



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO ANTI-PROLIFERATIVO Y ANTI-INVASIVO DE UN  
COMPUESTO DE COORDINACIÓN DE COBRE SOBRE EL  
GLIOMA HUMANO EXPERIMENTAL U-373 MG *IN VITRO*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ISABEL ANGÉLICA ANAYA RUBIO



DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. María Cristina Trejo Solís

MÉXICO D.F. 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*La frase más excitante que se puede  
oír en ciencia, la que anuncia  
nuevos descubrimientos, no es  
"¡Eureka!" sino "Es extraño..."*  
*-Isaac Asimov-*



*A mis padres,*

*abuelos*

*y hermanos*



## ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| Abreviaturas   |           |
| RESUMEN  | 1         |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>   | <b>2</b>  |
| 1.2.Glioblastoma   | 2         |
| 1.2.1. <i>Cáncer</i>   | 2         |
| 1.2.1.1. <i>Hallmarks del cáncer</i>   | 2         |
| 1.2.2. Gliomas   | 3         |
| 1.2.3. Glioblastoma  | 4         |
| 1.2.3.1. <i>Proceso Invasivo</i>   | 5         |
| 1.2.3.2. <i>Vía GSK/β-catenina</i>   | 10        |
| 1.2.3.3.Tratamiento  | 13        |
| 1.3.Casiopéínas  | 14        |
| 1.4.Apoptosis  | 17        |
| 1.4.1. <i>Caspasas</i>   | 17        |
| 1.4.2. <i>Vía Extrínseca o vía Receptores de Muerte</i>                      | 18        |
| 1.4.3. <i>Vía intrínseca o mitocondrial</i>                                  | 19        |
| <b>3. HIPÓTESIS</b>  | <b>21</b> |
| <b>4. OBJETIVO GENERAL</b>   | <b>21</b> |
| 4.2.Objetivos específicos  | 21        |
| <b>5. METODOLOGÍA</b>  | <b>22</b> |
| 5.2. <i>Síntesis de Casiopéina III-La</i>                                    | 22        |
| 5.3. <i>Manejo de cultivo celular</i>  | 22        |
| 5.4. <i>Ensayo de viabilidad celular</i>                                     | 22        |
| 5.5. <i>Muerte celular por TUNEL</i>   | 23        |
| 5.6. <i>Western Blot</i>   | 23        |
| 5.7. <i>Ensayo de Invasión</i>   | 24        |
| 5.8. <i>Análisis estadísticos</i>  | 26        |
| <b>6. RESULTADOS</b>   | <b>27</b> |
| 6.2. <i>Cas III-La disminuye la viabilidad y proliferación celular</i>       | 27        |
| 6.3. <i>Cas III-La induce apoptosis</i>                                      | 28        |
| 6.4. <i>Cas III-La inhibe la invasión celular del glioma humano U-373 MG</i> | 31        |
| <b>7. DISCUSIÓN</b>  | <b>33</b> |
| <b>8. CONCLUSIÓN</b>   | <b>36</b> |
| <b>9. REFERENCIAS</b>  | <b>37</b> |

---

## ABREVIATURAS

|                                   |  |                                  |   |
|-----------------------------------|--|----------------------------------|---|
| <b>Ac</b>                         | Anticuerpo   | <b>MEC</b>                       | Matriz extracelular   |
| <b>AIF</b>                        | Factor inductor de apoptosis   | <b>MG</b>                        | Glioma maligno  |
| <b>Apaf-1</b>                     | factor de la proteasa activadora de apoptosis 1  | <b>MTT</b>                       | bromuro 3 [4,5 - dimetiltiazol-2-il] - 2,5-difenil-tetrazolio |
| <b>ATB</b>                        | Antibiótico  | <b>NN</b>                        | quelatos diminas  |
| <b>GBM</b>                        | Glioblastoma Multiforme  | <b>O<sub>2</sub></b>             | Oxígeno   |
| <b>Cas IIIa</b>                   | Casiopeína III-La [Cu (5-6 dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilcetonato)] NO <sub>3</sub> | <b>O<sub>2</sub><sup>•</sup></b> | Ión superóxido  |
| <b>CO<sub>2</sub></b>             | Bióxido de Carbono   | <b>OO</b>                        | Quelatos donadores por oxígeno                                |
| <b>Cu</b>                         | Cobre  | <b>PCNA</b>                      | Antígeno Nuclear de Proliferación Celular                     |
| <b>cyt c</b>                      | Citocromo c  | <b>PBS</b>                       | Amortiguador de fosfato salino                                |
| <b>DAPI</b>                       | 4,6-diamidino-2-fenilindol   | <b>RNA</b>                       | Ácido Ribonucleico  |
| <b>DMEM</b>                       | Medio de Eagle modificado por Dulbecco   | <b>rpm</b>                       | Revoluciones por minuto                                       |
| <b>DNA</b>                        | Ácido Desoxirribonucleico  | <b>SDS</b>                       | Dodecilsulfato Sódico   |
| <b>EROs</b>                       | Especies Reactivas de Oxígeno  | <b>SFB</b>                       | Suero fetal bovino  |
| <b>GSH</b>                        | Glutación  | <b>SNC</b>                       | Sistema Nervioso Central                                      |
| <b>GSK-3β</b>                     | Glucógeno sintasa cinasa-3 β   | <b>TRIS-HCl</b>                  | Tris (hidroximetil) aminometano                               |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | Peróxido de Hidrógeno  | <b>WB</b>                        | Western Blot  |
| <b>HCl</b>                        | Ácido clorhídrico  | <b>NN</b>                        | quelatos diminas  |

---

## RESUMEN

Los gliomas son las neoplasias más frecuentes y agresivas del Sistema Nervioso Central, siendo el astrocitoma anaplásico y el Glioblastoma Multiforme (GBM) los de mayor malignidad. La resistencia que presenta el GBM a las diversas terapias, se debe principalmente a las altas tasas de proliferación celular, angiogénesis, invasión e intensa resistencia a la apoptosis, por lo que buscar terapias alternativas es de vital importancia. Las Casiopeínas®, son compuestos de coordinación de cobre, que presentan una actividad antineoplásica en diferentes modelos de cáncer. En el presente trabajo, se determinó el efecto anti-proliferativo y anti-invasivo de la Casiopeína III-La, sobre el glioma experimental humano U-373MG *in vitro*. Se utilizó cultivo de la línea celular de glioma humano U-373 MG, el cual fue tratado con Cas III-La e incubado por 24 horas. Posteriormente, se determinó la viabilidad y proliferación celular por ensayo de MTT y la expresión de PCNA por WB; la muerte celular fue observada por ensayo de TUNEL. Para determinar muerte celular por apoptosis, se observó la expresión de las proteínas Bax y Bcl-2, pBcl-2y activación de la caspasas-3 por WB. La disminución de la invasión celular, se evaluó por ensayo de invasividad (Cell Invasion Assay, Chemicon®), y por los niveles de expresión de GSK-3 $\beta$ , pGSK-3 $\beta$ ,  $\beta$ -catenina y p $\beta$ -catenina. Los resultados muestran que la Cas III-La ejerce un efecto anti-proliferativo al disminuir la viabilidad celular y los niveles de expresión de PCNA; además de promover la muerte celular (TUNEL positivo) mediante la inducción de apoptosis, determinada por el aumento de la proteína pro-apoptotica Bax y la activación de la caspasa ejecutora-3; así como la inactivación del proceso invasivo, observada en el ensayo de invasión, activación de GSK-3 $\beta$  y degradación de  $\beta$ -catenina por WB. Por lo que Cas III-La es un agente prometedor para el tratamiento de GBM, dada su capacidad anti-proliferativa, pro-apoptotica y anti-invasiva.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.2. Glioblastoma

#### 1.2.1. Cáncer

El crecimiento anormal de un tejido se conoce como neoplasia, término que proviene del griego *neos*= nuevo, *plasia*=crecimiento. Cuando la neoplasia permanece localizada es de tipo benigno; ocurre lo contrario cuando invade al tejido en cuyo caso se denomina maligno o más comúnmente, cáncer <sup>1</sup>. El cáncer hace referencia a un conjunto de enfermedades causada por la alteración en la expresión de múltiples genes involucrados en la regulación de la división, diferenciación y muerte celular, en donde células anormales se dividen sin control y pueden invadir otros tejidos, generando daño en el funcionamiento normal del tejido, lo que conduce a la muerte del individuo <sup>2</sup>. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), a nivel mundial el cáncer es de las principales causas de mortalidad. En México, el cáncer ocupa actualmente la tercera causa de muerte <sup>3, 4</sup>.

##### 1.2.1.1. *Hallmarks del cáncer*

En las últimas décadas, el estudio del cáncer ha sido un tema de importancia dentro de la comunidad científica. Investigar y entender, las alteraciones y el comportamiento que presenta éste tipo de células malignas, es de suma importancia para el desarrollo de tratamientos adecuados y específicos. Hoy en día, gracias a estos estudios sabemos que estas células presentan “sellos” o características particulares, llamados “hallmarks”, los cuales permiten diferenciar a las células de cáncer del resto de las células normales <sup>5</sup>. Muchos de estos hallmarks cuentan con biomarcadores particulares, que son de importancia para el diagnóstico de cualquier tipo de cáncer. A continuación se mencionan de manera general las características que actualmente se consideran para las células de cáncer:

- 1) *Capacidad de activar y mantener señales de crecimiento por sí solas.*
- 2) *Evasión de señales supresoras de crecimiento.*
- 3) *Resistencia a la muerte celular.*

- 4) *Inducción de angiogénesis.*
- 5) *Activación de invasión y metástasis.*
- 6) *Activación de inmortalidad de replicación.*
- 7) *Inmuno-evasión.*
- 8) *Inflamación promotora de tumor.*
- 9) *Inestabilidad y mutación genómica.*
- 10) *Reprogramación del metabolismo energético.*

Las células tumorales presentan la capacidad de evadir las vías de señalización que conducen a la muerte celular, la cual se da a partir de la inestabilidad y mutación genómica, originando la pérdida de la función de genes supresores de tumor como **TP53** (Tumor Protein p53) y **RB** (Retinoblastoma), aumento de la expresión de reguladores anti-apoptóticos de la familia de Bcl-2 como **Bcl-2** (B-cell lymphoma 2) y **Bcl-XL** (B-cell lymphoma extra large), y la regulación negativa de factores pro-apoptóticos como **Bax** (BCL2-associated X protein), Bim y **Puma** (p53 upregulated modulator of apoptosis); así como la sobre-activación de señales de supervivencia como **IGF1/2** (Insulin-like growth factor 1/2) <sup>5</sup>.

### 1.2.2. Gliomas

En cuanto a los tumores del Sistema Nervioso Central (SNC), los tumores primarios cerebrales comprenden un grupo diverso de neoplasias, que son a menudo malignos y resistentes al tratamiento. Los tumores de origen neuroepitelial forman una vasta lista de tumores primarios. Los gliomas son el mayor sub-grupo dentro de la clase de neoplasias neuroepiteliales y también son los tumores del SNC más comunes en adultos <sup>6</sup>. De los tumores malignos, el 2% corresponde a neoplasias primarias del SNC <sup>7</sup>, de éste porcentaje, el 80% de los tumores son de origen glial. La tasa de incidencia de los gliomas, varía de acuerdo con la edad de diagnóstico, género, raza, y país. Los gliomas se presentan de 4.67 a 5.73 por cada 100,000 personas <sup>8</sup>.

