgG <sub>1</sub>		
<b>Caspasa -3 (Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>, k-19)</b>	Policlonal de cabra p11 IgG	Burro anti-cabra IgG (Santa Cruz Biotechnology <sup>®</sup> sc-2020).	
<b>BECN1 (Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>, D-18)</b>	Policlonal de cabra IgG		
<b>MAP-LC3β (Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>, N-20)</b>	Policlonal de cabra IgG		

Cuadro 2. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para detección de la expresión de apoptosis, autofagia y sobrevivencia/proliferación en la línea celular CHP-212 de NB como resultado del tratamiento con diferentes Cas, Cisplatino<sup>®</sup> y células sin tratar.

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se procesaron los datos obtenidos mediante el programa ImageJ<sup>®</sup> v. 1.47e, utilizando el programa IBM<sup>®</sup> SPSS<sup>®</sup> Statistics versión 20, se obtuvo para cada variable la media, desviación estándar y se llevó a cabo una prueba paramétrica mediante el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

## IV. RESULTADOS

A partir de cultivos de la línea celular de neuroblastoma CHP-212 tratados con diferentes Casiopeínas<sup>®</sup> (IIgly, IIIEa y IIIia), Cisplatino<sup>®</sup> (control de tratamiento) y un grupo control de células sin tratar, se extrajo la fracción citosólica a las 2, 10 y 24 horas posteriores al tratamiento, con la finalidad de determinar el momento en el que se presentan los procesos apoptótico, autofágico y de proliferación. Se empleó la técnica de Western blot para determinar la presencia de diferentes moléculas que intervienen en estos procesos. Cada experimento se realizó por cuadruplicado. Utilizando el programa ImageJ<sup>®</sup> v. 1.47e se obtuvo la densidad relativa de cada placa de Western blot y se llevó a cabo una prueba paramétrica de análisis de varianza (ANOVA), utilizando el programa IBM<sup>®</sup> SPSS<sup>®</sup> Statistics versión 20, con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

### 1. EVALUACIÓN DE APOPTOSIS

Se determinó la presencia de las moléculas: Bax, Bcl-2, procaspasa -3, caspasa -3, procaspasa -7, caspasa -7, procaspasa -10, caspasa -10 y citocromo C.

#### ❖ Expresión y ruptura de procaspasa -7.

- 2, 10 y 24 horas postratamiento

**a)** No se encontró la presencia de esta molécula ni de su forma activa (caspasa -7) en el espacio citosólico bajo tratamiento con Cas IIgly, Cas IIIEa, Cas IIIia, Cisplatino<sup>®</sup>, ni en el grupo control (Figura 6).

❖ Expresión y ruptura de procaspasa -10.

- 2 y 10 horas postratamiento

**a)** Después de los diferentes tratamientos así como en el grupo control, se evidenció la presencia de esta molécula (Figura 7 y 8); sin embargo, el estímulo de la expresión de esta procaspasa no indujo la ruptura de la misma hacia su forma activa, la caspasa -10 (Figura 6).

- 24 horas postratamiento

**a)** Únicamente se encontró la expresión de esta molécula bajo el tratamiento con Cas IIgly y Cas IIIEa (Figura 9). No hay evidencia de la ruptura de la procaspasa -10 a su forma activa la caspasa -10 (Figura 6).

❖ Expresión y ruptura de procaspasa -3.

- 2 horas postratamiento

**a)** Bajo tratamiento con Cas IIgly, Cas IIIEa, Cisplatino<sup>®</sup> y en el grupo control, se demostró la presencia de procaspasa -3, así como su ruptura y conversión a la forma activa, caspasa -3 (Figura 7).

**b)** El tratamiento con Cas IIIia, mostró la presencia de procaspasa -3; sin embargo, no hay evidencia que demuestre la ruptura de esta hacia su forma activa (Figura 7).

- 10 y 24 horas postratamiento

**a)** Bajo la administración de los diferentes tratamientos (Cas IIgly, Cas IIIEa, Cas IIIia, Cisplatino<sup>®</sup>) así como en el grupo control, se determinó que no hay expresión de procaspasa -3 ni de su forma activa (Figura 8 y 9).

❖ Expresión de citocromo C.

- 2 horas postratamiento

**a)** En todos los tratamientos, se demostró la presencia de cit. C (Figura 8). La expresión de esta molécula, puso de manifiesto que la vía de apoptosis favorecida es la intrínseca o mitocondrial, aunado a la expresión de la caspasa efectora -3 y a la ausencia de la caspasa -10, que es indicativa de la vía extrínseca de la apoptosis.

**b)** El grupo control no mostró la presencia de cit C citosólico (Figura 7).

- 10 horas postratamiento

**a)** Tanto para los diferentes tratamientos (Cas IIgly, Cas IIIEa, Cas IIIia, Cisplatino<sup>®</sup>), como para el grupo control; se observó la presencia de cit. C (Figura 8). Sin embargo, la expresión de este marcador no ayudó a inducir la muerte celular por apoptosis, dada la ausencia de las caspasas efectoras -3 y -7.

- 24 horas postratamiento

**a)** Bajo la administración de los diferentes tratamientos (Cas IIgly, Cas IIIEa, Cas IIIia, Cisplatino<sup>®</sup>) y en el grupo control, no se observó la expresión de cit. C (Figura 9).

❖ Expresión de miembros de la familia Bcl-2.

- 2 horas postratamiento

**a)** Los diferentes tratamientos y el grupo control, mostraron la presencia de las moléculas Bax y Bcl-2 (Figura 7).

**b)** La proporción de Bax/Bcl-2, determina la sensibilidad a la apoptosis, ya que actúa como un reóstato (Figura 10). La expresión de esta relación entre tratamientos y grupo control corresponde a:

Control > Cisplatino > Cas IIgly > Cas IIIia > Cas IIIEa

- 10 y 24 horas postratamiento

**a)** Tanto para los diferentes tratamientos (Cas IIgly, Cas IIIEa, Cas IIIia, Cisplatino), como para el grupo control; no se encontró la presencia de las moléculas Bax y Bcl-2 (Figura 8 y 9).

❖ Prueba de ANOVA ( $p < 0.05$ )

- 2 horas postratamiento

**a)** *Tratamiento con Cas IIgly.* Se determinó que las moléculas que demostraron diferencia estadísticamente significativa en su expresión entre tratamientos son: Bcl-2, procaspasa -3, caspasa -3, procaspasa -10 y cit. C; por otro lado, la molécula que no demostró esta diferencia en su expresión entre tratamientos fue Bax en comparación con Cisplatino y Cas IIIEa (Tabla 3).

**b)** *Tratamiento con Cas IIIEa.* Se evidenció que las moléculas que demuestran expresión estadísticamente significativa entre tratamientos son Bcl-2, procaspasa -3, caspasa -3, procaspasa -10 y cit. C; la expresión de la molécula que no muestra diferencia estadística entre tratamientos es Bax comparada con los tratamientos Cas IIgly y Cas IIIia (Tabla 3).

**c)** *Tratamiento con Cas IIIia.* Se demostró que la expresión de las moléculas Bcl-2, procaspasa -3, procaspasa -10 y cit. C son estadísticamente diferentes; mientras que la expresión de las moléculas que no demostraron diferencia

estadística entre tratamientos son: Bax al ser comparado con Cas IIIEa y caspasa -3 al compararse con el grupo control (Tabla 3).

**d) Tratamiento con Cisplatino.** Se demuestra que no hay diferencia estadísticamente significativa en la expresión de Bax y al ser comprada con el tratamiento con Cas IIgly. Para la molécula Bcl-2 no hay diferencia estadística en su expresión en comparación con el grupo control. La expresión de las moléculas procaspasa -3, caspasa -3, procaspasa -10 y cit. C son diferentes estadísticamente entre tratamientos (Tabla 3).

**e) Grupo control.** Se demuestra que hay diferencia estadística en la expresión de las moléculas Bax, procaspasa -3, procaspasa -10 y cit. C; mientras que no hay diferencia estadística para Bcl-2 en comparación con el grupo tratado con Cisplatino; así como no lo hay para caspasa -3 en comparación con el tratamiento Cas IIIa donde no hay expresión de esta molécula (Tabla 3).

#### Apoptosis 2 h

	Control	Cisplatino	Cas IIgly	Cas IIIEa	Cas IIIa
<b>Bax</b>	38141.35 <sup>a</sup>	25060.82 <sup>b</sup>	25630.10 <sup>b,c</sup>	27308.79 <sup>c,d</sup>	28877.58 <sup>d</sup>
<b>Bcl-2</b>	12297.03 <sup>a</sup>	12506.87 <sup>a</sup>	19075.22 <sup>b</sup>	24464.79 <sup>c</sup>	21921.71 <sup>d</sup>
<b>Procaspa -3</b>	5753.10 <sup>a</sup>	19601.00 <sup>b</sup>	27108.44 <sup>c</sup>	10317.71 <sup>d</sup>	15558.48 <sup>e</sup>
<b>Caspasa -3</b>	316.12 <sup>a</sup>	22996.78 <sup>b</sup>	30224.79 <sup>c</sup>	24699.18 <sup>d</sup>	0 <sup>a</sup>
<b>Procaspa -10</b>	29775.07 <sup>a</sup>	36894.46 <sup>b</sup>	8008.26 <sup>c</sup>	14031.29 <sup>d</sup>	0 <sup>e</sup>
<b>Citocromo C</b>	0 <sup>a</sup>	9366.89 <sup>b</sup>	11823.49 <sup>c</sup>	27576.15 <sup>d</sup>	45796.35 <sup>e</sup>

Tabla 3. Análisis estadístico ANOVA ( $p < 0.05$ ). Comparación entre tratamientos a las 2 h de tratamiento para la densidad relativa de cada molécula. Las literales diferentes entre variables de la misma fila poseen diferencia estadísticamente significativa.

- 10 horas postratamiento

**a) Tratamiento con Cas IIgly.** Se demuestra que la expresión de procaspasa -10 es significativa en comparación con los otros grupos de tratamiento; sin embargo, en la expresión de cit. C no hay diferencias estadísticas al comparar con el grupo control (Tabla 4).

**b) Tratamiento con Cas IIIEa.** Se determina que la expresión de procaspasa -10 no muestra diferencia estadística al compararse con el tratamiento con Cas IIIa; la expresión de cit. C es diferente estadísticamente al compararse con los otros grupos de tratamiento (Tabla 4).

**c) Tratamiento con Cas IIIa.** Se demuestra que cit. C es estadísticamente diferente al comparar con los otros grupos de tratamiento, mientras que la expresión de procaspasa -10 no es estadísticamente diferente en comparación con los tratamientos con Cisplatino y Cas IIIEa (Tabla 4).

**d) Tratamiento con Cisplatino.** Se demuestra diferencia estadísticamente significativa para la expresión de las moléculas procaspasa -10 y cit. C al comparar con los otros grupos de tratamiento (Tabla 4).

**e) Grupo control.** Se evidencia que la procaspasa -10 es estadísticamente significativa; sin embargo, el cit. C no demuestra diferencia estadística comparado con Cas IIgly pero si al compararlo con el resto de los tratamientos administrados. (Tabla 4).

### Apoptosis 10 h

	Control	Cisplatino	Cas Ilgly	Cas III Ea	Cas III a
<b>Procaspsa -10</b>	26105.03 <sup>a</sup>	30834.85 <sup>b</sup>	37709.84 <sup>c</sup>	33743.12 <sup>d</sup>	31374.07 <sup>b,d</sup>
<b>Citocromo C</b>	9409.59 <sup>a</sup>	26539.30 <sup>b</sup>	10695.74 <sup>a</sup>	5889.14 <sup>c</sup>	17600.39 <sup>d</sup>

Tabla 4. Análisis estadístico ANOVA ( $p < 0.05$ ). Comparación entre tratamientos a las 10 h de administración, para la densidad relativa de cada molécula. Las literales diferentes entre variables de la misma fila poseen diferencia estadísticamente significativa.

- 24 horas postratamiento

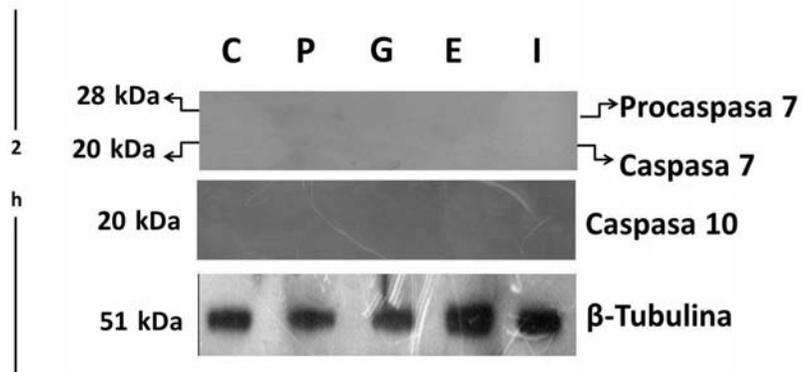
a) *Tratamiento con Cas Ilgly y Cas III Ea.* Se mostró que la expresión de procaspasa -10 es estadísticamente significativa entre tratamientos (Tabla 5).