Histológicamente, los gliomas se clasifican en astrocitomas, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas. Dentro de los astrocitomas, la OMS clasifica a estos tumores en cuatro grados, de acuerdo con su grado de malignidad (**Tabla 1**)<sup>9, 10</sup>.

**Tabla 1. Clasificación de los tumores primarios de SNC (OMS 2007)**

| <b>OMS Clasificación de los Tumores Primarios del SNC</b> |              |
|---|--------------|
| <b>TUMORES DEL TEJIDO NEUROEPITELIAL</b>                  |              |
| <b>TUMORES ASTROCITICOS</b>                               | <b>Grado</b> |
| Astrocitoma pilocítico                                    | I            |
| Astrocitoma difuso  | II           |
| Astrocitoma anaplásico                                    | III          |
| Glioblastoma  | IV           |

### 1.2.3. Glioblastoma

Dentro de los astrocitomas, los tumores malignos y de mayor grado son el astrocitoma anaplásico y el glioblastoma multiforme (**GBM**). Siendo éste último el de mayor grado (grado IV), es el más común y agresivo de los tumores gliales. El GBM se presenta en 0.59 a 3.69 por cada 100,000 personas y corresponde al ~45% de los gliomas<sup>8</sup>. El pronóstico de un paciente con GBM es de aproximadamente un año después del diagnóstico, seguido de la terapia estándar<sup>7</sup>.

Los gliomas malignos, presenta una población heterogénea con un área central de necrosis, rodeado de células viables. Macroscópicamente parece ser un tumor bien delimitado, pero presenta varias zonas de infiltración celular. Las células invasoras migran por la membrana basal de los vasos sanguíneos y por el espacio perivascular<sup>11</sup>.

El astrocitoma grado IV o glioblastoma es clasificado en dos tipos: GBM primario que se desarrolla *de novo* en individuos previamente sanos y GBM secundario, que presenta una progresión maligna de un astrocitoma de bajo grado (grado II o III)<sup>9</sup>. El GBM primario es más frecuente que el secundario, representa el 90% de los gliomas; se presenta en adultos mayores (mayor a 55 años), mientras que el GBM secundario se presenta en adultos jóvenes (45 años o menos)<sup>7, 12</sup>.

En el GBM primario, las alteraciones genéticas presentes son: la sobreexpresión de **EGFR** (Epidermal Growth Factor Receptor), mutación de **PTEN** (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome 10), sobreexpresión de **MDM-2** (Murine double-minute 2 homolog, inhibidor de p53), deleción del Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 2 (p16); mientras que el GBM secundario presenta mutación de p53 y una sobreexpresión de **PDGFR $\alpha$**  (Platelet-Derived Growth Factor Receptor  $\alpha$ ). La sobreexpresión de PDGFR $\alpha$  en GBM secundario promueve la proliferación y supervivencia celular <sup>7,9,13,14</sup>.

En el astrocitoma anaplásico y el GBM, se presentan alteraciones y desregulaciones de oncogenes y supresores de tumores que participan en la gliomagénesis. Los oncogenes importantes que participan en este proceso son PDGF, PDGFR, EGF, EGFR, Cinasa dependiente de ciclina 4 (**CDK4**), MDM -2, Ras, proteína cinasa B (Akt o PKB), **mTOR** (mammalian Target of Rapamycin). Dentro de los supresores de tumores participantes en gliomagénesis se encuentran p53, RB, p16<sup>INK4a</sup> y p15<sup>INK4b</sup>, **DMBT1** (Deleted in Malignant Brain Tumors 1), y PTEN <sup>9</sup>.

El resultado de estas alteraciones es la desregulación de diversos procesos celulares como proliferación, supervivencia, ciclo celular, invasión, migración, y resistencia a la muerte celular, debido a la sobreactivación en vías de señalización como RAS/RAF/MEK/ERK y PI3K/PTEN/AKT/mTOR, que son activadas por factores de crecimiento como EGF, VEGF, PDGF y **HGF** (Hepatocyte Growth Factor). Siendo estas moléculas posibles blancos farmacológicos, para el desarrollo de nuevas y mejores terapias contra el GBM.

#### *1.2.3.1. Proceso Invasivo*

La invasión celular, es un proceso esencial en la tumorigénesis de los gliomas. En donde, las células tumorales se infiltran a través de la matriz extracelular, dando como resultado la invasión local del tejido. En gliomas, los de mayor grado, se caracterizan por ser tumores altamente infiltrantes; por lo que la recesión del tumor mediante cirugía, no es un tratamiento exitoso, ya que existe una recurrencia del mismo, donde las células malignas se han infiltrado hacia el área que rodea al tumor <sup>9</sup>.

Los gliomas a diferencia de otras neoplasias, no desencadenan invasión hacia otros tejidos u órganos (metástasis), su patrón de invasión se da hacia los vasos sanguíneos y a los axones más mielinizados que rodean al tumor <sup>15</sup>. La desregulación de genes que codifican a proteínas de adhesión celular, migración celular y proteasas de la Matriz extracelular (MEC), son alteraciones características de gliomas durante el proceso invasivo <sup>5</sup>.

Los procesos de angiogénesis, crecimiento e invasión, se encuentran altamente relacionados en gliomas. En gliomas existe una remodelación de la MEC, que se lleva a cabo por proteasas como metaloproteasas de matriz (MMPs) entre otras, y sus respectivos inhibidores <sup>9</sup>.

El proceso de invasión en gliomas, se realiza a través de cuatro pasos:

a) Separación de las células tumorales del tumor primario

La pérdida de uniones de contacto célula-célula del tumor primario, es un paso importante para el proceso invasivo en neoplasias malignas <sup>16</sup>. Estas uniones son mediadas por miembros de la superfamilia de las cadherinas, que comprenden de glucoproteínas transmembranales, cuyos dominios extracelulares median interacciones homotípicas, dependientes de calcio extracelular, con las cadherinas de células adyacentes, proporcionando una especificidad tisular a la unión. El dominio citosólico de las cadherinas interacciona con el citoesqueleto de actina (F-actina) indirectamente, a través de su unión con  $\beta$ -catenina y  $\alpha$ -catenina <sup>16</sup>. La E(epidermal)-cadherina es uno de los miembros más estudiados de ésta superfamilia. En general, E-cadherina es considerada como un supresor de tumores, por su capacidad de interactuar con  $\beta$ -catenina, limitando su concentración en el citosol, en donde puede trasladarse al núcleo, unirse a factores de transcripción de la familia de **TCF** (T-Cell Factors)/LEF (Lymphoid Enhancer Factors), e inducir la transcripción de genes involucrados en procesos proliferativos (ciclina D, c-myc, c-jun, fra-1) e invasión tumoral (uPAR, CD44, MMP-9) <sup>17</sup>. La pérdida de E-cadherina, es considerada la razón principal para la ruptura del contacto estrecho célula-célula, en la progresión de tumores a un estado invasivo, en carcinomas <sup>16</sup>. En gliomas, la baja expresión de E-cadherina es importante para el crecimiento y la invasividad. En experimentos *in vivo*, se ha encontrado correlacionada la expresión de E-cadherina con un aumento en la invasividad del tumor, en ratones xenotrasplantados con una línea celular de glioma <sup>18</sup>. También se ha observado que la disminución de E-cadherina en gliomas, se encuentra

relacionada con el grado de malignidad de tumor, a mayor grado de malignidad del glioma, menos expresión de E-cadherina <sup>19</sup>.

### b) Adhesión de las células tumorales a las proteínas de la MEC

El reconocimiento de la MEC por las células tumorales, se realiza a través de los receptores de superficie celular, las Integrinas, que se encargan de la adhesión celular a los componentes protéicos de la MEC <sup>15</sup>. Las integrinas, comprenden una larga familia de proteínas heterodiméricas de superficie celular, que participan en la adhesión célula-célula y célula-MEC. Son los receptores principales que reconocen proteínas de la MEC como laminina, fibronectina, entactina, vitronectina, colágeno, etc. Se encuentran conformadas por dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ ; cada subunidad cuenta con un dominio extracelular, una región en membrana y un dominio en el citoplasma, éste último dominio se encuentra interactuando con moléculas intracelulares, y puede participar en vías de señalización; como la reorganización del citoesqueleto, la motilidad celular, la transducción de señales, etc. <sup>16</sup>. Además se encuentran implicadas en procesos biológicos como inflamación, trombosis, y el proceso de invasión en células tumorales. Se sabe que la isoforma de la Integrina  $\alpha 3\beta 1$ , es la que se encuentra mayormente expresada en gliomas. La Integrina  $\alpha 3\beta 1$  participa en la invasión de las células de glioma, siendo ésta la más expresada en éste tipo de tumores al igual que su sustrato, laminina-5. La laminina-5 pertenece a un grupo de glicoproteínas de la membrana basal, promueve la migración y adhesión celular en glioma, de manera dependiente a Integrina  $\alpha 3\beta 1$  <sup>20</sup>. Además de la expresión elevada de  $\alpha 3\beta 1$ , también se observa un aumento en la expresión de las Integrinas  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 1$  y  $\alpha v\beta 3$  en células de astrocitoma *in vivo*, en comparación con gliomas de bajo grado o tejido normal de cerebro <sup>21</sup>.

Las integrinas regulan vías de señalización a través de la activación de proteínas tirosina cinasas, como **FAK** (Focal Adhesion Kinase), cinasas de la familia Src, **Abl** (ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase) y la **ILK** (Integrin-Linked Kinase). La activación de FAK, mediante su fosforilación puede dar lugar a la activación de diferentes vías de señalización como las rutas de MAPK, y PI3K. PI3K activa a Akt, que promueve la supervivencia celular, mediante la fosforilación e inactivación de la proteína pro-apoptótica Bad y caspasa-9 <sup>22</sup>. Además Akt induce la expresión de metaloproteasas mediante la activación del factor transcripcional **NF- $\kappa$ B** (Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells).

c) Degradación de la MEC por proteasas secretadas por las células tumorales

En el SNC, tres grupos principales de proteasas y sus inhibidores se encuentran participando en la degradación de la MEC: 1) las MMPs y sus inhibidores (TIMPs); 2) serin proteasas, como uroquinasas, plasminógeno activador (tPA) y los inhibidores de plasminógeno activador (PAIs); y 3) las cisteína proteasas (catepsina, caspasas, calpaínas)<sup>23</sup>.

Las MMPs son una familia de enzimas, que degradan varias moléculas de la MEC, como proteoglicanos y otros tipos de colágeno para procesos de cicatrización de herida, crecimiento y reorganización ósea, angiogénesis, infiltración de macrófagos y el crecimiento del cono axonal. Son sintetizadas como zimógenos inactivos, contienen  $Zn^{+2}$ , y requieren de  $Ca^{+2}$  para su actividad proteolítica. Además se encuentran reguladas por sus inhibidores TIMP-1, -2, y 3, que se unen irreversiblemente a las proteasas<sup>15</sup>.

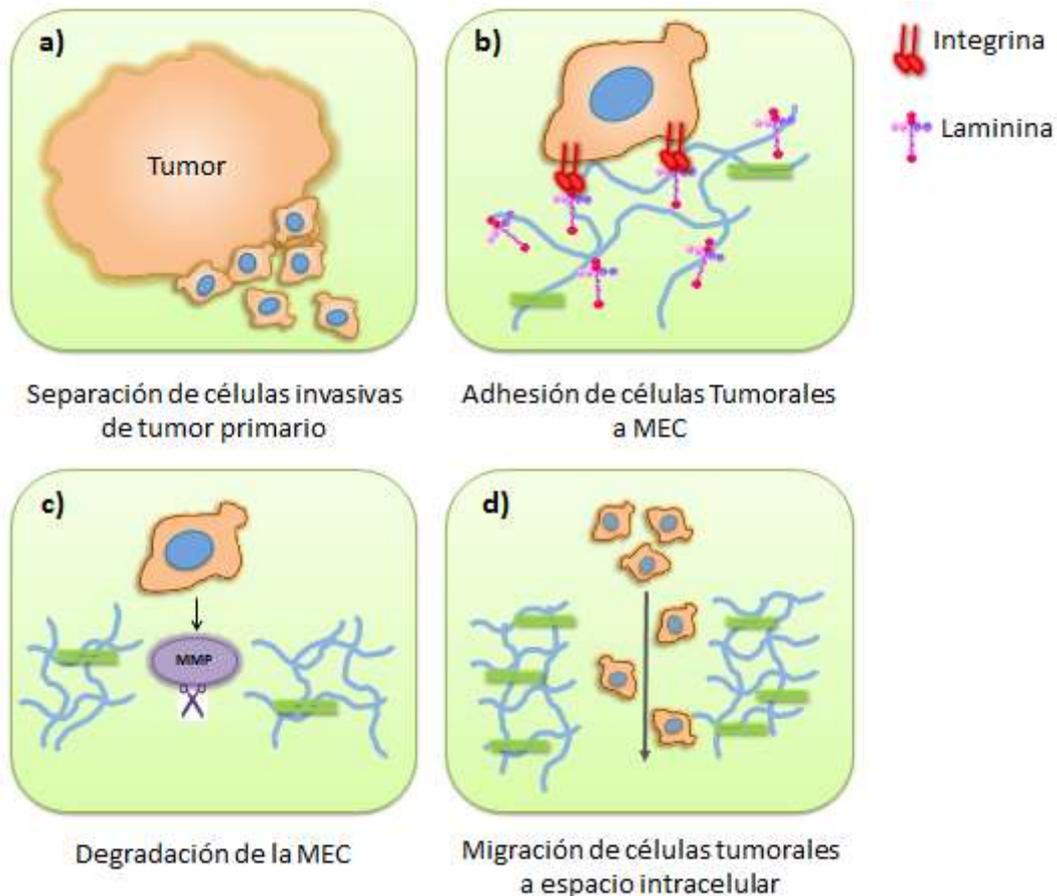
En diferentes tipos de neoplasias, las MMPs tienen un papel importante en el proceso angiogénico e invasivo. MMP-2 (gelatinasa A, 72 kDa) se sobre-expresa en gliomas. Presentan una alta actividad enzimática contra el colágeno tipo IV, que es uno de los componentes principales de la membrana basal<sup>24</sup>. La MMP-2 co-localiza con  $\alpha\beta3$ , en la superficie de las células invasivas tumorales y en células endoteliales, lo que facilita la activación de MMP-2 y la migración celular por  $\alpha\beta3$ <sup>25</sup>. Por otra parte MMP-2 se activa vía MT1-MMP (membrane-type 1 MMP), la cual también se sobre-expresa en gliomas humanos<sup>23</sup>.

Las proteasas, activadoras de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA), miembros de la familia de serina proteasas, participan en la degradación y regeneración de la membrana basal y de la MEC, en el proceso invasivo de células tumorales. Al igual que las MMPs, son sintetizadas como zimógenos; y son activadas a través de sus receptores uPAR. uPA cataliza la activación de plasminógeno a plasmina. La activación de la plasmina, lleva a la liberación de diferentes enzimas proteolíticas como gelatinasa, fibronectina, fibrina, laminina. Se ha descrito que, los niveles del receptor uPAR es mayor en gliomas de alto grado (grado IV), que en los gliomas de menor malignidad<sup>15,26</sup>.

d) Migración de las células tumorales

La degradación de la MEC por proteasas, crea un espacio intercelular, el cual es invadido por las células tumorales. Estas células migran a través de un mecanismo activo, que requiere de la síntesis de membrana, la rotación (turnover) del receptor y el reordenamiento de componentes del citoesqueleto <sup>11</sup>.

La migración de las células invasivas tumorales, se realiza a través de la protrusión de la membrana celular. Estas protrusiones tienen la habilidad de remodelar y degradar la MEC. Las lamelopodias, estructuras formadas por actina, se forman en la región delantera de la célula, se adhieren y se desplazan por las fibras de la MEC <sup>27,28</sup>. Por otro lado, las invadopodias, son estructuras que degradan la MEC, presentan proteínas reguladoras de actina, moléculas de adhesión, proteínas adaptadoras, proteínas de remodelación de membrana y proteasas de matriz <sup>27</sup> (**Figura 1**).



**Figura 1.** El proceso de invasión en gliomas, se realiza a través de cuatro pasos: a) Separación de las células tumorales del tumor primario, b) Adhesión de las células tumorales a las proteínas de la MEC, c) Degradación de la MEC por proteasas secretadas por las células tumorales, y d) Migración de las células tumorales.

### 1.2.3.2. Vía GSK/ $\beta$ -catenina

Los gliomas se caracterizan por ser tumores altamente infiltrantes. La cinasa GSK-3 $\beta$  (Glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ), se encuentra implicada en procesos celulares como crecimiento, proliferación, supervivencia, estabilidad del citoesqueleto y apoptosis<sup>29</sup>. Esta cinasa, se encarga de fosforilar proteínas que participan en diferentes vías de señalización y procesos metabólicos como la carboxilasa acetil coenzima A, AMPK (cyclic adenosine monophosphate (AMP)-dependent protein kinase) y piruvato deshidrogenasa. También participa en la formación del complejo de degradación de  $\beta$ -catenina<sup>30</sup>.

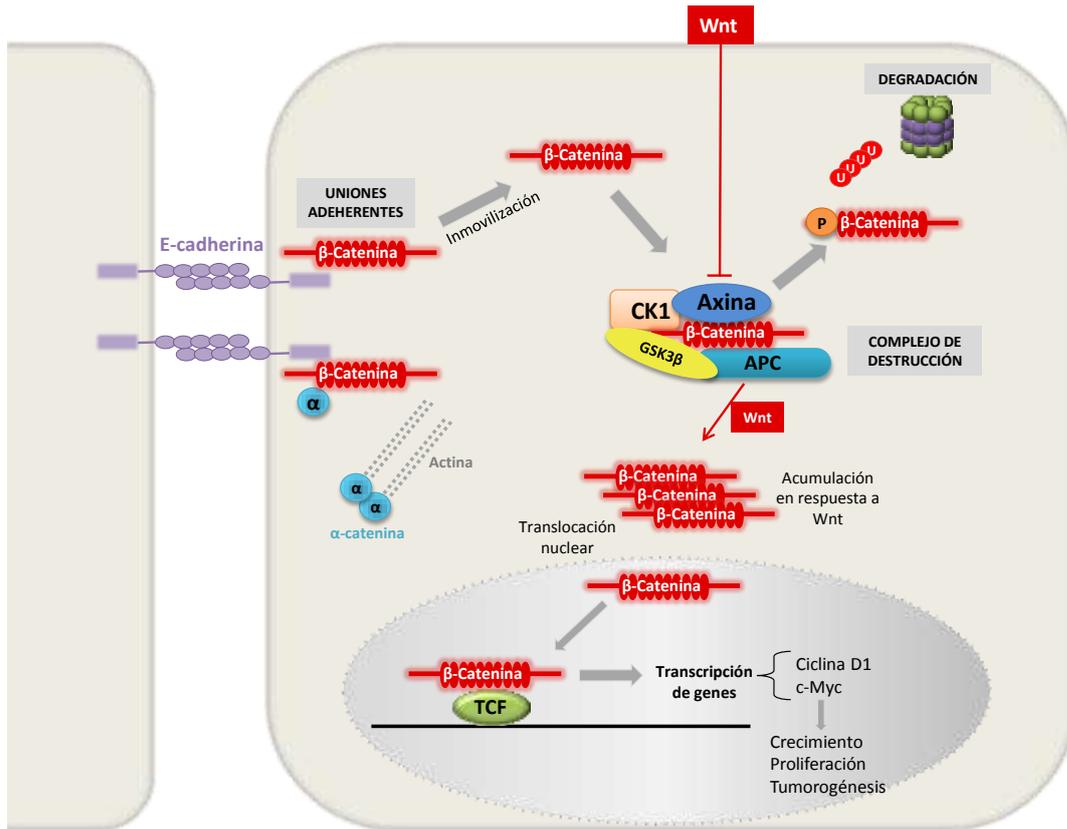
$\beta$ -catenina es una proteína que participa en procesos como desarrollo y homeostásis. Es multifuncional, puede formar uniones adherentes celulares, unida a E-cadherina en la superficie celular, y con  $\alpha$ -catenina en el citosol. E-cadherina estabiliza a  $\beta$ -catenina mediante  $\alpha$ -catenina, evitando que se encuentre libre en citosol. Cuando  $\beta$ -catenina se encuentra libre en citosol, puede tomar dos caminos, a) ser degradada por el complejo multiprotéico de destrucción, o b) mediante la activación del ligando **Wnt** (Wingless/int),  $\beta$ -catenina se transloca al núcleo y actúa como una oncoproteína (**Figura 2**)<sup>31</sup>.

La actividad de  $\beta$ -catenina es regulada, por su fosforilación en residuos serin/treonina, localizados en la región amino terminal de la proteína<sup>32</sup>. Cuando  $\beta$ -catenina se encuentra libre en citoplasma, es degradada por el complejo multiprotéico que comprende CK1 $\alpha$ /GSK-3 $\beta$ / APC/ Axina. La enzima caseína cinasa 1 $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ), fosforila a  $\beta$ -catenina en primer instancia en el residuo Ser<sup>45</sup><sup>33</sup>; la GSK-3 $\beta$ , fosforila nuevamente a  $\beta$ -catenina para ser reconocida por el complejo ubiquitin ligasa E3, para su posterior degradación por el proteosoma 26S; la proteína supresora de tumores llamada **APC** (Adenoma Polyposis Coli), aumenta la afinidad del complejo para una efectiva fosforilación de  $\beta$ -catenina; y la proteína de agregación Axina, mantiene unido al complejo<sup>34</sup>.

$\beta$ -catenina también actúa como una oncoproteína a través de la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina la cual se encuentra alterada en el GBM. Esta vía es activada a través de la interacción del ligando Wnt con el receptor **Fzd/LRP** (Frizzled/ Low density lipoprotein receptor-related protein), formando el complejo Dishevelled (Dvl)-Fzd. Dishevelled inactiva al complejo de degradación de  $\beta$ -catenina, a través del secuestro de Axina y GSK-3 $\beta$  hacia la membrana plasmática<sup>35</sup>.  $\beta$ -catenina libre, puede entrar a

núcleo y unirse a factores de transcripción de la familia de TCF/LEF, liberando a la proteína Groucho del complejo TCF/LEF<sup>31</sup>, activando la transcripción de genes como ciclina D1 y la familia de factores de transcripción Myc, relacionados con el crecimiento y la proliferación celular<sup>30</sup>. La alteración de ésta vía conduce a la proliferación neoplásica en varios tipos de cáncer, incluido el glioma<sup>34,35</sup>.