### Apoptosis 24 h

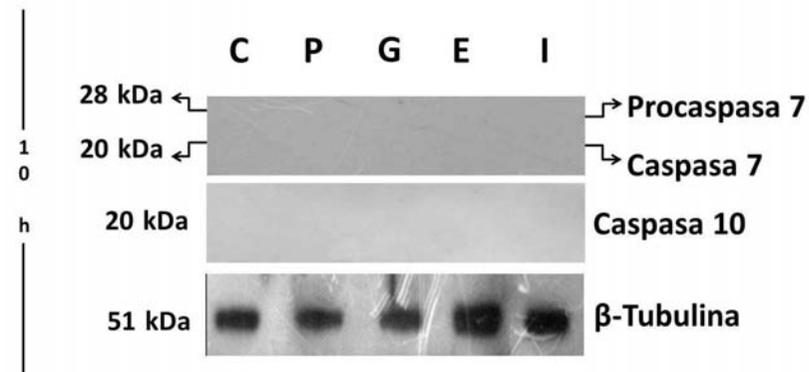
	Control	Cisplatino	Cas Ilgly	Cas III Ea	Cas III a
<b>Procaspsa -10</b>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	36990.09 <sup>b</sup>	22358.35 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>

Tabla 5. Análisis estadístico ANOVA ( $p < 0.05$ ). Comparación entre tratamientos a las 24 h de administración, para la densidad relativa de cada molécula. Las literales diferentes entre variables en la misma fila son estadísticamente significativas.

A)



B)



C)

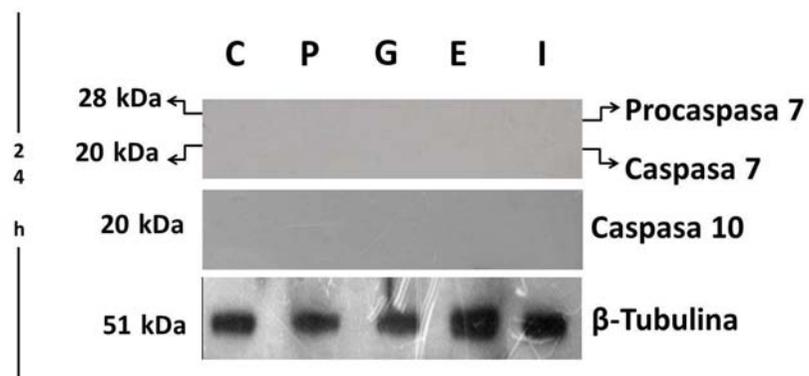


Figura 6. Determinación de los marcadores de apoptosis (Procaspasa -7, Caspasa -7 y Caspasa -10) en la línea celular CHP-212. Utilizando la fracción citosólica, con Cisplatino® (control positivo) y las Cas IIgly, III Ea, Cas IIIa y células sin tratar como grupo control.  $\beta$ -Tubulina como control de carga. A) Ausencia de la expresión de los marcadores a 2 h de tratamiento. B) Ausencia de la expresión de los marcadores a 10 h de tratamiento. C) Ausencia de la expresión de los marcadores a 24 h de tratamiento.

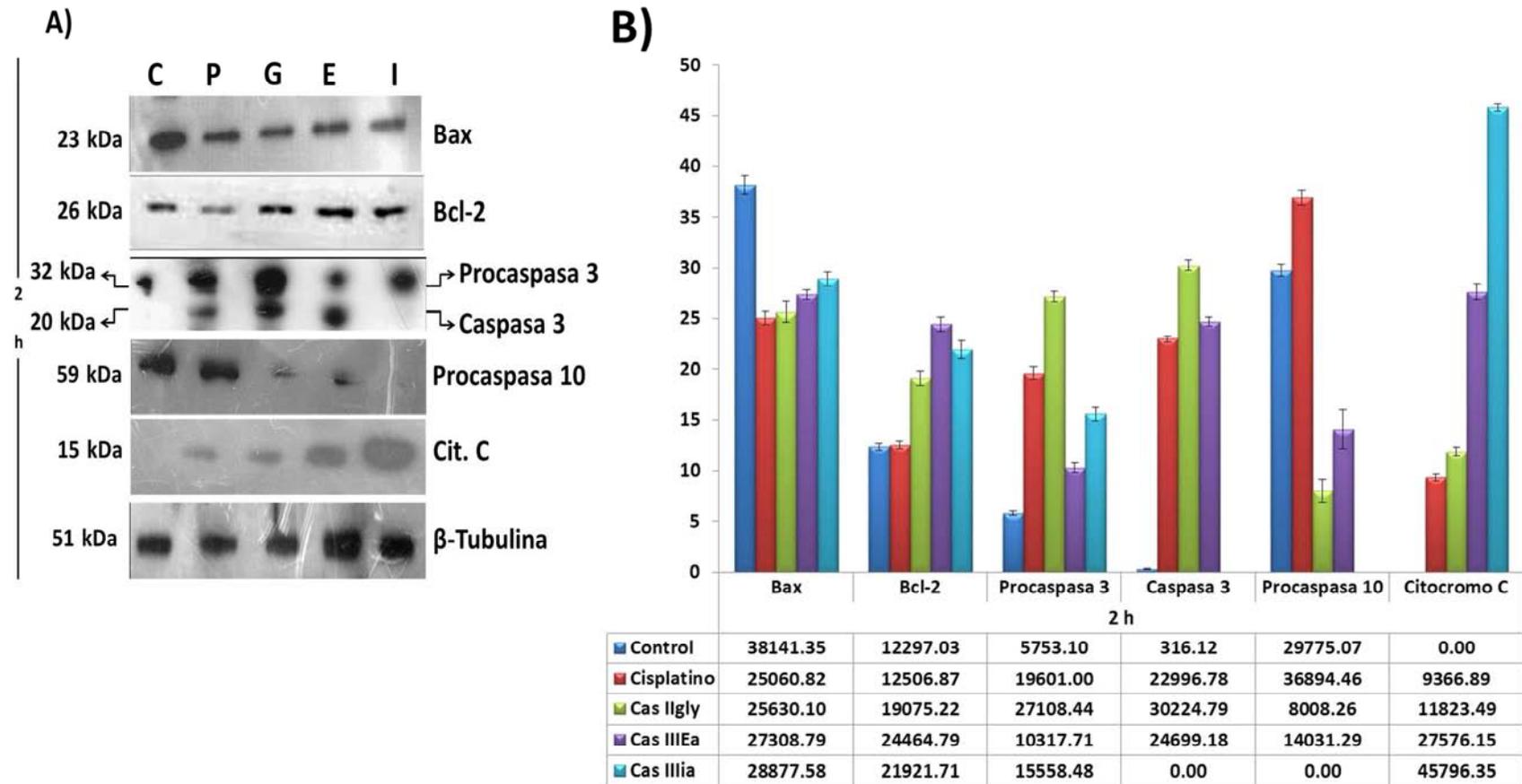


Figura 7. Muerte celular por apoptosis en la línea celular CHP-212 de NB, utilizando la fracción citosólica, a 2 h de tratamiento con Cisplatino como tratamiento control y las Cas IIgly, III Ea y III Ia, utilizando células sin tratar como grupo control, mediante la técnica de Western blot. A) Expresión de los marcadores apoptóticos Bax, Bcl-2, Procaspasa -3, Caspasa -3, Procaspasa -10 y cit. C, además de  $\beta$ -Tubulina como control de carga. B) Los resultados muestran la  $\bar{X} \pm DE$  (n=4) en unidades relativas de las moléculas apoptóticas.

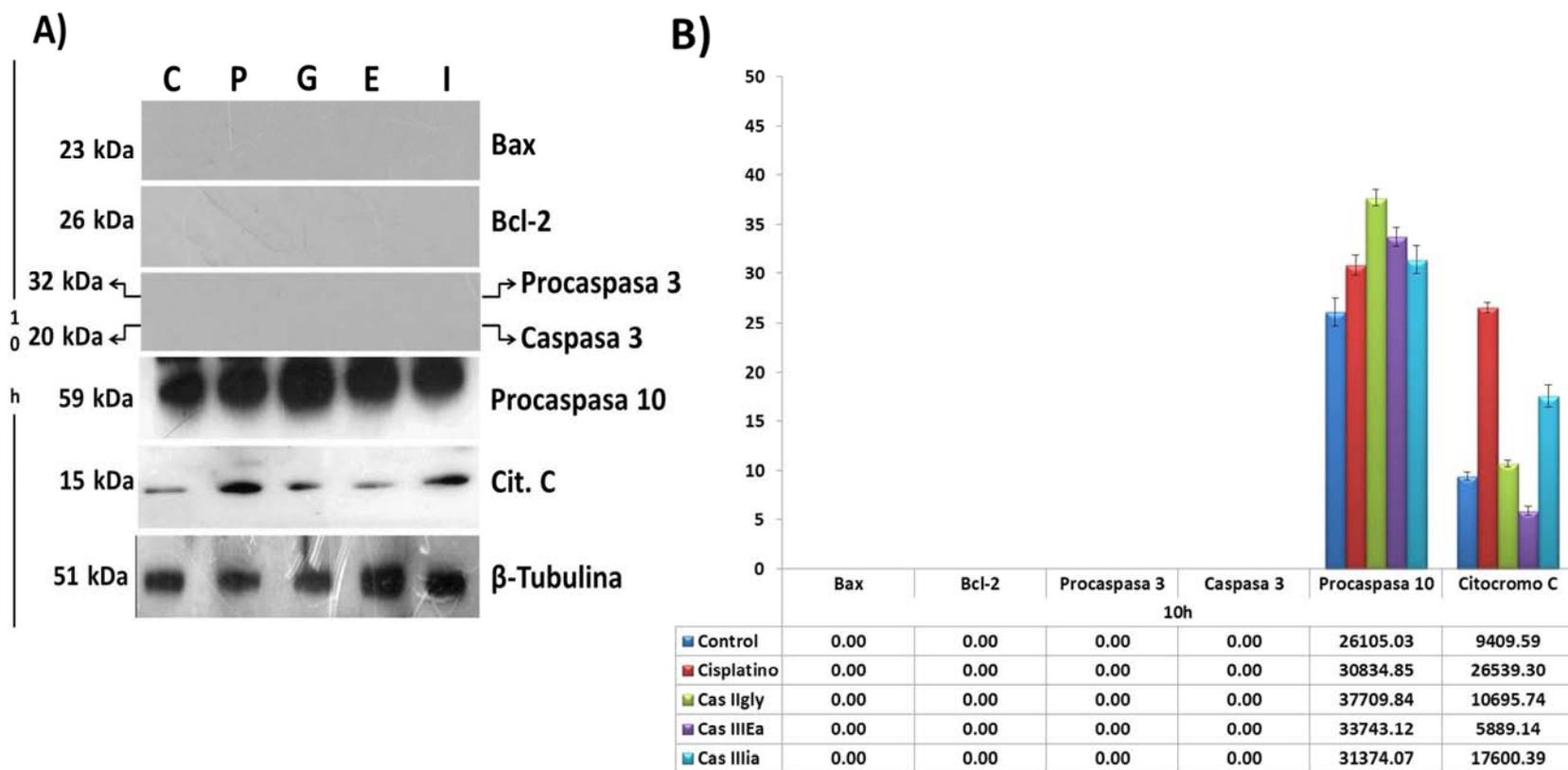


Figura 8. Muerte celular por apoptosis en la línea celular CHP-212 de NB. Utilizando la fracción citosólica de células con 10 h de tratamiento con Cisplatino®, y las Cas IIgly, III Ea y III Ia, utilizando células sin tratar como grupo control. A) Expresión de los marcadores apoptóticos Procaspasa -10 y cit. C, así como  $\beta$ -Tubulina como control de carga. B) Los resultados muestran la  $\bar{x} \pm DE$  (n=4) en unidades relativas de las moléculas apoptóticas expresadas por Western blot.