Otra manera de regular la actividad la cinasa GSK-3 $\beta$ , es mediante su fosforilación en residuos de serina/treonina, con un efecto inhibitorio, y en residuos de tirosina, con un efecto activador<sup>36,37</sup>. Las vías PI3K/AKT/ GSK-3 $\beta$  y Wnt/ $\beta$ -Catenina, son las encargadas regular a GSK-3 $\beta$ . Akt fosforila a GSK-3 $\beta$  en el residuo de Serina 9, inhibiendo su actividad catalítica<sup>30</sup>. Se sabe que éstas vías de regulación (PI3K/AKT y Wnt/ $\beta$ -Catenina), se encuentran desreguladas en diferentes tipos de cáncer, incluyendo los gliomas<sup>29</sup>.



**Figura 2. Vía canónica Wnt/ β-catenina.** β-catenina es una proteína multifuncional, a) es estabilizada por E-cadherina, formando uniones adherentes celulares, en dónde también interactúa con α-catenina, estabilizando el citoesqueleto; b) Cuando β-catenina es liberada al citosol, es degradada por un complejo de destrucción, a través de su fosforilación para ser ubiquitinada y reconocida por proteosoma; c) También actúa como una oncoproteína, cuando la vía Wnt, bloquea a su complejo de degradación, con lo que β-catenina puede translocarse a núcleo y unirse al factor de transcripción TCF, llevando a la transcripción de genes blancos de la vía Wnt, que se encuentran implicados en procesos de morfogénesis, proliferación y diferenciación (Modificado de Valenta, Hausmann, & Basler, 2012)

### 1.2.3.3. Tratamiento

Hoy en día el tratamiento que se aplica en pacientes con GBM es la resección del tumor mediante cirugía como intervención inicial, seguida de radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia <sup>7</sup>. La elección del tratamiento en éste tipo de gliomas, depende de varios factores, como por ejemplo, la edad del paciente, el volumen y la localización del tumor. La Temozolamida (TMZ) es el fármaco de elección para el tratamiento de GBM, el cual actúa como un agente alquilante del DNA <sup>38</sup>.

La TMZ sufre un cambio con el pH fisiológico formando un metabolito activo, 1-triazenoimidazol-4-carboxamida (MITC), éste metabolito metila al DNA en diferentes posiciones, N<sup>7</sup> de la guanina, N<sup>3</sup> de la adenina y la O<sup>6</sup> de la guanina, interfiriendo con la replicación del DNA <sup>9</sup>. Éste agente es generalmente tolerado por el organismo de acuerdo con las dosis, pero su uso por tiempos prolongados no es recomendado, ya que presenta un efecto inmunosupresor. Además de que es un fármaco alquilante potencialmente cancerígeno, por lo que presenta un riesgo al desarrollar neoplasias malignas secundarias <sup>38</sup>. Estudios clínicos indican que la supervivencia media de pacientes con GBM que reciben tratamiento con temozolomida después de radioterapia postoperatoria es de 14.6 meses en comparación con los 12.1 meses de supervivencia de los pacientes que reciben sólo radioterapia <sup>8</sup>. A pesar de haber un ligero mejoramiento con el tratamiento de TMZ, existe una resistencia a TMZ, debido a la O<sup>6</sup>-metil-guanina metil transferasa (MGMT), una proteína reparadora de DNA. Ésta proteína metila el grupo alquilo O<sup>6</sup> de guanina, reparando las metilaciones formadas por la exposición al agente alquilante (TMZ). Creando una resistencia a éste agente <sup>12</sup>. Las células que presentan una mayor expresión de MGMT, son más resistentes a agentes alquilantes. Mientras que la pérdida de MGMT o de su expresión, produce una respuesta favorable al tratamiento con TMZ <sup>9</sup>.

Existen otros agentes que son utilizados para el tratamiento con quimioterapia para gliomas malignos como las nitrosureas (BCNU [Carmustine], CCNU [Lomustine]), compuestos de platino (carboplatino, cisplatino), Bevacizumab (BVZ), tamoxifeno, erlotinib y Procarbazina (PCV). Actualmente, también se encuentran en estudio terapias dirigidas como inmunoterapias, terapias génicas, vacunas tumorales, etc. <sup>9</sup>. Pese a los diversos tratamientos, la supervivencia del paciente es aún baja, de aproximadamente 2 años <sup>38</sup>. Esto se debe a que el glioblastoma presenta una alta tasa de proliferación celular, resistencia a la apoptosis, angiogénesis y una marcada invasividad.

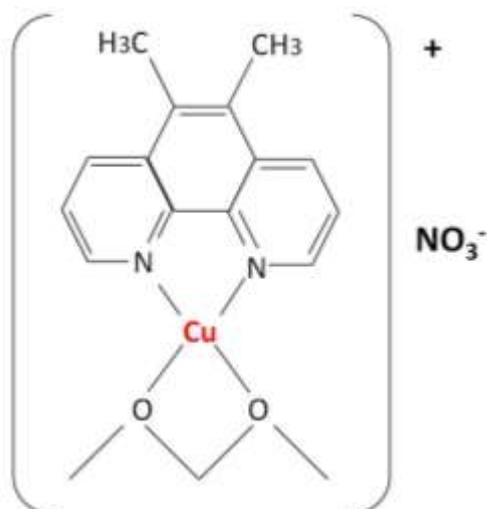
Por lo que estudiar la fisiopatología e identificar nuevos tratamientos alternativos es de vital importancia.

### 1.3. Casiopeínas

En la búsqueda de nuevos tratamientos alternativos, con propiedades antineoplásicas no tóxicas, un grupo de investigadores de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), encabezado por la Dra. Lena Ruíz Azuara, diseñó una serie de compuestos con actividad antineoplásica, llamados Casiopeínas. Las Casiopeínas son una familia de compuestos de coordinación con centro metálico de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), donde en su esfera de coordinación presenta ligantes N-N u O-O. Donde el donante N-N es un sustituto dimina aromático (1,10 - fenantrolina o 2,20-bipiridina); y el donante O-O es (acetilacetato o salicilaldehidato). Su fórmula general es  $[\text{Cu} (\text{NN}) (\text{AA})] \text{NO}_3$ , (AA = NO, OO) <sup>39,40</sup>. Para el diseño de éstas moléculas, se basaron en tres factores: 1) los compuestos deben contener un metal esencial (en éste caso el Cu) logrando una disminución en la toxicidad del compuesto, 2) contener quelatos que favorecen la configuración *cis* alrededor del ión metálico, y 3) contener quelatos mixtos que presentan diferentes niveles de hidrofobicidad <sup>41</sup>.

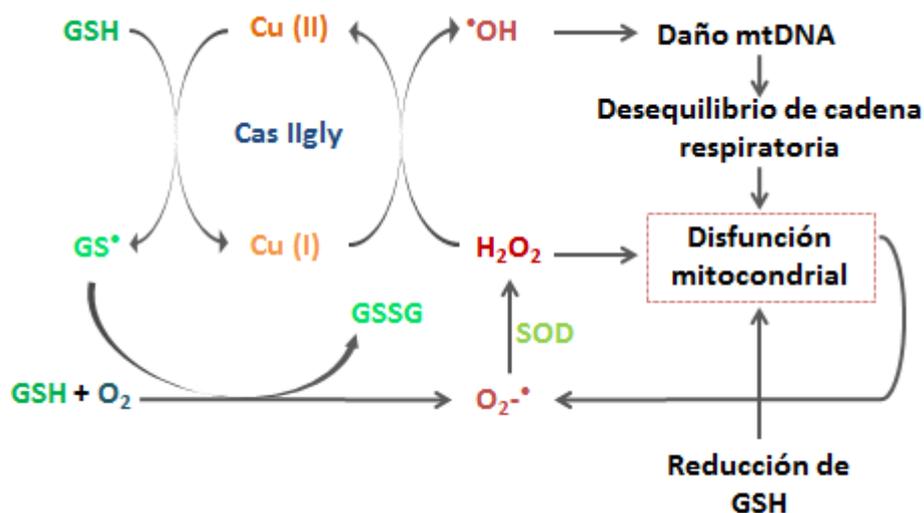
Actualmente, se tienen descritos diferentes trabajos en los cuales se presenta la actividad anti tumoral de éstos compuestos en diferentes modelos de cáncer tanto *In vitro* como *in vivo*. Las Casiopeínas han sido probadas y han presentado un efecto antineoplásico en modelos de carcinoma de ovario humano (CH1) y leucemia murina (L1210) <sup>41</sup>, hepatoma de rata (AS-30D) <sup>42</sup>, cáncer cervicouterino (HeLa) <sup>43</sup>, glioma murino (C6) <sup>44, 45</sup>, meduloblastoma humano (Daoy) <sup>46</sup>, cáncer de colon HCT-15 <sup>47</sup>, Cáncer de pulmón (A549) (H157) <sup>48</sup>, melanoma murino B16 <sup>49</sup>.

En el presente trabajo, se evaluó el efecto antineoplásico de la Casiopeína III-La [Cu (5-6 dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)] NO<sub>3</sub> (**Figura 3**).



**Figura 3.** Estructura de Casiopeína III-La [Cu (5-6 dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilcetonato)] NO<sub>3</sub>

Hasta el momento, los mecanismos de acción por los cuales estos compuestos de coordinación presentan dicha actividad antineoplásica, no se conocen del todo. Pero se sugiere, que se encuentran participando en reacciones Redox. Kachadourian y colaboradores, han propuesto que la glutatión (GSH) tiene un papel importante en la producción de EROs al reaccionar con la Cas IIgLy. En la **Figura 4**, se muestra como GSH reduce al complejo de cobre de la Casiopeína, pasando de Cu<sup>2+</sup> a Cu; y forma el radical glutatil (GS<sup>•</sup>), éste GS<sup>•</sup> puede dar lugar a dos reacciones: a) reaccionando con otro GS<sup>•</sup> dando glutatión oxidado (GSSG), o b) GS<sup>•</sup> puede reaccionar con GSH y oxígeno formando anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>) mas GSSG. La superóxido dismutasa (SOD) convierte a O<sub>2</sub><sup>-•</sup> en peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reacciona con la Casiopeína reducida, formando radical hidroxilo (HO<sup>•</sup>). Lo que produce un daño en el DNA mitocondrial, que desregula la traducción de proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial, y un aumento del estrés oxidativo, lo que conlleva a una disfunción mitocondrial por la disminución en los niveles de GSH (al ser una proteína antioxidante), y por el aumento en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>48</sup>.



**Figura 4.** Producción de EROs a partir de la interacción de Casiopeínas con GSH. (Modificado de Kachadourian et al., 2010)

Las especies reactivas de oxígeno inducen un daño oxidativo en lípidos, proteínas y DNA, perturbando el equilibrio Redox y a su vez alterando las vías de señalización. La formación de EROs también conduce a muerte celular por apoptosis <sup>50</sup>.

Por otro lado, éstos compuestos tienen la capacidad de unirse al DNA, y degradar DNA y RNA <sup>51</sup>. Ésta interacción del compuesto de cobre al DNA, se da a través de la unión de los anillos aromáticos (1-10 fenantrolina y bipyridina) de la Casiopeína <sup>52</sup>, en sitios de adenina y timina principalmente <sup>53</sup>. La unión de las Casiopeínas al DNA, inducen muerte celular por apoptosis.