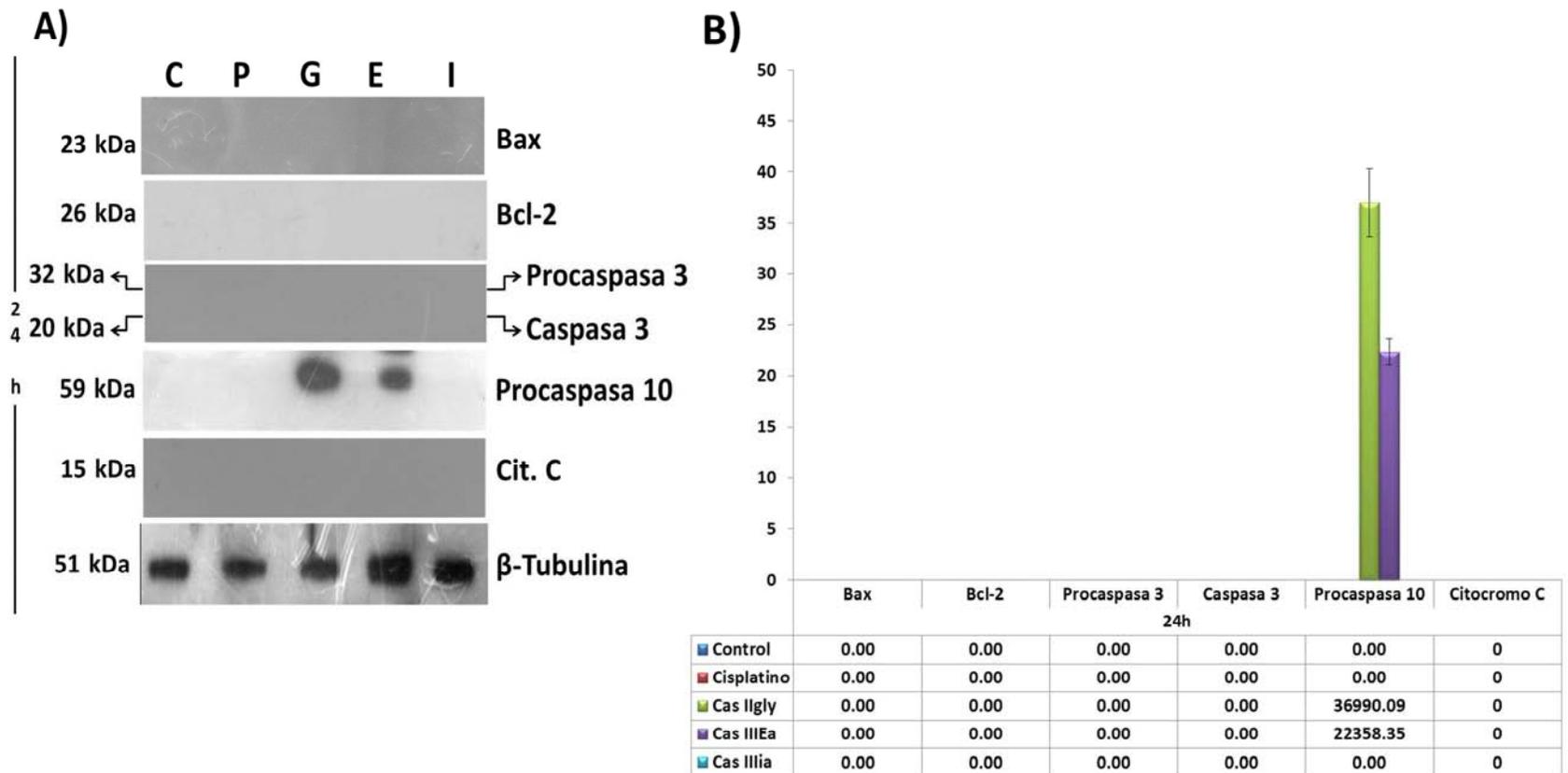


Figura 9. Muerte celular por apoptosis en la línea celular CHP-212. Utilizando la fracción citosólica después de 24 h de tratamiento con Cisplatino® como control positivo y las Cas IIgly, III Ea y III Ia, utilizando células sin tratar como grupo control. A) Expresión del marcador apoptótico Procaspasa -10 y  $\beta$ -Tubulina como control de carga. B) Los resultados muestran la  $\bar{x} \pm DE$  (n=4) en unidades relativas de la expresión de las moléculas apoptósicas.

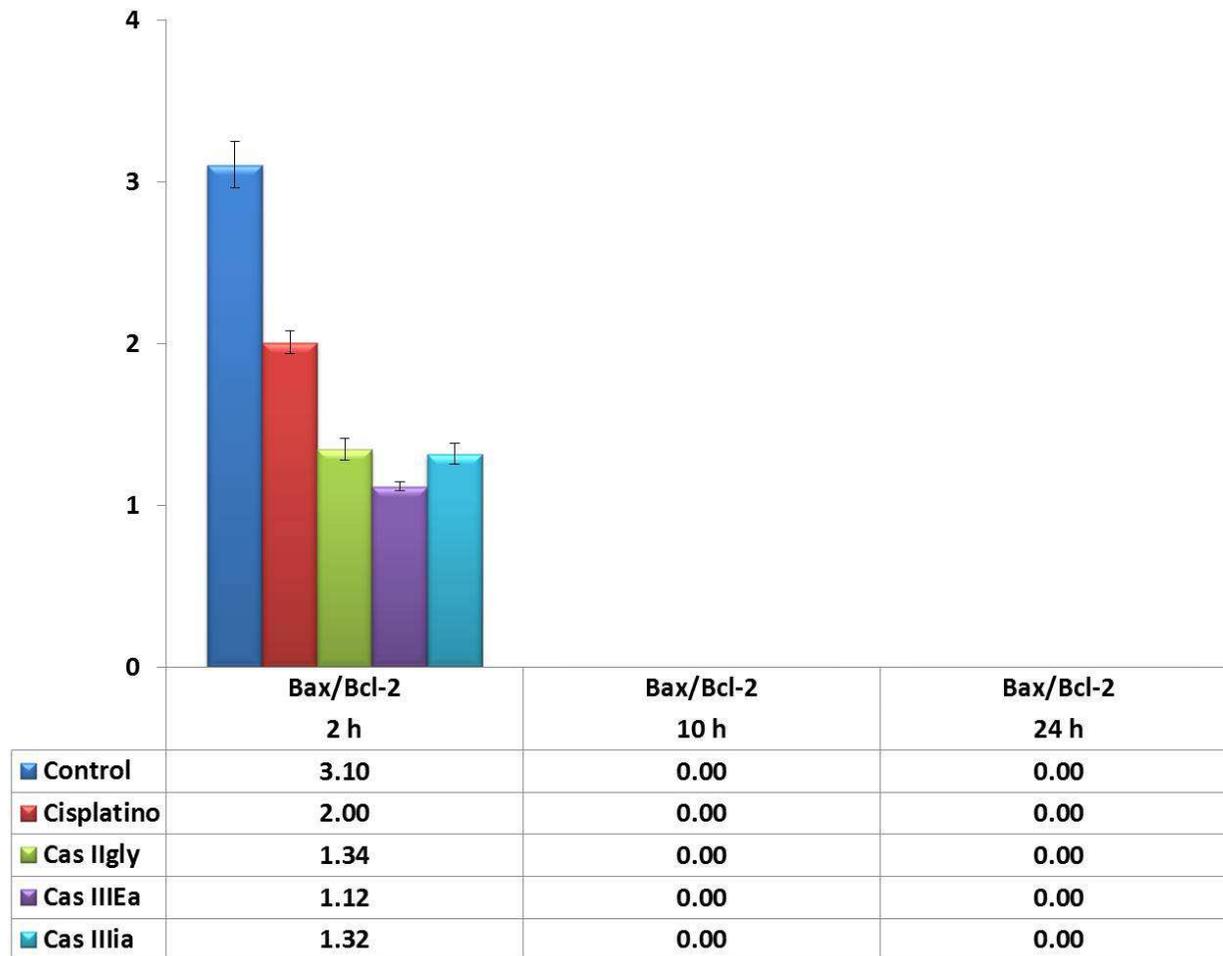


Figura 10. Los resultados muestran la  $\bar{x} \pm DE$  en unidades relativas de la relación Bax/Bcl-2 a las 2, 10 y 24 h después de aplicados los tratamientos con Cisplatino® (control positivo) y las Cas IIgly, III Ea y III a, utilizando como control células sin tratar.

## 2. EVALUACIÓN DE AUTOFAGIA

Se determinó la presencia de los marcadores de autofagia: BECN1, LC3B-I, LC3B-II.

### ❖ Expresión de BECN1.

- 2 y 10 horas postratamiento

**a)** Bajo tratamiento con Cas Ilgly, Cas III Ea, Cas III a, Cisplatino y en el grupo control, se encontró la expresión de esta molécula. La presencia de BECN1 es indicativa de la activación del proceso autofágico (Figura 11 y 12).

- 24 horas postratamiento

**a)** No se observó la expresión de este marcador bajo tratamiento con Cas Ilgly, Cas III Ea, Cas III a, Cisplatino y en el grupo control (Figura 13).

### ❖ Expresión de LC3B-I y LC3B-II.

- 2 horas postratamiento

**a)** En el citosol de los grupos control y tratado con Cas Ilgly, no se encontró la expresión de estos dos marcadores (Figura 11).

**b)** El tratamiento con Cas III Ea, Cas III a y Cisplatino, permitió la expresión de estos marcadores (Figura 11). La proporción de conversión de LC3B-I a LC3B-II, es indicativo de la acumulación de vesículas autofágicas (Figura 14).

Comparativamente, el grado de conversión entre tratamientos es:

Cas III Ea > Cisplatino > Cas III a > Cas Ilgly = Control

- 10 horas postratamiento

**a)** El tratamiento con Cas Ilgly, Cas III Ea, Cas III a, mostró la expresión de ambos marcadores (Figura 12). La proporción de conversión de LC3B-I a LC3B-II

indica la acumulación de vesículas autofágicas, siendo este grado de conversión más elevado en las células tratadas con Cas IIgly y en menor grado en las células tratadas con Cisplatino (Figura 14):

Cas IIgly > Cas IIIEa > Cas IIIia > Cisplatino > Control

**b)** En el grupo control no se encontró la presencia de estos marcadores, por lo cual no hay evidencia que indique la acumulación de vesículas autofágicas (Figura 12).

- 24 horas postratamiento

**a)** No se demostró la presencia de este marcador, bajo tratamiento con Cas IIgly, Cas IIIEa, Cas IIIia, Cisplatino ni en el grupo control (Figura 13).

❖ Prueba de ANOVA ( $p < 0.05$ ).

- 2 horas postratamiento

**a)** Bajo tratamiento con Cas IIgly, se demostró que la expresión de BECN1 es estadísticamente significativa en comparación con otros tratamientos (Tabla 6).

**b)** Bajo tratamiento con Cas IIIEa y Cisplatino, se encontró que los 3 marcadores (BECN1, LC3B-I y LC3B-II) muestran diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (Tabla 6).

**c)** El tratamiento con Cas IIIia, mostró que los 3 marcadores tuvieron diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (Tabla 6). Esto concuerda con la ausencia de apoptosis a las 2 horas después de administrados los tratamientos.

### Autofagia 2 h

	Control	Cisplatino	Cas IIgly	Cas IIIEa	Cas IIIa
<b>BECN1</b>	25281.42 <sup>a</sup>	33537.06 <sup>b</sup>	31185.12 <sup>c</sup>	8546.77 <sup>d</sup>	13174.25 <sup>e</sup>
<b>LC3B-I</b>	0 <sup>a</sup>	21776.05 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	38228.93 <sup>c</sup>	8022.76 <sup>d</sup>
<b>LC3B-II</b>	0 <sup>a</sup>	19324.55 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	31095.92 <sup>c</sup>	16526.35 <sup>d</sup>

**Tabla 6.** Análisis estadístico ANOVA ( $p < 0.05$ ). Comparación entre tratamientos a las 2 h de administración, para la densidad relativa de cada molécula. Las literales diferentes entre variables en la misma fila, son estadísticamente significativas.

- 10 horas postratamiento

**a)** El tratamiento con Cas IIgly, mostró que para las moléculas LC3B-I y LC3B-II hay diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos; sin embargo, la molécula BECN1 comparada con el grupo control, no muestra diferencia estadísticamente significativa (Tabla 7).

**b)** Las células tratadas con Cas IIEa, muestran diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos para los marcadores LC3B-I y LC3B-II; sin embargo BECN1 no muestra esta diferencia en comparación con el grupo tratado con Cisplatino (Tabla 7).

**c)** En el tratamiento con Cas IIIa, el análisis estadístico muestra diferencia significativa entre tratamientos para los 3 marcadores (Tabla 7).

**d)** Bajo tratamiento con Cisplatino, se demuestra diferencia estadísticamente significativa de los marcadores LC3B-I y LC3B-II en comparación con otros tratamientos; en tanto que la molécula BECN1 no muestra diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo tratado con Cas IIIEa (Tabla 7).

e) En el grupo control, se observa que la expresión de BECN1 no es muestra diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo tratado con Cas IIgly (Tabla 7).

<b>Autofagia 10 h</b>					
	<b>Control</b>	<b>Cisplatino</b>	<b>Cas IIgly</b>	<b>Cas III Ea</b>	<b>Cas III a</b>
<b>BECN1</b>	14510.03 <sup>a</sup>	22649.22 <sup>b</sup>	14176.42 <sup>a</sup>	23175.65 <sup>b</sup>	10052.51 <sup>c</sup>
<b>LC3B-I</b>	0 <sup>a</sup>	8484.03 <sup>b</sup>	52472.95 <sup>c</sup>	49844.03 <sup>d</sup>	27460.09 <sup>e</sup>
<b>LC3B-II</b>	0 <sup>a</sup>	23074.28 <sup>b</sup>	30266.96 <sup>c</sup>	45557.76 <sup>d</sup>	26362.07 <sup>e</sup>

Tabla 7. Análisis estadístico ANOVA ( $p < 0.05$ ). Comparación entre tratamientos a las 10 h de administración para la densidad relativa de cada molécula. Las literales diferentes entre variables en la misma fila son estadísticamente significativas.

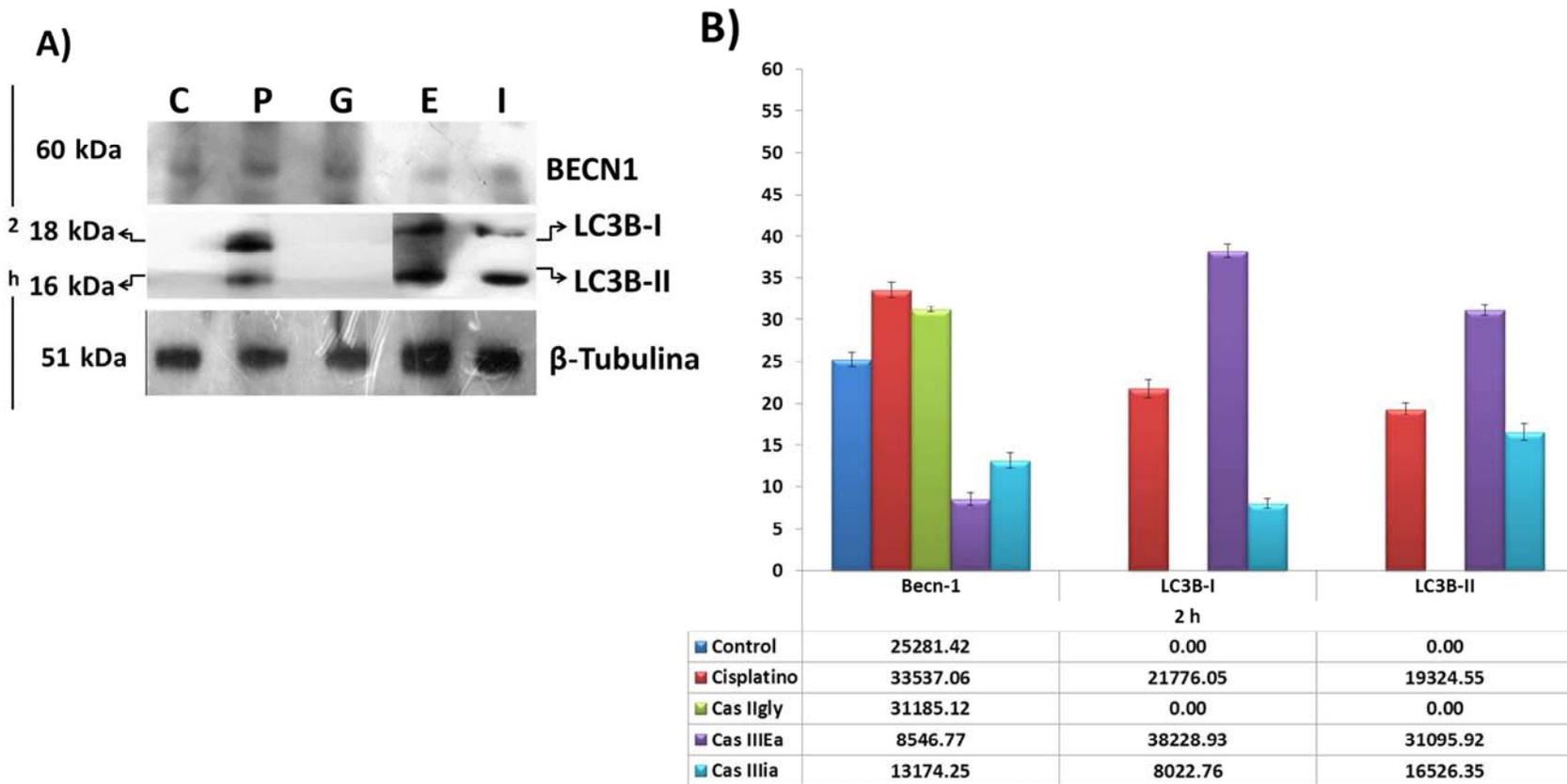


Figura 11. Determinación de autofagia en la línea celular CHP-212 de NB. Utilizando la fracción citosólica, a las 2 h de tratamiento con Cisplatino® como control positivo y las Cas IIgly, III Ea y III ia, así como células sin tratar como grupo control. A) Expresión de los marcadores autofágicos BECN1, LC3B-I, LC3B-II y  $\beta$ -Tubulina como control de carga. B) Los resultados muestran la  $\bar{x} \pm DE$  (n=4) en unidades relativas de las moléculas apoptósicas.

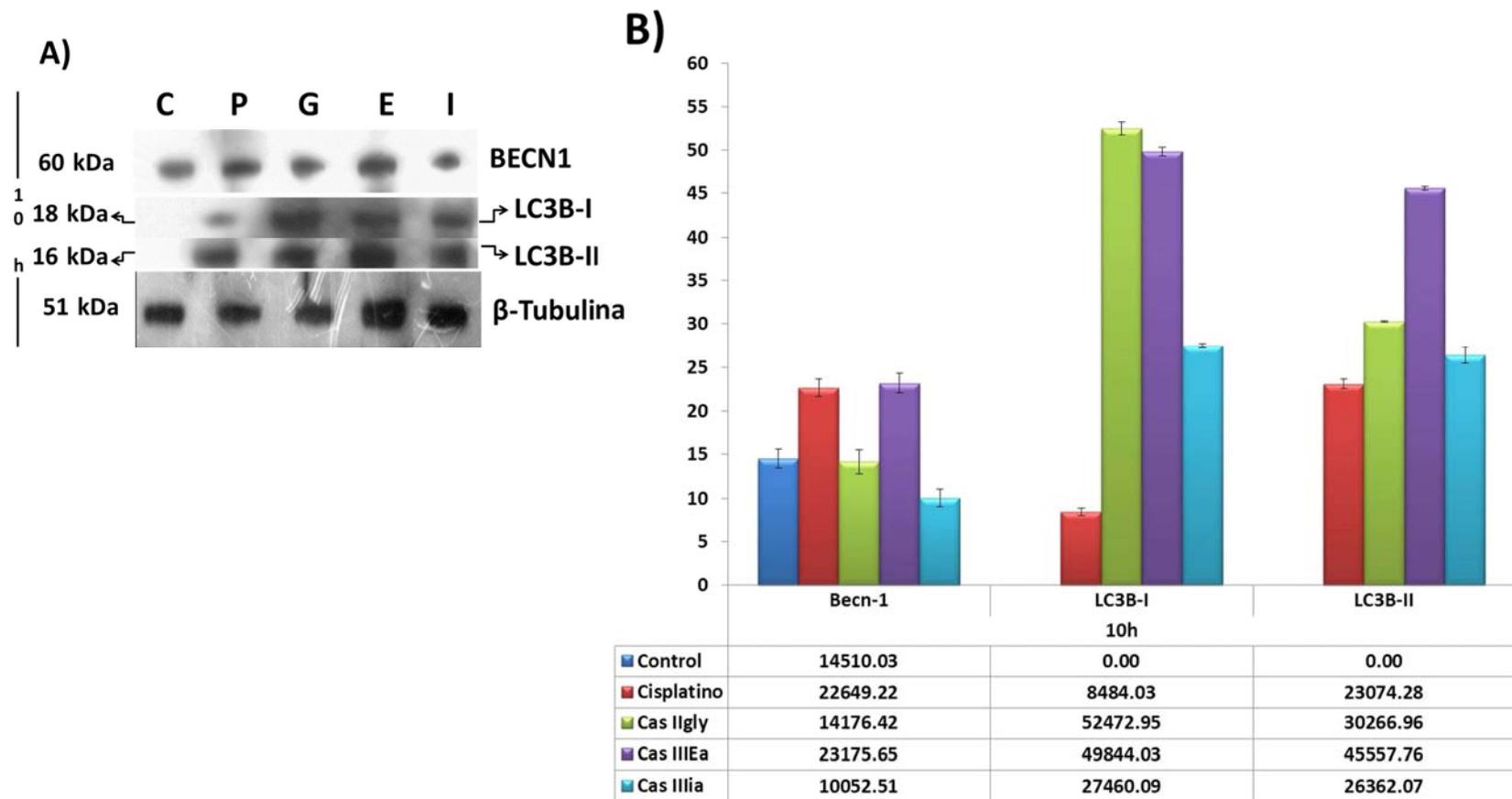


Figura 12. Determinación de autofagia en la línea celular CHP-212. Utilizando la fracción citosólica a las 10 h de tratamiento con Cisplatino® (control positivo) y las Cas Igly, III Ea y III Ia, además de células sin tratar como grupo control. A) Expresión de los marcadores autofágicos BECN1, LC3B-I y LC3B-II, así como  $\beta$ -Tubulina como control de carga. B) Los resultados muestran la  $\bar{x} \pm DE$  (n=4) en unidades relativas de las moléculas apoptósicas.

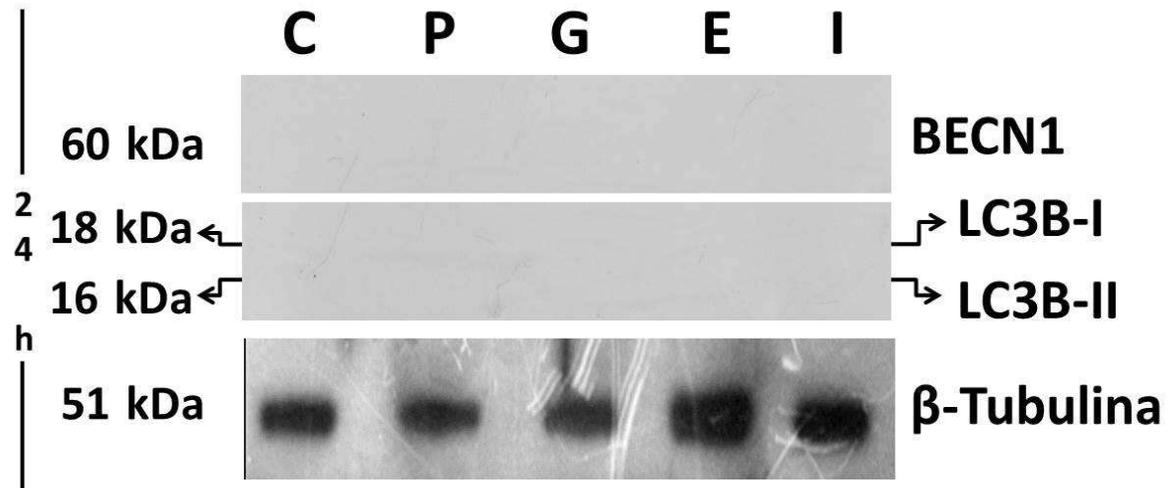


Figura 13. Ausencia de los marcadores de autofagia (BECN1, LC3B-I y LC3B-II) en la línea celular CHP-212 de NB. Utilizando la fracción citosólica a las 24 h post tratamiento con Cisplatino<sup>®</sup> (control positivo), Cas IIgly, Cas III Ea, Cas IIIa y células sin tratar como grupo control.  $\beta$ -Tubulina como control de carga.