## 1.4. Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada, que tiene un papel importante en diferentes procesos biológicos. Por ejemplo, durante el desarrollo embrionario éste proceso regula la homeostasis en los procesos de proliferación y diferenciación celular<sup>54</sup>. También cuando las células ya no son necesarias o presentan algún tipo de daño, las células tienen la capacidad de “auto-destruirse” a través de la apoptosis<sup>55</sup>.

Las células que presentan éste tipo de muerte, se caracterizan por presentar a) una condensación del núcleo y citoplasma, b) fragmentación nuclear, y c) inmersión de restos celulares a fagosomas o cuerpos apoptóticos, que se forman a partir de la membrana celular, y son fagocitados por macrófagos o células vecinas<sup>54,55</sup>. Además de las características morfológicas que presenta una célula en proceso de apoptosis, existen moléculas características que participan en ésta vía. Se han identificado cuatro grupos de moléculas que participan en el proceso de apoptosis, que son las caspasas, proteínas adaptadoras, miembros de la superfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral (TNF-R), y miembros de la familia de proteínas Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)<sup>56</sup>.

### 1.4.1. Caspasas

Las caspasas (cysteine aspartatic acid proteases) son una gran familia de cisteín proteasas, activadas específicamente en células apoptóticas, evolutivamente se encuentra altamente conservadas en diferentes organismos. En mamíferos se tienen identificadas alrededor de 14 caspasas<sup>57</sup>. Estas cisteín proteasas se encuentran regulando y activando el proceso de apoptosis. Las caspasas son sintetizadas como zimógenos enzimáticamente inactivos o pro-caspasas. Existen dos tipos de caspasas las iniciadoras (caspasa -8, -9, -10) y las ejecutoras (efectoras) (caspasa -3, -6, -7), la activación de las primeras conduce a la activación proteolítica de las caspasas ejecutoras, que son las encargadas de degradar proteínas importantes para la proliferación, sobrevivencia y reparación del DNA, como Raf, ERK, PKC $\delta$ , laminina, gelsolina, MDM-2 y Poly(ADP-ribose) Polymerases (PARP); así como la degradación de ICAD, un inhibidor de DNAsas activadas por caspasas (CAD). Las CADs activadas, se translocan a núcleo, induciendo el rompimiento del DNA internucleosomal (patrón de escalera)<sup>56,58</sup>. Existen dos mecanismos de señalización por los cuales las células

pueden llevar a la muerte por apoptosis: la vía extrínseca o mediada por receptores de muerte, y la vía intrínseca o vía mitocondrial (**Figura 5**).

#### 1.4.2. *Vía Extrínseca o vía Receptores de Muerte*

Esta vía es activada a través de señales extracelulares inductoras de muerte, provenientes de las células vecinas. Y se desencadena por la activación de los receptores de muerte y la unión con su ligando.

Los miembros de la superfamilia de receptores de TNF-R (Death Receptors of Tumor Necrosis Factor), son proteínas de transmembrana, que participan en diferentes procesos como proliferación celular, supervivencia, diferenciación o muerte celular; esto depende del tipo celular y de las señales que éstos reciben. Los receptores de muerte DR (death receptor) que participan en el proceso apoptótico son CD95 (también conocidos como APO-1 o Fas) y TNF-R1, presentan una región llamada dominio de muerte DD (death domain) en el citoplasma. También presentan un dominio extracelular (rico en cisteína), donde son activados por sus respectivos ligandos. Los ligandos comprenden una familia de ligandos de TNF, se encuentran estructuralmente relacionados con sus receptores. Algunos de éstos son el TRAIL o APO-2-L (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand), y para el receptor CD95 (APO-1 o Fas), su ligando CD95-L (APO-1-L o Fas-L) <sup>56</sup>. La unión del ligando a su receptor, conduce a la trimerización del receptor y al reclutamiento de proteínas adaptadoras en los DD. Formándose el complejo DISC (Death-Inducing Signaling Complex).

Las proteínas adaptadoras, se encargan de hacer una conexión entre los receptores de muerte (reguladores apoptóticos), y las caspasas (efectores de muerte). Esta unión se establece mediante la interacción de dominios homólogos entre las moléculas adaptadoras y sus objetivos. En donde, la región DD del DR, se une a su región homóloga en las moléculas adaptadoras como FADD (Fas-associated death domain) para CD95, TRADD (TNF-R1-Associated Death Domain), y la proteína RIP (Receptor-Interacting Protein). Una vez que se presenta éste entrecruzamiento de los DD homólogos entre los miembros de la familia de TNF-R y las proteínas adaptadoras, se da la agregación de caspasas y con ello su activación. El reclutamiento y la agregación de caspasas se dan en la región DED (Death Effector Domain) de las moléculas adaptadoras. Algunas caspasas iniciadoras como caspasa-8 y -10 presentan repeticiones de DEDs. La activación de las caspasas iniciadoras, da lugar a la activación de las caspasas efectoras, lo que conduce a la muerte celular <sup>56</sup>. La

caspasa-8 además de activar a la pro-caspasa-3, puede de igual manera activar la vía de muerte mitocondrial. Ya que activa a la proteína pro-apoptótica Bid, que se encuentra en citosol de forma inactiva. Bid<sub>t</sub> induce la dimerización y traslocación de la proteína pro-apoptótica Bax, del citosol a la mitocondria, formándose el poro de Bax, por el cual se libera citocromo c (*cyt c*), desencadenando todo el proceso de muerte por la vía mitocondrial<sup>57</sup>.

Por otra parte Bax inhibe a la proteína anti-apoptótica Bcl-2, permitiendo la apertura del poro de transición de permeabilidad. La activación de Bax es esencial para la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, mientras que Bcl-2 activo, bloquea el poro<sup>59</sup> Bax sufre un cambio conformacional en su activación, llevando a oligodimerización, promoviendo la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. El poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP), es un complejo multiprotéico, que se sitúa en el sitio de contacto de las membranas mitocondriales externa e interna<sup>60</sup>. El PTP, está constituido de proteínas de membrana interna como ANT (adenine nucleotide translocator), y de proteínas de membrana externa, como porin VDAC (voltaje dependant anion channel)<sup>61</sup>. La proteína anti-apoptótica Bcl-2, previene la formación del poro, mediante su unión a Bax<sup>60</sup>. La apertura de este poro, facilita la liberación de varios factores pro-apoptóticos, como *cyt c*, de mitocondria a citosol, activando la cascada de señalización de muerte vía mitocondrial<sup>62</sup>.

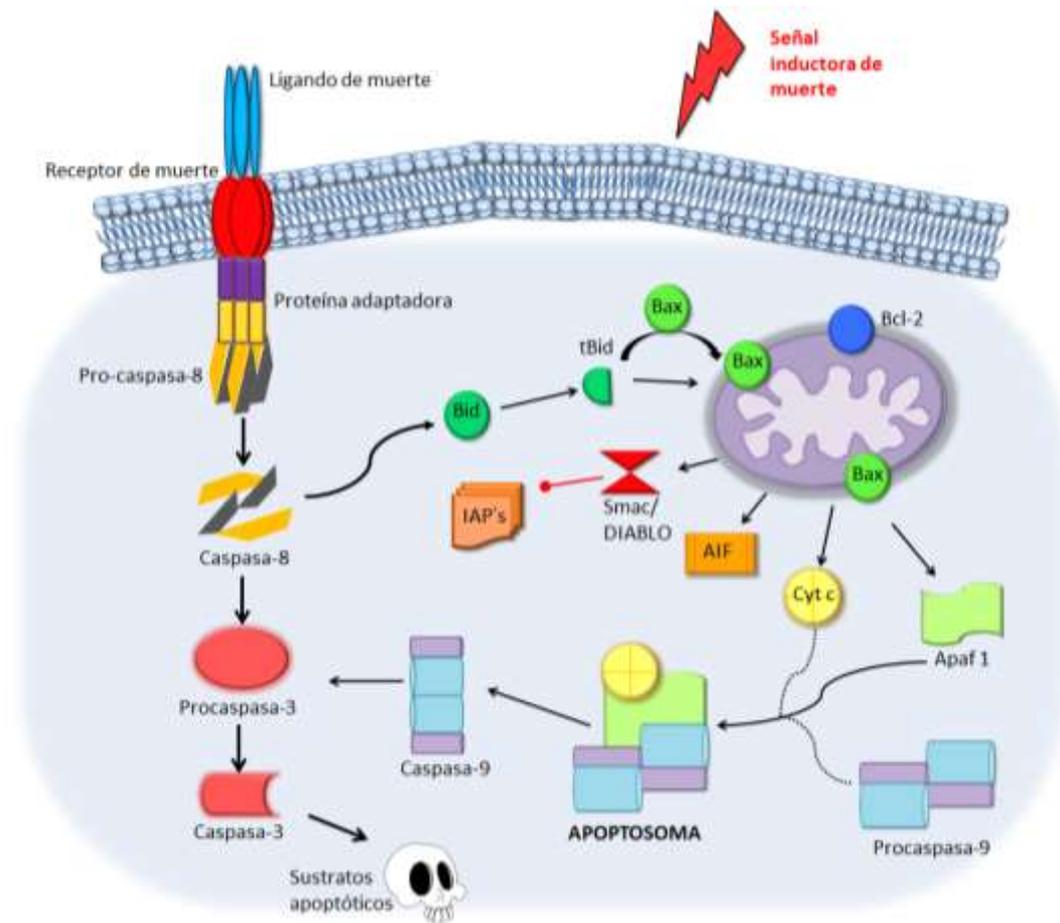
#### 1.4.3. Vía intrínseca o mitocondrial

La activación de ésta segunda vía de muerte celular programada, se activa como respuesta a señales extracelulares (fármacos) e intracelulares (daño al DNA). Estos estímulos convergen en la mitocondria, regulando a miembros de la familia de Bcl-2.

La respuesta de la mitocondria a señales de estrés celular induce la liberación de *cyt c*, por la apertura del poro de transición de permeabilidad. La liberación de *cyt c* en el citosol, junto con dATP, Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor 1) y pro-caspasa-9, forman el complejo "apoptosoma"; éste complejo activa a la caspasa-9, la cual activa a la caspasa-3 efectora, que es la encargada de desencadenar los procesos de muerte celular.

Además de la liberación de *cyt c* al citosol, es liberado AIF (apoptosis-inducing factor), el cual induce apoptosis por un mecanismo independiente de caspasas. También es

liberado Smac/DIABLO (second mitochondrial-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with a low isoelectric point), favoreciendo el proceso de apoptosis a través de la inhibición de las (IAPs), que son proteínas inhibidoras de la actividad de caspasas-8 y -3<sup>57,58</sup>.