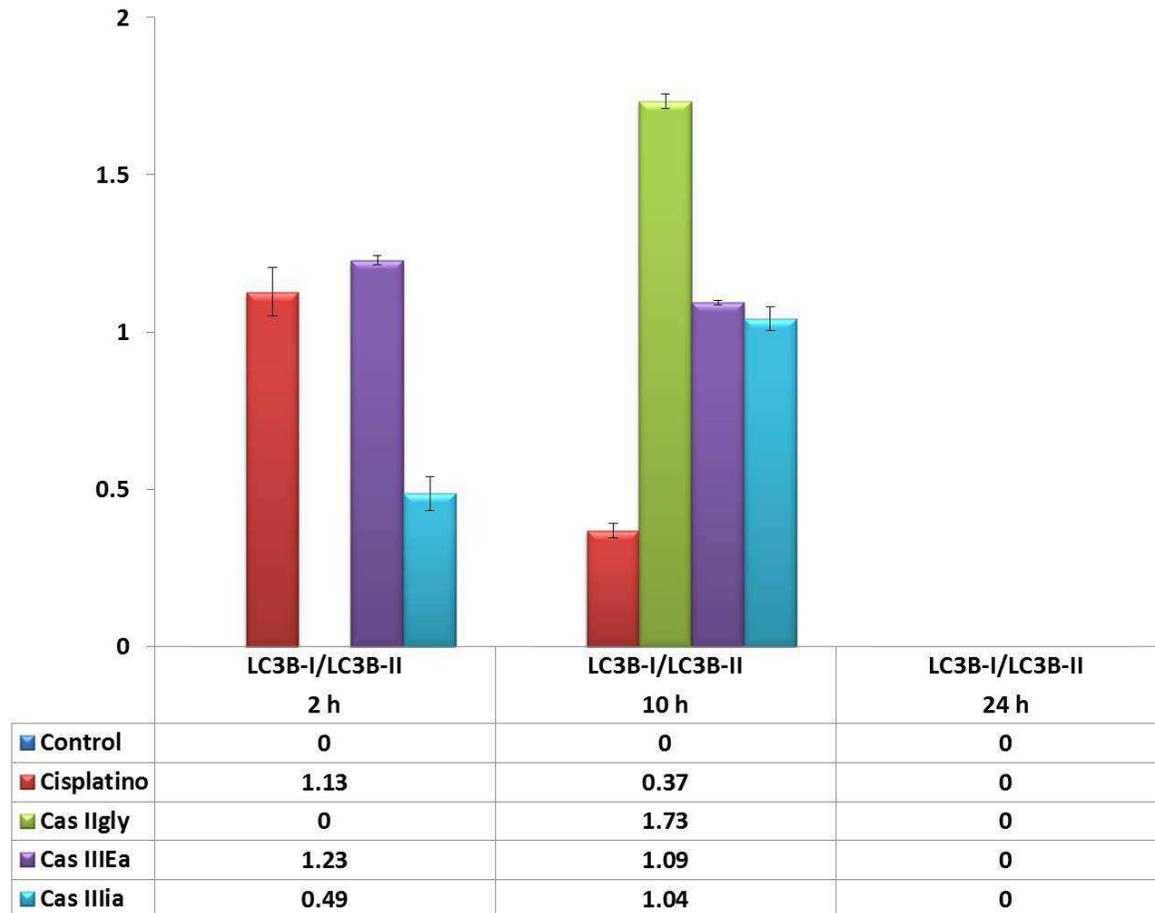


Figura 14. Los resultados muestran la  $\bar{X} \pm DE$  en unidades relativas de la proporción LC3B-II/LC3B-I a las 2, 10 y 24 h después de aplicados los tratamientos con Cisplatino® (control positivo) y las Cas IIgly, III Ea y III ia, utilizando como control células sin tratar.

### 3. EVALUACIÓN DE SOBREVIVENCIA/PROLIFERACIÓN CELULAR

Se determinó la presencia de los marcadores de sobrevivencia: ERK1, ERK2 y NF- $\kappa$ B.

#### ❖ Expresión de marcadores de sobrevivencia.

- 2 y 10 horas postratamiento

a) En las células tratadas con Cas IIgly, Cas IIIEa, Cas IIIia, Cisplatino y en el grupo control, no se observó la expresión de estos marcadores (Figura 15).

- 24 horas postratamiento

a) En todos los grupos: tratamiento con Cas IIgly, Cas IIIEa, Cas IIIia, Cisplatino y el grupo control, se demostró la presencia de los 4 marcadores en el espacio citosólico (Figura 16).

#### ❖ Prueba de ANOVA ( $p < 0.05$ ).

- 24 horas post tratamiento

a) Bajo tratamiento con Cas IIgly, se demuestra que ERK1 es estadísticamente diferente comparado con los otros tratamientos; ERK2 no muestra diferencia estadísticamente significativa comparado con el control ni con Cas IIIia; la expresión de NF- $\kappa$ B no es estadísticamente diferente en comparación con Cisplatino (Tabla 8).

b) El tratamiento con Cas IIIEa, demuestra que la expresión de las tres moléculas presenta diferencias estadísticamente significativas en comparación con los otros tratamientos (Tabla 8).

c) El análisis del tratamiento con Cas IIIia no mostró diferencia estadísticamente significativa de la expresión de ERK1 en comparación con el

grupo control; la expresión de ERK2 no es estadísticamente diferente en comparación con el grupo tratado con Cas Ilgly; la expresión de NF-κB es estadísticamente diferente en comparación con los demás grupos de tratamiento (Tabla 8).

**d)** El tratamiento con Cisplatino, revela evidencias de diferencias estadísticamente significativas en la expresión de las moléculas ERK1 y ERK2 en comparación con los otros grupos de tratamiento; no se demostró diferencia estadísticamente significativa de la expresión de NF-κB en comparación con Cas Ilgly (Tabla 8).

**e)** En el grupo control, se encontró diferencia estadísticamente significativa en la expresión de NF-κB en comparación con los otros tratamientos; no hay diferencia estadísticamente significativa en la expresión de ERK1 con comparación con Cas IIIa ni de ERK2 en comparación con Cas Ilgly (Tabla 8).

<b>Sobrevivencia 24 h</b>					
	<b>Control</b>	<b>Cisplatino</b>	<b>Cas Ilgly</b>	<b>Cas IIIEa</b>	<b>Cas IIIa</b>
<b>ERK1</b>	23916.58 <sup>a</sup>	31714.13 <sup>b</sup>	29150.02 <sup>c</sup>	16585.52 <sup>d</sup>	22738.52 <sup>a</sup>
<b>ERK2</b>	29232.81 <sup>a</sup>	32774.76 <sup>b</sup>	28730.21 <sup>a,c</sup>	14208.38 <sup>d</sup>	26028.54 <sup>c</sup>
<b>NF-κB</b>	21703.92 <sup>a</sup>	19528.71 <sup>b</sup>	20211.92 <sup>b</sup>	8634.18 <sup>c</sup>	2359.88 <sup>d</sup>

**Tabla 8. Análisis estadístico ANOVA ( $p < 0.05$ ). Comparación entre tratamientos a las 24 h de administración, para la densidad relativa de cada molécula. Las literales diferentes entre variables en la misma fila son estadísticamente significativas.**

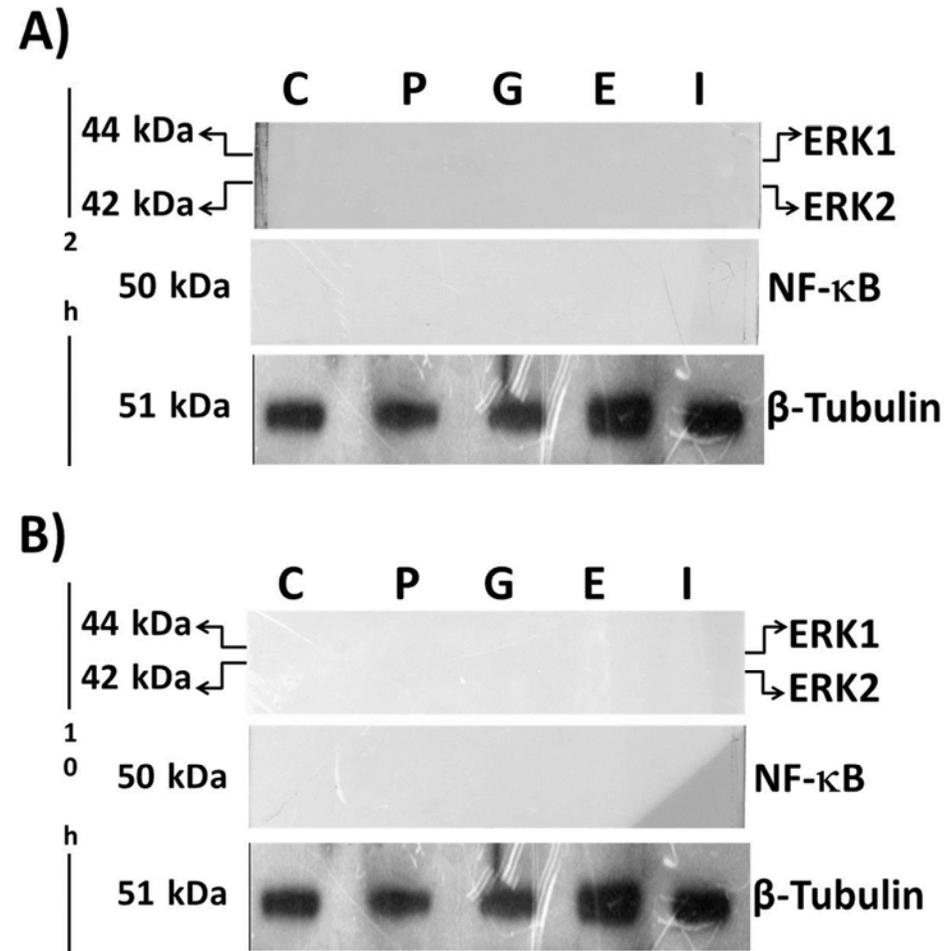


Figura 15. Ausencia en la expresión de los marcadores de supervivencia/proliferación (ERK1, ERK2 y NF-κB) en la línea celular CHP-212. Utilizando la fracción citosólica, a las 2 y 10 h post tratamiento con Cisplatino® (control positivo), Cas IIgly, Cas IIIa y células sin tratar como grupo control. β-Tubulina como control de carga.

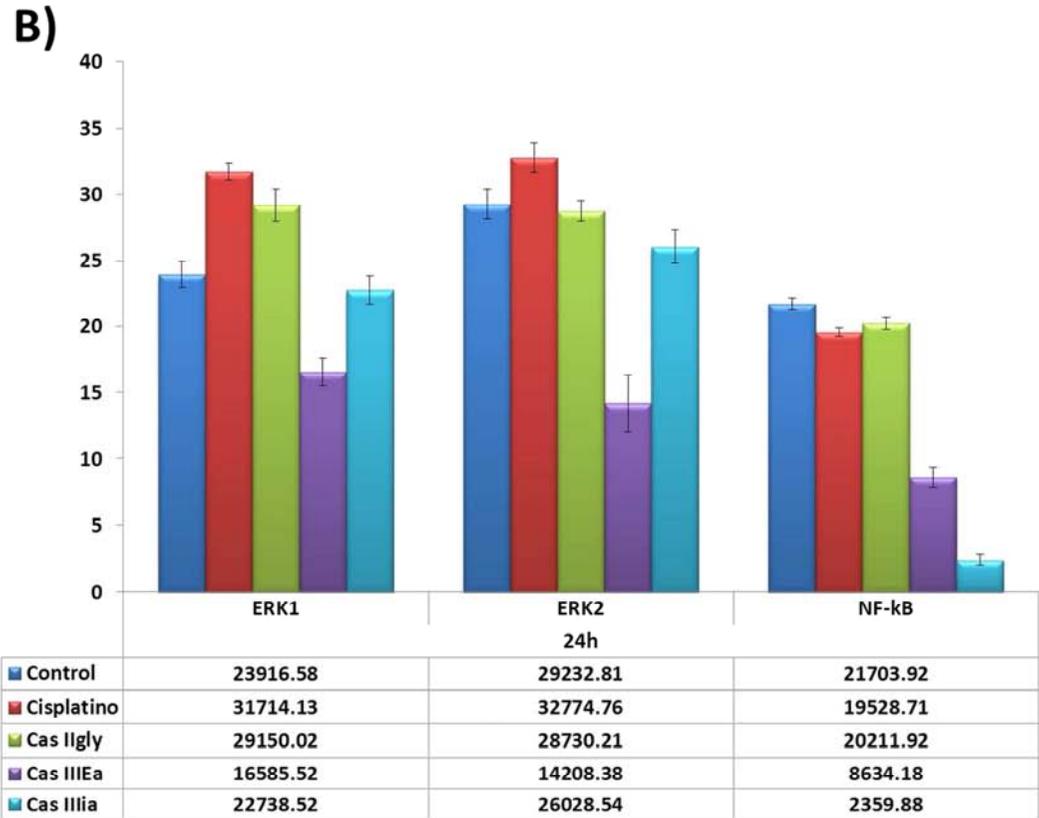
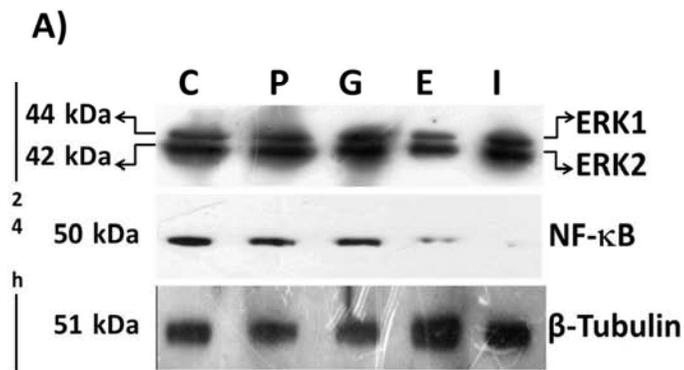


Figura 16. Determinación de sobrevivencia en la línea celular CHP-212. Utilizando la fracción citosólica, a las 24 h de tratamiento con Cisplatino® (control positivo) y las Cas IIgly, III Ea y III Ia, utilizando células sin tratar como grupo control. A) Expresión de los marcadores ERK1, ERK2 y NF-κB, además de β-Tubulina como control de carga. B) Los resultados muestran la  $\bar{x} \pm DE$  (n=4) en unidades relativas de las moléculas apoptósicas.