**Figura 5. Vía de muerte celular programada: Apoptosis. a)** Vía extrínseca o de Receptores de muerte (izquierda), es activada por miembros de la superfamilia de receptores TNF-R. La unión del ligando de muerte a su receptor, hace que el receptor se trimerice y se forme el complejo DISC. DISC recluta a proteínas adaptadoras, y pro-caspasa-8, que da lugar a la activación de caspasa-8 iniciadora. La caspasa-8, a su vez activa a la caspasa efectora, Casapsa-3, que regula señales (MUERTE). **b)** Vía intrínseca o mitocondrial (derecha), es regulada por miembros de la familia de Bcl-2. A través de un estímulo de muerte, Bax se transloca de citoplasma a mitocondria, y permeabiliza la membrana externa, con ello liberando citocromo c, AIF, Apaf-1 y Smac/DIABLO. *cyt c*, Apaf-1 y Casapsa-9, forman el apoptosoma, que conduce a la activación de la caspasa-3. **c)** Ambas vías convergen en la activación de la caspasa ejecutora. La activación de la caspasa-3 es inhibida por los inhibidores de apoptosis (IAPs), estos inhibidores a su vez son inhibidos por Smac/DIABLO. Existe un entrecruzamiento entre estas dos vías, y es dada por la activación de la proteína pro-apoptótica de la familia de Bcl-2, Bid, por la caspasa-8. Bid activada, se transloca a mitocondria, donde promueve la liberación de *cyt c* (A partir de datos en Hengartner, 2000).

## 2. HIPÓTESIS

Si la Casiopeína III-La presenta un efecto antineoplásico, entonces se observará un efecto pro-apoptótico y anti-invasivo a las diferentes dosis del fármaco en la línea celular de glioma humano U-373 MG *in vitro*,

## 3. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto anti-proliferativo, pro-apoptótico y anti-invasivo de Cas III-La en el glioma experimental de humano U-373 MG *in vitro*.

### 3.2. Objetivos específicos

- a) Determinar el efecto anti-proliferativo y pro-apoptótico del fármaco sobre el glioma U-373 MG *in vitro*, mediante la determinación de la viabilidad celular usando el ensayo de MTT y cuantificación de los niveles de expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) por western blot (WB), así como la inducción de apoptosis, analizando los niveles de expresión de la proteína anti-apoptótica (Bcl-2, pBcl-2) y pro-apoptótica Bax y la activación de la caspasa-3 por WB.
  
- b) Determinar el efecto anti-invasivo del fármaco a través de los ensayos de Matrigel, así como la determinación de las moléculas importantes para dicho proceso tales como: GSK-3 $\beta$ , pGSK-3 $\beta$ ,  $\beta$ -catenina y p $\beta$ -catenina por WB.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.2. Síntesis de Casiopeína III-La

La Casiopeína III-La [Cu (5-6 dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilcetonato)] NO<sub>3</sub> fue sintetizada en el Departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química de la UNAM, tras el procedimiento reportado en las patentes anteriores<sup>39,40</sup>.

### 4.3. Manejo de cultivo celular

Se utilizaron células de glioma humano U-373 MG (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA). Las células fueron sembradas en botellas de cultivo de 75cm<sup>2</sup> con 10ml de medio de cultivo Dulbecco Modificado (DMEM, Sigma Chemical, USA), suplementado con 10% SFB (Gibco), más 1% de ATB (Gibco). El cultivo se mantuvo a 37°C en 5% CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub> sobre condiciones estériles.

Una vez que el cultivo celular presentó aproximadamente el 90% de confluencia, se formaron grupos de los cultivos de la línea celular U-373 MG de glioma humano. Grupos tratados con 1.5 (3.32 m M) y 2.5 (5.54 mM) µg/ml de Cas III-La, disuelta en agua desionizada estéril, y grupos control, los cuales fueron tratados con DMEM más SFB. El tiempo de incubación de todos los experimentos fue de 24 horas. Todos los grupos se mantuvieron bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

### 4.4. Ensayo de viabilidad celular

El efecto de Cas III-La en la supervivencia de las células de glioma humano U-373 MG se determinó mediante el ensayo colorimétrico de MTT determinado por Mosmann<sup>63</sup>, utilizando el Cell Proliferation Kit I (MTT) (Roche Diagnostics, Germany). El colorante MTT o bromuro 3 [4,5 - dimetiltiazol-2-il] -2,5-difenil-tetrazolio, es reducido por la enzima oxidoreductasa NADPH (succinato deshidrogenasa); el tetrazolio pasa a formar cristales de formazán insolubles en solución acuosa, NADPH rompe el anillo de tetrazolio produciendo formazán<sup>64,65</sup>. Los cristales de formazán formados, son disueltos con una solución solubilizante (SDS al 10% en HCl 0.01M). La absorbancia de ésta solución (color púrpura) se cuantifica mediante la medición de cierta longitud de onda 570 nm. La absorbancia medida se correlaciona directamente con el número de células vivas.

Para éste ensayo se sembraron  $1 \times 10^5$  células en placas de cultivo de 96 pozos con DMEM adicionado con 10% de SFB y 1% de ATB, las células se incubaron hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente 90%. Después se expusieron a concentraciones crecientes de 1.5 y 2.5  $\mu\text{g/ml}$  Cas III-La durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$ , posteriormente se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de MTT (5 mg / ml) (Cell Proliferation Kit I (MTT) (Roche)), y las células se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 4 horas. Los cristales de tetrazolio se solubilizaron mediante la adición de 100  $\mu\text{L}$  de solución solubilizante (10% SDS en 0.01 M HCl) (Cell Proliferation Kit I (MTT) (Roche)) y se incubó la placa durante la noche a  $37^\circ\text{C}$ . La absorbancia fue medida en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm.

#### 4.5. Muerte celular por TUNEL

Para evaluar la muerte celular en las células de glioma humano U-373 MG, después de la exposición a Cas III-La, se utilizó el Kit In Situ Cell Death Detection, (Roche Diagnostics, Germany). Las células se visualizaron en microscopio invertido Olympus, y para la toma de fotos se utilizó el programa Olympus FluoView 1.7.

La fragmentación de DNA provocada por la muerte celular, se identifica mediante el marcaje de los extremos 3'-OH con nucleótidos marcados con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) en una reacción enzimática. Los fragmentos de DNA son etiquetados por la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), catalizando la polimerización de los nucleótidos marcados a los extremos 3'-OH del fragmento de DNA<sup>66,67</sup>. La reacción de TUNEL marca preferentemente las hebras de DNA que se rompen durante el proceso de muerte celular.

Se sembraron  $1.5 \times 10^5$  células en placas de cultivo de 8 pozos con DMEM adicionado con 10% de SFB y 1% de ATB, las células se incubaron hasta presentar una confluencia de  $\sim 90\%$ , se expusieron a las concentraciones crecientes de Cas III-La antes mencionadas durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Después del tratamiento se lavaron las células dos veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4%, se lavaron con PBS, se permeabilizaron con Citrato de Sodio 0.1M pH 6, y se incubaron en la mezcla de reacción de TUNEL durante 1h a  $37^\circ\text{C}$ . Las placas fueron lavadas 3 veces con PBS. Posteriormente, las laminillas se montaron en medio de montaje Vectashield con DAPI (marcador nuclear). Las células se visualizaron en microscopio invertido Olympus (objetivo 20x), y para la toma de fotos se utilizó el programa Olympus FluoView 1.7.

#### 4.6. *Western Blot*

Se analizaron los niveles de expresión de la proteína Antígeno de Proliferación Celular (PCNA) por WB. Las muestras que contienen cantidades iguales de proteína (50 µg) se mezclaron con un volumen igual de buffer de carga (Tris-HCl 125mM, pH 6.8, 20% de glicerol, 4% SDS, 0.2% de azul de bromofenol y 10% de 2-mercaptoetanol) y se hirvieron durante 10 minutos. Las muestras se centrifugaron durante un corto tiempo y se corrieron en geles de electroforesis SDS-poliacrilamida (PAGE) al 10%-12%, aproximadamente a 130 V. Las proteínas se transfirieron en membranas de nitrocelulosa durante 2h a 200 mA con buffer Tris-HCl, pH 8.0, glicina 195mM y metanol al 10%. Los sitios inespecíficos de las membranas se bloquearon con leche baja en grasa al 5% diluida en PBS 1% durante 2h, y el anticuerpo PCNA (Cayman Chemical) se añadió a la membrana durante 24h a 4°C. Después de 3 lavados consecutivos con PBS 1% - Tritón 1%, la membrana se incubó con el Ac secundario peroxidado anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology) durante 1h a temperatura ambiente, seguido de 3 con PBS 1% - Tritón 1%. La quimioluminiscencia se visualizó usando el Kit de quimioluminiscencia (ECL) (Santa Cruz Biotechnology). La membrana se expuso a una película Kodak, durante 5 minutos y se reveló. Se utilizó un procedimiento similar para los anticuerpos primarios Bcl-2, pBcl-2 (Ser 87), Bax, caspasa-3, GSK-3β, pGSK-3β (Ser-9), β-catenina y pβ-catenina (pSer<sup>45</sup>). Como control de carga se empleó anti-βactina.

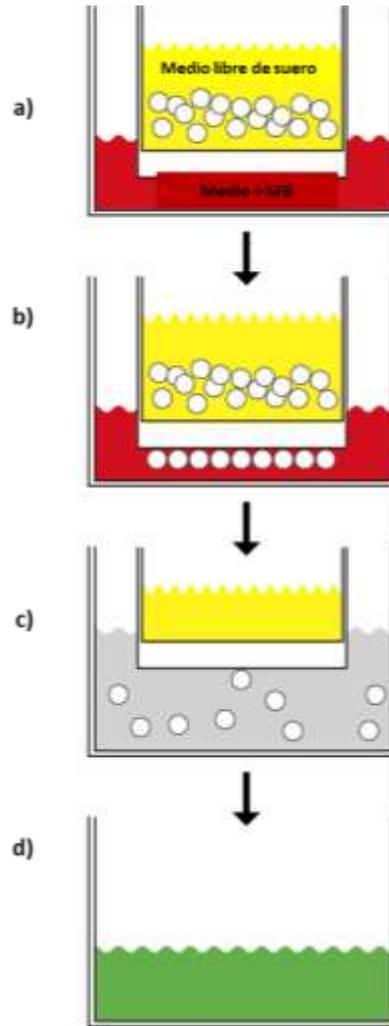
#### 4.7. *Ensayo de Invasión*

La capacidad de invasión de las células de glioma humano U-373 MG con los tratamientos de Cas III-La, fue analizada mediante el ensayo de invasión QCM™ 24-Well Cell Invasion Assay (Fluorometric) (Chemicon®).

Este ensayo es usado para evaluar a las células invasivas tumorales. El Kit consta de una cámara de invasión, basada en el principio de cámara de Boyden<sup>68</sup>. Las células son colocadas en los insertos que se encuentran en las placas del Kit, cada inserto contiene una membrana de policarbonato con poros de 8µm y se encuentran recubiertas por una fina capa de ECMatrix™ (Matrigel) (que es una matriz de membrana basal reconstituida de proteínas derivadas del tumor de ratón, EHS (Engelbreth Holm-Swarm))<sup>69</sup>. La función de la ECM es bloquear el paso de las células

no invasivas a través de los poros de la membrana, mediante la obstrucción de los poros; mientras que las células invasivas pueden migrar a través de la capa de ECM, y adherirse debajo de la membrana de policarbonato. Para la migración de las células invasivas, se coloca en el fondo del pozo un agente quimioatrayente (en este caso, DMEM más 10% de SFB), que favorecerá la migración de las células invasivas. Las células invasivas adheridas por debajo de la membrana de policarbonato, son disociadas con Buffer de Desprendimiento Celular, lisadas con Buffer de Lisis Celular (Cloruro de Sodio, Tritón X-100, Fosfato de Hidrógeno Disódico e Hidróxido de Sodio) y detectadas por el colorante CyQUANT® GR (Dimetil Sulfóxido y colorante CyQUANT® GR) (**Figura 6**).

Se sembraron aproximadamente 125, 000 células en los insertos de las placas de 24 pozos del Kit de Invasión con DMEM sin SFB, para grupos tratados se agregó 0.75 y 1.5 µg/ml de Cas III-La. En la parte inferior de la cámara del inserto se colocaron 500µl de DMEM adicionado con 10% de SFB, como quimioatrayente para las células invasivas de la línea celular de glioma U-373 MG. La placa se incubó durante 24h a 37°C en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 4%. Posterior al tiempo de incubación, los insertos fueron colocados en una placa nueva y se colocaron a cada uno 225µl de Solución de Despego (Kit), se incubó durante 30 min a 37°C. Se agregaron 75 µl de Solución de Lisis/ CyQUANT® GR (Kit) a cada pozo y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Se transfirieron 200 µl de cada muestra a una placa para fluorescencia de 96 pozos. La placa fue leída a 480/520 nm.



**Figura 6. Ensayo de Invasión celular.** a) Las células son colocadas dentro de la cámara; b) Las células invasoras migran a través de la membrana y se unen a la parte inferior de ésta, las células no invasivas se mantienen por encima; c) Las células invasivas son disgregadas con el Buffer de Desprendimiento Celular; y d) Las células invasivas son lisadas con Buffer de Lisis Celular, e identificadas con el colorante CyQUANT® GR. (Modificado de QCM™ 24-Well Cell Invasion Assay)

#### 4.8. Análisis estadísticos

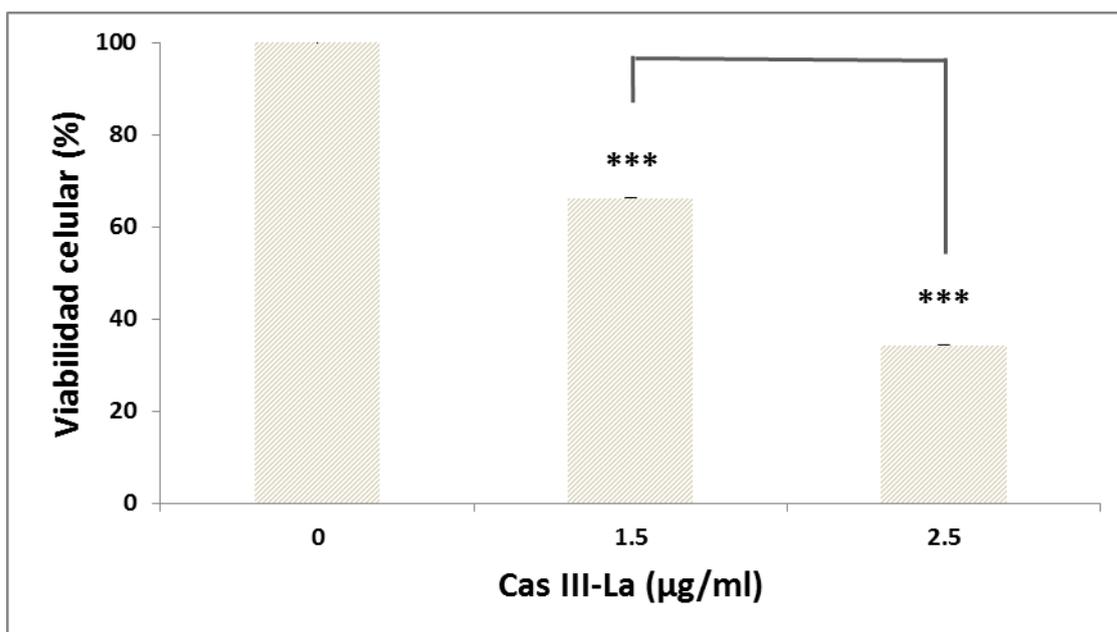
Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos de los experimentos se analizaron con una prueba de ANOVA de dos vías, seguido por la prueba de comparación múltiple de Tukey. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado significativo.

## 5. RESULTADOS

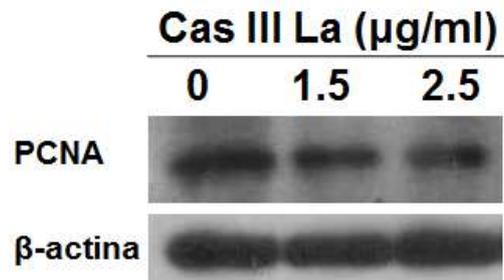
### 5.2. La Cas III-La disminuye la viabilidad y la proliferación celular

Para analizar la viabilidad celular de la línea U-373 MG en presencia de Cas III-La se realizó el ensayo colorimétrico de MTT determinado por Mosman <sup>63</sup>. Los cultivos de la línea celular fueron tratados con Cas III-La a las concentraciones de 1.5 y 2.5 µg/ml e incubados por 24 horas, y a los grupos control sólo se les adicionó DMEM más SFB. En el ensayo de MTT, se observó una disminución de la viabilidad celular dosis dependiente con la Casiopeína, en donde a la dosis de 1.5 µg/ml la viabilidad celular disminuye un 33.82%, y a la dosis de 2.5 µg/ml un 65.69% comparadas con control respectivamente, los resultados fueron estadísticamente significativos (**Fig. 7**).

El análisis de la expresión de PCNA por WB, muestra que los niveles de PCNA disminuyeron de manera significativa en los grupos con el tratamiento de Cas III-La (**Fig. 8**). Éstos resultados muestran que la Cas III-La presenta un efecto antineoplásico en las células de glioma U-373 MG a través de la inhibición de la proliferación celular, en un mecanismo que aparentemente involucra la muerte celular por apoptosis.



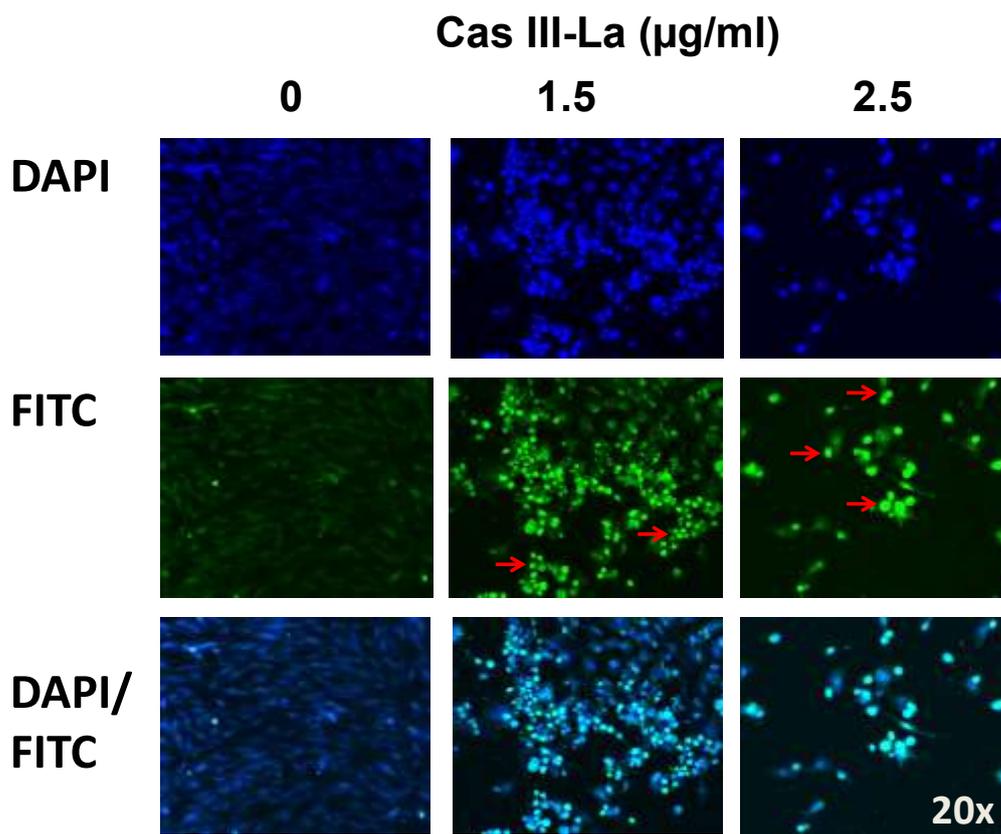
**Figura 7. Cas III-La disminuye la viabilidad de U-373 MG.** Efecto dosis-dependiente de Cas III-La en la viabilidad celular en células de glioma humano U-373 MG determinado por ensayo de MTT, donde la concentración de 2.5 µg/ml ejerce un mayor efecto; los datos representan la media ± DE (\* $p \leq 0.05$  y \*\*\* $p \leq 0.001$ ) para tres experimentos independientes.



**Figura 8. Cas III-La inhibe la proliferación celular de U-373 MG.** Efecto dosis dependiente de la expresión de PCNA en lisados celulares de células de glioma humano U-373 MG, controles y tratamientos fueron determinados por WB. Figura representativa de tres experimentos independientes.

### 5.3. *Cas III-La induce apoptosis*

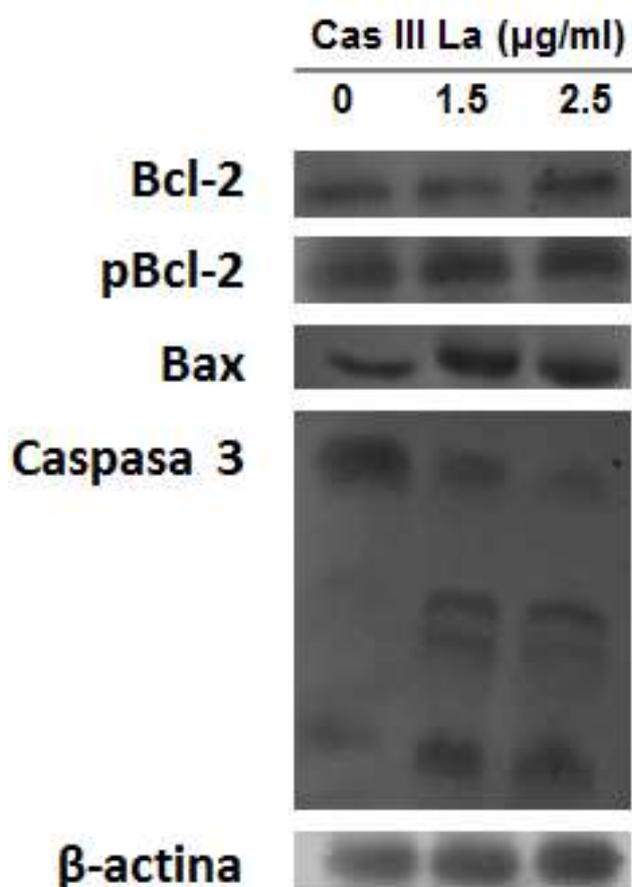
Para investigar si la disminución en la viabilidad celular con los tratamientos de Cas III-La, fue debido a un mecanismo de muerte celular, los tratamientos con Cas III-La fueron analizados mediante la técnica de TUNEL (Roche).



**Figura 9. El tratamiento de Cas III-La induce muerte celular en células de glioma.** Muerte celular fue determinada por el ensayo de TUNEL. Las células se visualizaron en microscopio invertido, objetivo 20x, (fluoresceína = verde y DAPI = azul). Las flechas rojas, señalan la morfología que presentan las células tratadas con Cas III-La, semejante a una célula en proceso de muerte apoptótica.