## V. DISCUSIÓN

Entre los fármacos antineoplásicos más importantes que inducen muerte celular por apoptosis, se encuentran aquellos que tienen centro metálico.<sup>37</sup> En el presente estudio se llevaron a cabo experimentos en donde se midieron los niveles de expresión de diferentes proteínas como marcadores de apoptosis, autofagia y sobrevivencia celular, para determinar cómo actúan 3 diferentes Casiopeínas<sup>®</sup> (IIgly, IIIEa y IIIia) sobre la línea celular de neuroblastoma CHP-212 a 3 diferentes tiempos después de su administración (2, 10 y 24 h).

Las evidencias demuestran que las Casiopeínas<sup>®</sup> tienen efectos de tipo antiproliferativo, citotóxico y citostático<sup>12,15,37,45</sup> comprobándose que la vía de inducción de apoptosis es la vía intrínseca.<sup>40</sup> En concordancia con los resultados obtenidos por Gutiérrez-Rodríguez et.al<sup>40</sup>, se encontró que la muerte celular por apoptosis ocurre 2 h posteriores a la aplicación del tratamiento con Cisplatino<sup>®</sup> y Casiopeínas<sup>®</sup> IIgly y IIIEa, sin embargo no se presentó apoptosis con el tratamiento con Cas IIIia. La ausencia de apoptosis a las 2 h de tratamiento con Cas IIIia concuerda con la presencia de autofagia en este mismo periodo de tiempo, lo que fue determinado por la elevada conversión de LC3B-I a su forma activa LC3B-II y la presencia de BECN1 que juega un papel importante en la inducción de la formación del autofagosoma.<sup>40</sup>

La ausencia de autofagia 2 horas posteriores a la administración del tratamiento con Cas IIgly concuerda con la presencia de la muerte celular por apoptosis determinada por la expresión de la caspasa efectora -3 y de otros

factores desencadenantes como la liberación de cit C al espacio citosólico, características de este mecanismo de muerte celular.<sup>48,5,94</sup>

En el caso del tratamiento con Cas III Ea, se demostró la presencia de ambos procesos al mismo tiempo, lo que es respaldado por evidencia de que estos procesos ocurren de manera concomitante y que se autorregulan mutuamente.<sup>50,69,95</sup>

Diferentes estudios demuestran que la generación de ERO's son un factor detonante para la activación de ambos mecanismos.<sup>96,97,98,99</sup> Particularmente, estudios realizados utilizando diferentes Casiopeínas<sup>®</sup>, han demostrado la presencia de ERO's como parte del mecanismo de acción en diferentes tipos de cáncer como glioblastoma multiforme (GBM)<sup>15</sup>, glioma C6<sup>16</sup>, hepatoma AS-30D<sup>37</sup> y Adenocarcinoma colorectal (Duke tipo C)<sup>43</sup>. La evidencia anterior apoya el hecho de la coincidencia en la expresión de diferentes marcadores de apoptosis y autofagia a las 2 y 10 h después de la aplicación de los diferentes tratamientos, observándose sobre todo la expresión constata de cit C. Esto es el resultado del estrés mitocondrial producido por las ERO's, así como la presencia de BECN1 como respuesta a esta señal de estrés.

Aún cuando los resultados obtenidos en este estudio no demuestran el tipo de autofagia que se presenta, hay evidencia de la presencia de este proceso determinado por BECN1 y la conversión de LC3B-I a su forma activa LC3B-II, lo que significa que hay acumulación de vesículas autofágicas. Los tratamientos que provocaron mayor acumulación de vesículas 2 h posteriores a la administración del tratamiento son: Cas III Ea > Cas IIIa, mientras que para Cas IIgly la acumulación fue nula. Por otro lado, 10 h posteriores a la admistración del

tratamiento, la acumulación autofágica se dio de la siguiente manera: Cas IIgly > Cas IIIEa > Cas IIIa.

Las respuestas celulares provocadas por las Casiopeínas, pueden deberse a la diferencia en sus propiedades fisicoquímicas, de modo que se ve afectada su selectividad y el grado de actividad biológica mostrada. En un estudio donde se demuestra la Relación Estructura Química Actividad-Biológica (QSAR) de las Casiopeínas, se encontró que los compuestos que tienen como ligando donador a la fenantrolina (Cas IIgly y Cas IIIEa) son aproximadamente 2.5 veces más tóxicos que aquellos que tienen como ligando a la bipyridina (Cas IIIa). Por otro lado, mientras más hidrofóbicos sean los compuestos con acetilacetato (Cas IIIEa y Cas IIIa), tendrán mayor actividad que aquellos con glicinato (Cas IIgly), ya que la alta hidrofobicidad incrementa el transporte pasivo del cobre al interior de la célula.<sup>12,100</sup>

Un problema importante fue determinar el papel que juegan los marcadores ERK1, ERK2 y NF- $\kappa$ B, debido a que la actividad de éstos ocurre al interior del núcleo<sup>77,80,85,86</sup> y en este estudio en particular, la medición de tales marcadores se realizó en la fracción citosólica. Por otro lado, diferentes estudios demuestran que ERK juega un papel importante en la promoción de la muerte celular y senescencia.<sup>75</sup> Las vías por las cuales ERK señala estos procesos no está totalmente dilucidada.

Se sabe que la causa principal de la activación sostenida de ERK, es la presencia de ERO's y que requiere de ellas para producir muerte celular.<sup>82</sup> La activación de ERK debida al daño del ADN en baja intensidad, causa arresto del

ciclo celular; mientras que un daño extensivo, provoca muerte celular por apoptosis.<sup>77</sup> Lo anterior coincide con los resultados obtenidos 2 h posteriores a la administración del tratamiento, donde se observa muerte celular por apoptosis y la ausencia de ERK en las células tratadas por Cas IIgly y Cas III Ea; por lo que se podría concluir que esto corresponde a un daño extenso producido al ADN. No existe evidencia del tipo de autofagia que se presenta debido a que se desconoce el tipo de daño al ADN que pudiera provocar la ausencia de ERK.

La activación de ERK ha demostrado que afecta directamente a la función mitocondrial, disminuyendo su respuesta y el potencial de membrana con la consecuente disrupción y salida de cit C al espacio citosólico,<sup>77,78</sup> lo cual concuerda con la presencia de este marcador a las 2 y 10 h de tratamiento.

ERK1 y ERK2 se localizan en el núcleo en células proliferantes y/o quiescentes; sin embargo, una considerable porción se encuentra en citoplasma.<sup>75</sup> Con base en lo anterior, se puede justificar la presencia de estos marcadores a las 24 h de administración del tratamiento, pero al no tener evidencia de la presencia de los mismos en el núcleo, es difícil determinar si las células están en estado basal o han sido activadas.

## VI. CONCLUSIONES

1. En comparación con el Cisplatino<sup>®</sup>, las 3 diferentes Casiopeínas<sup>®</sup> requieren de menores dosis para que se presenten los procesos de apoptosis y autofagia, por lo que las Casiopeínas<sup>®</sup> son más efectivas.

2. La muerte celular por apoptosis ocurre 2 h posteriores a la administración del tratamiento con Cas IIgly y III Ea siendo la vía intrínseca la que rige este proceso. La Cas IIgly es la que presenta mayor índice de apoptosis.

3. En base a los resultados obtenidos en la prueba ANOVA, dada la expresión de caspasa -3, se concluye que las Casiopeínas IIgly y III Ea son más eficaces que el Cisplatino para producir muerte celular por apoptosis a las 2 horas post tratamiento:

Cas IIgly > Cas III Ea > Cisplatino > Cas IIIa

4. El proceso autofágico ocurre de manera concomitante al proceso apoptótico 2 h después del tratamiento Cas III Ea, ya que hay expresión de los marcadores: caspasa -3 (determina el proceso apoptótico), BECN1 y de LC3-II (determinan el proceso autofágico). Los 3 marcadores expresados tienen diferencia estadísticamente significativa.

5. Bajo tratamiento con Cas IIIa, el único fenómeno presente a las 2 h post tratamiento es el de autofagia.

6. Bajo tratamiento con Cas IIgly, el único fenómeno presente a las 2 h post tratamiento es el de apoptosis.

**7.** Las células tratadas con Cas III<sup>Ea</sup> presentan mayor índice de autofagia 2 h después de administrado el tratamiento, mientras que a las 10 h es la Cas II<sup>gly</sup> quien presenta mayor índice de autofagia.

**8.** La Casiopeína III<sup>Ea</sup> es más eficaz que el Cisplatino para estimular la conversión de LC3B-I a LC3B-II, 2 horas postratamiento:

Cas III<sup>Ea</sup> > Cisplatino > Cas III<sup>ia</sup> > Cas II<sup>gly</sup>

**9.** Las 3 Casiopeínas son más eficaces que Cisplatino para estimular la conversión de LC3B-I a LC3B-II, 10 horas postratamiento:

Cas II<sup>gly</sup> > Cas III<sup>Ea</sup> > Cas III<sup>ia</sup> > Cisplatino

**10.** No hay evidencia suficiente para determinar si la autofagia que sufren las células es un proceso adaptativo o una forma de muerte celular.

**11.** A las 24 h de tratamiento con Casiopeínas<sup>®</sup>, no hay presencia de los marcadores de apoptosis ni autofagia, únicamente de los marcadores de sobrevivencia/proliferación celular pero esto no es concluyente para afirmar que en su lugar, haya proliferación celular.

## VII. REFERENCIAS

1. Lenninger GM; Russell JW; van Golen CM; Berent A; Feldman EL. (2004). Insulin-like growth factor-I regulates glucose- induced mitochondrial depolarization and apoptosis in human neuroblastoma. *Cell Death Differ.*, 11(8), 885-896.
2. Miwa Y; Uchida K; Nakayama H; Asaki N. (2010). Neuroblastoma of the adrenal gland in a ferret. *J Vet Med Sci.*, 72(9), 1229-1232.
3. Uccini S; Colarossi C; Scarpino S; Boldrini R; Natali PG; Nicotra MR; Perla FM; Mannarino O; Altavista P; Boglino C; Cappelli CA; Cozzi D; Donfrancesco A; Kokai G; Losty PD; McDowell HP; Dominici C. (2006). Morphological and molecular assessment of apoptotic mechanisms in peripheral neuroblastic tumours. *Br J Cancer.*, 3;95(1), 49-55.
4. Van Noesel MM; Versteeg R. (2004). Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic 'danse macabre'. *Gene.*, 21; 325, 1-15.
5. Cancer.Net. Neuroblastoma – Childhood. Obtenida el 03 de marzo de 2014 de, <http://www.cancer.net/cancer-types/neuroblastoma-childhood>.
6. Nevo I; Sagi-Assif O; Edry Botzer L; Amar D; Maman S; Kariv N; Leider-Trejo LE; Savelyeva L; Schwab M; Yron I; Witz IP. (2008). Generation and characterization of novel local and metastatic human neuroblastoma variants. *Neoplasia.* 10(8), 816-827.
7. Thiele CJ. (1998). Neuroblastoma: In (Ed.) Masters, J. *Human Cell Culture*. Lancaster, UK: Kluwer Academic Publishers., Vol 1, p 21-53.

8. Frisch SM; Screatton RA. (2001) Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol.*, 13(5), 555-562.
9. Ricky W. Johnstone; Astrid A. Ruefli; and Scott W. Lowe. (2002). Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy. *Cell.*, 108, 153–164
10. Coates JM; Galante JM; Bold RJ. (2010) Cancer therapy beyond apoptosis: autophagy and anoikis as mechanisms of cell death. *J Surg Res.*, 164(2), 301-308.
11. De Vizcaya-Ruiz A; Rivero-Muller A; Ruiz-Ramirez ; Kass GE; Kelland LR; Orr RM; Dobrota M. (2000) Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, casiopeina II, in L1210 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells. *Toxicol In Vitro.*, 14(1), 1-5.
12. María Elena Bravo-Gómez and Lena Ruiz-Azuara. (2010). *New Approaches in the Treatment of Cancer. Metals in Cancer Treatment.* Nova Science Publishers, Inc. Editors: Dra. Ma. Del Carmen Mejia Vazquez (UNAM, Juriquilla, Mexico), Samuel Navarro (Universtiy of Valencia, Valencia, Spain) 139-172.
13. Alemón-Medina R; Breña-Valle M; Muñoz-Sánchez JL; Gracia-Mora MI; Ruiz-Azuara L. (2007). Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas). *Cancer Chemother Pharmacol.*, 60(2), 219-228.
14. Cañas-Alonso RC; Fuentes-Noriega I; and Ruiz-Azuara L. (2010). Pharmacokinetics of Casiopeína IIgly in Beagle Dog: A Copper Based Compound with Antineoplastic Activity. *J Bioanal Biomed.*, 2(2), 28-34.
15. Trejo-Solís C; Jimenez-Farfan D; Rodriguez-Enriquez S; Fernandez-Valverde F; Cruz-Salgado A; Ruiz-Azuara L; Sotelo J. (2012). Copper compound

induces autophagy and apoptosis of glioma cells by reactive oxygen species and JNK activation. *BMC Cancer.*, 27; 12:156-171.

**16.** Trejo-Solís C; Palencia G; Zúñiga S; Rodríguez-Ropon A; Osorio-Rico L; Luvia ST; Gracia-Mora I; Marquez-Rosado L; Sánchez A; Moreno-García ME; Cruz A; Bravo-Gómez ME; Ruiz-Ramírez L; Rodríguez-Enriquez S; Sotelo J. (2005). Cas IIgly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia*, 7(6), 563-574.

**17.** Valencia-Cruz AI; Uribe-Figueroa LI; Galindo-Murillo R; Baca-López K; Gutiérrez AG; Vázquez-Aguirre A; Ruiz-Azuara L; Hernández-Lemus E; Mejía C. (2013). Whole genome gene expression analysis reveals casiopeína-induced apoptosis pathways. *PLoS One*. 8(1):e54664.

**18.** Steinberg H; Peek SF; Nelson KM. (2006) Neuroblastoma with neuronal differentiation in the spinal cord in an Aberdeen Angus heifer calf. *Vet Pathol.*, 43(2), 193-197.

**19.** Kleinschmidt S; Peters M; Wohlsein P. (2012). Central nervous system neuroblastoma in a wild deer (*Capreolus capreolus*). *J Comp Pathol.*, 146(2-3), 283-287.

**20.** Uchida K; Murakami T; Tometsuka T; Iwakiri A; Yamaguchi R; Tateyama S. (1998). Peripheral neuroblastoma and primitive neuroectodermal tumor in Japanese black cattle. *J Vet Med Sci.*, 60(7): 871-875.

**21.** Parker VJ; Morrison JA; Yaeger MJ. (2010). Olfactory neuroblastoma in a cat. *J Feline Med Surg.* 12(11): 867-871.

- 22.** Kuwamura M; Kotera T; Yamate J; Kotani T; Aoki M; Hori A. (2004). Cerebral ganglioneuroblastoma in a golden retriever dog. *Vet Pathol.*, 41(3), 282-284.
- 23.** Biedler JL; Helson L; Spengler BA. (1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* 33(11), 2643-2652.
- 24.** American Cancer Society. Neuroblastoma. Obtenida el 28 de febrero de 2014 de, <http://www.cancer.org/cancer/neuroblastoma/index>.
- 25.** Cancer Research UK. Neuroblastoma. Obtenida el 02 de marzo de 2014 de, <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-help/about-cancer/cancer-questions/neuroblastoma#page>.
- 26.** Cancer.gov. Neuroblastoma. Obtenida el 31 de enero de 2014 de, <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/neuroblastoma>.
- 27.** Yamate J; Izawa T; Ogata K; Kobayashi O; Okajima R; Kuwamura M; Kotani T; Aoki M. (2006). Olfactory neuroblastoma in a horse. *J Vet Med Sci.*, 68(5):495-498.
- 28.** Louden C; Patterson JS; Sandusky GE. (1992). Peripheral neuroblastomas in two dogs. *J Vet Diagn Invest.* 4(4), 476-480.
- 29.** Marcotte L; McConkey SE; Hanna P; Foley P; Burton S. (2004). Malignant adrenal neuroblastoma in a young dog. *Can Vet J.* 45(9):773-776.
- 30.** Forrest LJ; Galbreath EJ; Dubielzig RR; MacEwen EG. (1997). Peripheral neuroblastoma in a dog. *Vet Radiol Ultrasound.* 38(6), 457-60.
- 31.** Haynes JS; Leininger JR. (1984). Malignant neuroblastoma in a cow. *Vet Pathol.* 21(6), 610-612.

**32.** E. C. Appleby. (1976). Tumours of the adrenal gland and paraganglia. Bull World Health Organ. 53, 227-235.

**33.** Michishita M; Momozawa Y; Oizumi T; Ohkusu-Tsukada K; Takahashi K. (2010). Primary neuroblastoma in the skin of an adult Shih Tzu dog. Vet Dermatol. 21(4), 408-411.

**34.** Schulz KS; Steele KE; Saunders GK; Smith MM; Moon ML. (1994). Thoracic ganglioneuroblastoma in a dog. Vet Pathol. 31(6), 716-718.

**35.** Shioda C1; Uchida K; Nakayama H. (2011). Pathological features of olfactory neuroblastoma in an axolotl (*Ambystoma mexicanum*). J Vet Med Sci., 73(8), 1109-1111.

**36.** Mattix ME; Mattix RJ; Williams BH; Ribas JL; Wilhelmsen CL. (1994). Olfactory ganglioneuroblastoma in a dog: a light, ultrastructural, and immunohistochemical study. Vet Pathol. 31(2), 262-265.

**37.** Marín-Hernández A; Gracia-Mora I; Ruiz-Ramírez L; Moreno-Sánchez R. (2003). Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas) on mitochondrial functions. Biochem Pharmacol. 15;65(12),1979-1989.

**38.** Lena Ruiz-Ramirez; Isabel Gracia-Mora; Ma. Esther de la Rosa; Hector Sumano; Celedonio Gomez; Francisco Arenas; Eusebio Gomez; Emilio Pimente and Martha Cruces. (1993). Cytostatic, Mutagenic, Antineoplastic Activities And Preliminar Toxicity Of Copper (II) New Drugs: Casiopeinas I, II, III. Jf Inorg Biochem. 51(1-2), 406.

**39.** Kachadourian R; Brechbuhl HM; Ruiz-Azuara L; Gracia-Mora I; Day BJ. (2010). Casiopeína IIgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. Toxicology. 268(3), 176-183.

**40.** Gutiérrez AG; Vázquez-Aguirre A; García-Ramos JC; Flores-Alamo M; Hernández-Lemus E; Ruiz-Azuara L; Mejía C. (2013). Copper(II) mixed chelate compounds induce apoptosis through reactive oxygen species in neuroblastoma cell line CHP-212. *J Inorg Biochem.* 126,17-25.

**41.** Juan Carlos García-Ramos; Rodrigo Galindo-Murillo; Fernando Cortés-Guzmán and Lena Ruiz-Azuara. (2013). Metal-Based Drug-DNA Interactions. *J. Mex. Chem. Soc.* 57(3), 245-259

**42.** Alemón-Medina R; Bravo-Gómez ME; Gracia-Mora MI; Ruiz-Azuara L. (2011). Comparison between the antiproliferative effect and intracellular glutathione depletion induced by Casiopeína IIgly and cisplatin in murine melanoma B16 cells. *Toxicol In Vitro.* 25(4):868-873.

**43.** Carvallo-Chaigneau F; Trejo-Solís C; Gómez-Ruiz C; Rodríguez-Aguilera E; Macías-Rosales L; Cortés-Barberena E; Cedillo-Peláez C; Gracia-Mora I; Ruiz-Azuara L; Madrid-Marina V; Constantino-Casas F. (2008). Casiopeina III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *Biometals.* 21(1):17-28.

**44.** Mejia C; Ruiz-Azuara L. (2008). Casiopeinas IIgly and IIIia induce apoptosis in medulloblastoma cells. *Pathol Oncol Res.* 14(4), 467-472.

**45.** Gutiérrez, AG. (2013) Apoptosis mediante especies reactivas de oxígeno en el neuroblastoma, por efecto de casiopeínas®. Tesis de Maestría. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México.

**46.** Gracia-Mora I; Ruiz-Ramírez L; Gómez-Ruiz C; Tinoco-Méndez M; Márquez-Quiñones A; Lira LR; Marín-Hernández A; Macías-Rosales L; Bravo-Gómez ME. (2001). Knigth's Move in the Periodic Table, From Copper to Platinum,

Novel Antitumor Mixed Chelate Copper Compounds, Casiopeinas, Evaluated by an in Vitro Human and Murine Cancer Cell Line Panel. *Met Based Drugs*. 8(1),19-28.

**47.** Lee JW; Jeong EG; Lee SH; Yoo NJ; Lee SH. (2007). Somatic mutations of BECN1, an autophagy-related gene, in human cancers. *APMIS*. Jun;115(6), 750-756.

**48.** Nika N. D and Stanley J. K. (2004). Cell Death: Critical Control Points. *Cell*, 116, 205–219.

**49.** Fesik SJ. (2000). Insights into Programmed Cell Death through Structural Biology. *Cell*.103, 273–282.

**50.** Shen S; Kepp O; Michaud M; Martins I; Minoux H; Métivier D; Maiuri MC; Kroemer RT; Kroemer G. (2011). Association and dissociation of autophagy, apoptosis and necrosis by systematic chemical study. *Oncogene*. 10;30(45), 4544-4556.

**51.** Maiuri MC; Zalckvar E; Kimchi A; Kroemer G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8(9):741-752.

**52.** Robert G; Gastaldi C; Puissant A; Hamouda A; Jacquelin A; Dufies M; Belhacene N; Colosetti P; Reed JC; Auberger P; Luciano F. (2012). The anti-apoptotic Bcl-B protein inhibits BECN1-dependent autophagic cell death. *Autophagy*. 8(4):637-649.

**53.** Mohammad SO; Mohd. N. and Haseeb A. (2011). Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem*. 351, 41-58.

**54.** Park SJ; Wu CH; Gordon JD; Zhong X; Emami A; Safa AR. (2004). Taxol induces caspase-10-dependent apoptosis. *J Biol Chem.* 279(49), 51057-51067.

**55.** Casciano I; De Ambrosis A; Croce M; Pagnan G; Di Vinci A; Allemanni G; Banelli B; Ponzoni M; Romani M; Ferrini S. (2004). Expression of the caspase-8 gene in neuroblastoma cells is regulated through an essential interferon-sensitive response element (ISRE). *Cell Death Differ.* 11(1):131-134.

**56.** Robert G; Gastaldi C; Puissant A; Hamouda A; Jacquel A; Dufies M; Belhacene N; Colosetti P; Reed JC; Auburger P; Luciano F. (2012). The anti-apoptotic Bcl-B protein inhibits BECN1-dependent autophagic cell death. *Autophagy.* 8(4):637-649.

**57.** Morselli E; Galluzzi L; Kepp O; Vicencio JM; Criollo A; Maiuri MC; Kroemer G. (2009). Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 1793(9):1524-1532.

**58.** Eskelinen EL; Saftig P. (2009). Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 1793(4), 664-673.

**59.** Proikas-Cezanne T and Patrice C. (2011). Beclin 1 or not Beclin 1.... *Autophagy* 7(7), 671-672.

**60.** Gurusamy N; Das DK. (2009). Detection of cell death by autophagy. *Methods Mol Biol.* 559, 95-103.

**61.** Barth S; Glick D; Macleod KF. (2010). Autophagy: assays and artifacts. *J Pathol.* 221(2):117-124.

- 62.** Chen SY; Chiu LY; Maa MC; Wang JS; Chien CL; Lin WW. (2011). zVAD-induced autophagic cell death requires c-Src-dependent ERK and JNK activation and reactive oxygen species generation. *Autophagy*. 7(2):217-228.
- 63.** Andreas B; Terje A; Ragnhild A. L; Harald S. (2009). Autophagy in Tumor Supresion and Promotion. *Molecular Oncology*. 3, 366 – 375.
- 64.** Lee J; Giordano S; and Zhang J. (2012). Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling. *Biochem. J*. 441, 523–540.
- 65.** Mai S; Muster B; Bereiter-Hahn J; Jendrach M. (2012). Autophagy proteins LC3B, ATG5 and ATG12 participate in quality control after mitochondrial damage and influence lifespan. *Autophagy*. 8(1):47-62.
- 66.** Chu CT. (2006).Autophagic Stress in Neuronal Injury and Disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 65(5), 423–432.
- 67.** Wagner EF; Nebreda AR. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer*. 9(8):537-549.
- 68.** Amelio I; Melino G; Knight RA. (2011). Cell death pathology: cross-talk with autophagy and its clinical implications. *Biochem Biophys Res Commun*. 414(2):277-281.
- 69.** Chen N and Debnath J. (2010).Autophagy and tumorigenesis. *FEBS Letters* 584, 1427–1435.
- 70.** Hsieh YC; Athar M; Chaudry IH. (2009). When apoptosis meets autophagy: deciding cell fate after trauma and sepsis. *Trends Mol Med*. 15(3):129-138.
- 71.** Colecchia D; Strambi A; Sanzone S; Iavarone C; Rossi M; Dall'Armi C; Piccioni F; Verrotti di Pianella A; Chiariello M. (2012). MAPK15/ERK8 stimulates

autophagy by interacting with LC3 and GABARAP proteins. *Autophagy*. 8(12):1724-1740.

**72.** Swanlund JM; Kregel KC; Oberley TD. (2010). Investigating autophagy: quantitative morphometric analysis using electron microscopy. *Autophagy*. 6(2):270-277.

**73.** Nano Tools Antikooper Technik. Autophagic Marker LC3 microtubule-associated protein1 light chain 3. Obtenida el 16 de mayo de 2014 de, <http://www.nanotools.de>.

**74.** Jin Y; Tanaka A; Choi AM; Ryter SW. (2012). Autophagic proteins: new facets of the oxygen paradox. *Autophagy*. 8(3):426-428.

**75.** Mizushima N; Yoshimori T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*. 3(6):542-545.

**76.** Roskoski R. Jr. (2012). ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*. 66, 105– 143.

**77.** Appel S; Morgan KG. (2010). Scaffolding proteins and non-proliferative functions of ERK1/2. *Commun Integr Biol*. 3(4):354-356.

**78.** Lefloch R; Pouysségur J. and Lenormand P. (2009). Total ERK1/2 activity regulates cell proliferation. *Cell Cycle*. 8(5), 705-711.

**79.** Mebratu Y; Tesfaigzi Y. (2009). How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle*. 8(8):1168-1175.

**80.** Lindsey A. Allan and Paul R. Clarke. (2009). Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. *FEBS Journal* 276, 6063–6073.

**81.** Cagnol S; Chambard JC. (2010). ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J.* 277(1), 2-21.

**82.** Kim HJ, Yim GW, Nam EJ, Kim YT. (2014). Synergistic Effect of COX-2 Inhibitor on Paclitaxel-Induced Apoptosis in the Human Ovarian Cancer Cell Line OVCAR-3. *Cancer Res Treat.* 46(1), 81-92.

**83.** Ortiz-Lazareno PC; Bravo-Cuellar A; Lerma-Díaz JM; Jave-Suárez LF; Aguilar-Lemarroy A; Domínguez-Rodríguez JR; González-Ramella O; De Célis R; Gómez-Lomelí P; Hernández-Flores G. (2014). Sensitization of U937 leukemia cells to doxorubicin by the MG132 proteasome inhibitor induces an increase in apoptosis by suppressing NF-kappa B and mitochondrial membrane potential loss. *Cancer Cell Int.*14(1), 13-27. doi: 10.1186/1475-2867-14-13

**84.** Burkitt MD<sup>1</sup>; Williams JM; Duckworth CA; O'Hara A; Hanedi A; Varro A; Caamaño JH; Pritchard DM. (2013). Signaling mediated by the NF-κB sub-units NF-κB1, NF-κB2 and c-Rel differentially regulate *Helicobacter felis*-induced gastric carcinogenesis in C57BL/6 mice. *Oncogene.* 12;32(50):5563-5573.

**85.** Eo SH; Cho H; Kim SJ. (2013). Resveratrol Inhibits Nitric Oxide-Induced Apoptosis via the NF-Kappa B Pathway in Rabbit Articular Chondrocytes. *Biomol Ther (Seoul).* 30;21(5), 364-370.

**86.** Chen G; Han K; Xu X; Du X; Zhang Z1; Tang J; Shi M1; Wang M1; Li J1; Cao B1; Mao X2. (2014). An anti-leishmanial thiadiazine agent induces multiple myeloma cell apoptosis by suppressing the nuclear factor kappaB signalling pathway. *Br J Cancer.* 110(1), 63-70.

**87.** Rimmon A; Vexler A; Berkovich L; Earon G; Ron I; Lev-Ari S. (2013). Escin Chemosensitizes Human Pancreatic Cancer Cells and Inhibits the Nuclear Factor-kappaB Signaling Pathway. *Biochem Res Int.* 2013:251752.

**88.** Yamaguchi N; Oyama M; Kozuka-Hata H; Inoue J. (2013). Involvement of A20 in the molecular switch that activates the non-canonical NF-κB pathway. *Sci Rep.* 3,2568.

**89.** Chen LY; Pan CS; Wei XH; Li L; Han JY; Huang L. (2013). Sang-qi Granula Reduces Blood Pressure and Myocardial Fibrosis by Suppressing Inflammatory Responses Associated with the Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Nuclear Factor κ B Protein in Spontaneously Hypertensive Rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013:721729.

**90.** Maraslioglu M; Oppermann E; Blattner C; Weber R; Henrich D; Jobin C; Schleucher E; Marzi I; Lehnert M. (2014). Chronic ethanol feeding modulates inflammatory mediators, activation of nuclear factor-κB, and responsiveness to endotoxin in murine Kupffer cells and circulating leukocytes. *Mediators Inflamm.* 2014:808695.

**91.** Zhu BS; Xing CG; Lin F; Fan XQ; Zhao K; Qin ZH. (2011). Blocking NF-κB nuclear translocation leads to p53-related autophagy activation and cell apoptosis. *World J Gastroenterol.* 17(4),478-487.

**92.** Terzuoli E; Meini S; Cucchi P; Catalani C; Cialdai C; Maggi CA; Giachetti A; Ziche M; Donnini S. (2014). Antagonism of bradykinin B2 receptor prevents inflammatory responses in human endothelial cells by quenching the NF-κB pathway activation. *PLoS One.* 2;9(1):e84358.

- 93.** Wang J. (2008). Beclin 1 bridges autophagy, apoptosis and differentiation. *Autophagy*. 4(7), 947-948.
- 94.** Ruiz-Vela A; Opferman JT; Cheng EH; Korsmeyer SJ. (2005). Proapoptotic BAX and BAK control multiple initiator caspases. *EMBO Rep*. 6(4):379-385.
- 95.** Rafatian G; Khodagholi F; Farimani MM; Abraki SB; Gardaneh M. (2012). Increase of autophagy and attenuation of apoptosis by Salvigenin promote survival of SH-SY5Y cells following treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Mol Cell Biochem*. 371(1-2),9-22.
- 96.** Scherz-Shouval R and Zvulun E. (2007). ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *TRENDS in Cell Biology*. 17 (9), 422-427.
- 97.** Pan JS;Hong MZ; Ren JL. (2009). Reactive oxygen species: A double-edged sword in Oncogenesis. *World J Gastroenterol*. 15(14), 1702-1707
- 98.** White E. (2007). Role of Metabolic Stress Responses of Apoptosis and Autophagy in Tumor Suppression. *Ernst Schering Found Symp Proc*. (4): 23–34.
- 99.** Gomez-Lazaro M; Galindo MF; Melero-Fernandez de Mera RM; Fernandez-Gómez FJ; Concannon CG; Segura MF; Comella JX; Prehn JH; Jordan J. (2007). Reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase activate Bax to induce mitochondrial cytochrome c release and apoptosis in response to malonate. *Mol Pharmacol*. 71(3), 736-743.
- 100.** Bravo-Gómez ME; García-Ramos JC; Gracia-Mora I; Ruiz-Azuara L. (2009). Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonato)]NO<sub>3</sub> and [Cu(N-N)(glycinato)]NO<sub>3</sub> complexes, (Casiopéinas). *J Inorg Biochem*. 103(2):299-309

## ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**AIF:** Factor inductor de apoptosis.

**Akt:** Proteín cinasa A.

**ANOVA:** Análisis de varianza.

**anti-anti:** Antibiótico-antimicótico.

**Apaf-1:** Factor-1 activador de proteasas apoptósicas.

**APO-1:** Gen antiapoptósico no. 1, conocido también como CD95 o FAS.

**APS:** Persulfato de amonio.

**Atg:** Cinasa relacionada a autofagia.

**Atg12:** Cinasa-12 relacionada a autofagia.

**Atg16:** Cinasa-16 relacionada a autofagia.

**Atg4:** Cinasa-4 relacionada a autofagia.

**Atg5:** Cinasa-5 relacionada a autofagia.

**Bcl-2:** Célula-B CLL/linfoma 2

**BECN1/Bec-1:** Beclina 1.

**BH3:** Dominio homólogo de Bcl-2 no. 3

**BID/Bid:** Dominio de muerte interactivo con BH3.

**C<sub>1</sub>:** Concentración inicial.

**C<sub>2</sub>:** Concentración final.

**Cas IIgly:** Casiopeína<sup>®</sup> IIgly.

**Cas IIIEa:** Casiopeína<sup>®</sup> IIIEa.

**Cas IIIia:** Casiopeína<sup>®</sup> IIIia.

**Cas:** Casiopeínas®.

**CD95:** Grupo de diferenciación 95, conocido también como FAS o APO-1.

**CHP-212:** Línea celular de neuroblastoma humano de tipo adherente y morfología neuroblástica.

**CI<sub>50</sub>:** concentración inhibitoria 50 o concentración inhibitoria media.

**cit. C:** citocromo C.

**dATP:** desoxiadenosina trifosfato.

**DFF:** Factor de fragmentación del ADN.

**DISC:** Complejo señalizador inductor de muerte.

**DMEM:** medio de cultivo- medio mínimo esencial modificado.

**endo G:** Endonucleasa G.

**ERK:** cinasa extracelular regulada por señales.

**ERO's:** Especies reactivas de oxígeno.

**FAD:** dinucleótido de flavina-adenina.

**FAS:** Receptor FAS, conocido también como APO-1 o CD95.

**FAS-L:** FAS ligando o CD95L.

**FC:** Factor de disolución.

**FD:** Factor de conversión.

**FLICE:** Enzima convertora beta tipo interleucina FADD

**FLIP:** Proteína inhibidora tipo FLICE.

**GBM:** Glioblastoma multiforme.

**Glu:** Glutamina.

**GN:** Ganglioneuroma.

**GNB:** Ganglioneuroblastoma.

**GSH:** Glutati3n.

**GTP:** guanos3n-trifosfato.

**HPR:** Peroxidasa de r3bano.

**HtrA2/Omi:** Serina proteasa localizada en la mitocondria.

**I:** Tipo celular de neuroblastoma intermedio compuesto de c3lulas intermedias.

**IAP's:** Prote3nas inhibidoras de apoptosis.

**INSS:** Sistema internacional de estadios del neuroblastoma.

**JNK:** Cinasa Jun N-terminal.

**LC3:** Cadena ligera prot3ica-3 asociada al microt3bulo.

**LC3B-II:** Forma lipidada de LC3B.

**mA:** Miliamperes.

**MAP:** Prote3n cinasa activada por mit3geno.

**MIBG:** Meta-yodo-bencil-guanidina.

**N:** Tipo celular de neuroblastoma, referente a c3lulas neurobl3sticas.

**N<sub>2</sub>:** nitr3geno

**NADH:** Dinucle3tido de nicotinamida y adenina.

**NB:** Neuroblastoma.

**NF- $\kappa$ - $\beta$ :** Factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de c3lulas B o

Factor de transcripci3n nuclear  $\kappa$ - $\beta$ .

**OMS:** Organizaci3n mundial de la salud.

**p53:** Gen supresor tumoral con un peso molecular de 53 KDa.

**pAb:** Anticuerpo policlonal.

**PARP:** Polimerasa de poli-Adenosina fosfato ribosa.

**PBS:** Buffer de fosfatos salinos.

**PE:** Fosfatidil etanolamina.

**PEA-15:** Proteína astrocítica-15.

**PI3K:** Fosfoinositol-3 cinasa.

**PNET:** Neoplasia neuroepitelial periférica.

**PUMA:** Modulador de apoptosis sobre-regulado por p53.

**QSAR:** Relación Estructura Química Actividad-Biológica

**Rel A:** Factor de transcripción-65 o factor nuclear NF- $\kappa$ - $\beta$  subunidad p65.

**S:** Tipo celular de neuroblastoma compuesto de células planas o sustrato adherentes.

**SDS:** Dodecil sulfato sódico.

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de proliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

**SFB:** Suero fetal bovino.

**SK-N-SH:** Línea celular de Neuroblastoma, de tipo adherente y morfología epitelial.

**Smac/DIABLO:** Segundo activador de caspasas derivado de mitocondria/  
Proteína de unión directa a IAP con bajo punto isoelectrico

**SNC:** Sistema nervioso central

**SNP:** Sistema nervioso periférico.

**SNS:** Sistema nervioso simpático.

**SOD:** Superóxido dismutasa

**tBid:** Bid truncada.

**TEMED:** N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina.

**Tir:** Tirosina.

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ .

**Treo:** Treonina.

**Tris:** Tris(hidroximetil)aminometano.

**V:** Volts.

**V<sub>1</sub>:** Volumen inicial.

**V<sub>2</sub>/ V<sub>f</sub>:** Volumen final.