La **Figura 9** muestra los núcleos celulares marcados con el marcador fluorescente DAPI en los tres grupos en la primera fila. En la segunda fila, se observan las células marcadas con FITC, que presenta a las células en proceso de muerte; el marcaje con FITC es mayor en los grupos tratados con Cas III-La en comparación al grupo control, además de que las células de los grupos tratados con Cas III-La presentan una morfología típica de apoptosis como es la condensación del núcleo y citoplasma, y la localización de FITC a nivel nuclear. En la última fila, se observa la superposición de los marcadores DAPI y FITC, en los grupos tratados con Cas III-La se observa un mayor número de células que sobreponen con ambos marcadores, lo que nos indica que el marcador FITC se encuentra principalmente en los núcleos.

En el proceso de la apoptosis, se encuentran participando múltiples moléculas intracelulares, miembros de familia Bcl-2 juegan un papel muy importante durante éste proceso, ya que participan como mediadores pro y anti-apoptóticos. Como ejemplo, Bax una proteína pro-apoptótica, que en respuesta a una señal pro apoptótica se transloca a la mitocondria, causando la liberación del *cyt c*, para la formación del apoptosoma, que activa a la caspasa-3 iniciando la ejecución de la apoptosis<sup>54</sup>. La posible participación de las proteínas anti y pro-apoptóticas Bcl-2, Bax y caspasa-3 en el efecto antineoplásico de las Cas III-La en las células de glioma U-373 MG, fueron examinadas por WB. La **Figura 10** muestra un aumento en la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y su forma fosforilada pBcl-2; así como el aumento en Bax y la activación de las caspasa-3, inducido por las Cas III-La en las dosis tratadas en comparación con los controles. Éste resultado indica la participación de Bax y caspasa-3 en el efecto antineoplásico de las Cas III-La en las células de glioma U-373 MG, así como la inhibición de la proteína Bcl-2, por medio de su fosforilación.

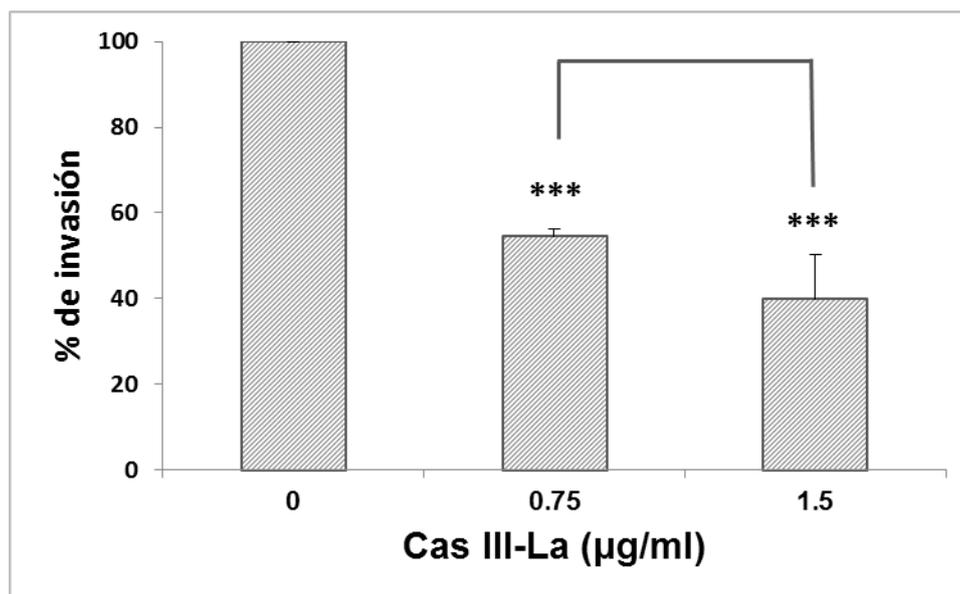


**Figura 9. Cas III-La induce la activación de proteínas pro-apoptóticas.** Expresión de Bcl-2, pBcl-2, Bax y caspasa-3 de controles y tratamientos en células de glioma humano U-373 MG con Cas III-La por 24 horas determinadas por WB. Las figuras que se muestran son representativas de al menos tres experimentos diferente por cada condición experimental.

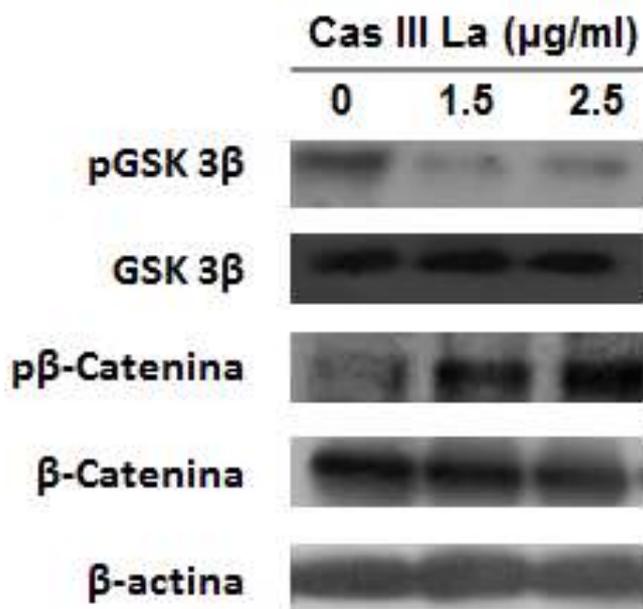
#### 5.4. Cas III-La inhibe la invasión celular del glioma humano U-373 MG

En la **Figura 11**, se observa el efecto de Cas III-La sobre las células de glioma humano, en el proceso invasivo. La invasión celular disminuye de manera dosis dependiente en los grupos tratados en comparación con el grupo control. A la concentración de 0.75 µg/ml de Cas III-La, el número de células invasivas disminuye un 45.56% respecto a nuestro grupo control, y a la concentración de 1.5 µg/ml de Cas III-La, las células invasivas disminuyen 60.18% comparado con el 100% del grupo control. En conjunto, se realizó ensayo de MTT, para observar la viabilidad celular de las células invasivas.

El proceso de invasión también es operado por diferentes moléculas. En glioma, una de las vías que participa en este proceso es la vía Wnt/β-Catenina. Wnt inhibe al complejo Axina/APC/GSK-3β/CK1 encargado de degradar a β-Catenina por vía proteosoma; cuando este complejo es inhibido por Wnt, β-Catenina puede translocarse al núcleo induciendo la transcripción de genes involucrados en el crecimiento y proliferación celular <sup>34</sup>. La expresión de pGSK-3β, GSK-3β, pβ-Catenina, β-Catenina en respuesta al tratamiento con Cas III-La en células de glioma U-373 MG, fue determinada por WB. La **Figura 12** muestra la disminución en la fosforilación de GSK-3β y el aumento de la fosforilación de β-Catenina en nuestros tratamientos de Cas III-La. Lo que nos indica que posiblemente Cas III-La participe en la fosforilación de β-Catenina vía GSK-3β, llevándola a degradación vía proteosoma; y con esto inhibiendo la expresión de genes que llevan a invasión y proliferación celular.



**Figura 11. Cas III-La inhibe el proceso invasivo en células de glioma.** El proceso de invasión celular en la línea celular de glioma humano U-373 MG es inhibido con los tratamientos de la Cas III-La. Éste efecto se analizó mediante el ensayo de Invasión (Chemicon® QCM™).



**Figura 12. Cas III-La inhibe proteínas relacionadas a la invasión celular de U-373 MG.** Expresión de pGSK-3β, GSK-3β, pβ-Catenina, β-Catenina de controles y tratamientos en células de glioma humano U-373 MG con CasIII-La por 24 horas determinadas por WB. Las figuras que se muestran son representativas de al menos tres experimentos diferentes por cada condición experimental.

## 6. DISCUSIÓN

Los gliomas son las neoplasias más frecuentes y agresivas del SNC, el astrocitoma anaplásico y el GBM son los de mayor grado. La supervivencia de los pacientes con gliomas de alto grado, es menor a 12 meses, a partir del diagnóstico. El tratamiento estándar para los pacientes con gliomas de alto grado incluye cirugía, radioterapia y quimioterapia, con el agente alquilante de DNA Temozolamida; sin embargo la supervivencia media del paciente es sólo de 14.6 meses <sup>70</sup>. GBM se caracteriza por presentar altas tasas de crecimiento, invasividad y resistencia a las terapias actuales. Esto se debe a que su genoma se encuentra altamente mutado, alterando el ciclo celular, proliferación, supervivencia, migración, angiogénesis, invasión y apoptosis celular de las células tumorales <sup>71</sup>. Por lo que identificar nuevos tratamientos alternativos es de vital importancia.

Las Casiopeínas son compuestos de coordinación con centro cobre, y han sido diseñados para presentar actividad antineoplásica en células tumorales. En diversos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha probado dicha actividad antitumoral. Los mecanismos de acción de éstos compuestos antineoplásicos aún no se conocen totalmente, pero se ha propuesto que se unan al DNA directamente, y que participen en la generación de EROs, los cuales inducen apoptosis. La apoptosis es un tipo de muerte celular programada, que mantiene la homeostasis celular, y participa en diferentes procesos biológicos, como proliferación y diferenciación <sup>54</sup>. Esta vía de señalización se encuentra alterada, y es importante para la regulación de tumorigénesis en diferentes tipos de cáncer, incluidos los gliomas <sup>55</sup>. Actualmente los fármacos que se utilizan como tratamiento para el cáncer, presentan la característica de ser agentes citotóxicos, promoviendo la apoptosis. La inducción de apoptosis por parte de nuevos agentes quimioterapéuticos, es una característica esencial, para un tratamiento eficaz contra el GBM.

En el presente trabajo, evaluamos el efecto anti-proliferativo, pro-apoptótico y anti-invasivo, de la Casiopeína III-La sobre las células de glioma humano U-373 MG. Cas III-La presenta un efecto antineoplásico en las células de glioma U-373 MG, al disminuir la proliferación celular, mediante la inhibición en la expresión de PCNA <sup>45</sup>, un coactivador de la DNA pol  $\delta$ , importante para la síntesis de DNA <sup>72</sup>. Inducción de muerte celular por apoptosis, mediante un aumento en la expresión Bax y pBcl-2, así como la activación de la caspasa ejecutora 3.

La actividad pro-apoptótica de las Casiopeínas II gly y III-ia, ha sido observada en células de meduloblastoma Daoy. Dónde las células tratadas con los fármacos, presentan condensación nuclear, característica de la apoptosis; reorganización del citoesqueleto para la formación de cuerpos apoptóticos; además de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, un paso importante en la activación de la vía intrínseca de la apoptosis, a través de la liberación de *cyt c* de mitocondria al citoesqueleto <sup>46</sup>. También, ha sido demostrado que las Casiopeína II gly induce apoptosis, en glioma C6 de rata *in vitro* e *in vivo*, mediante un mecanismo dependiente de caspasas, a través de la disminución en el potencial de membrana mitocondrial, liberación de *cyt c*, activación de caspasa-3 y rompimiento oligonucleosomal de DNA <sup>45</sup>. En adición, Cas III-ia, reduce la viabilidad celular, mediante la activación de apoptosis, vía caspasa-8, generación de Bid t, aumento de Bax, disminución en el potencial de membrana, liberación de *cyt c* y activación de caspasa-3 <sup>44</sup>. Además fue demostrado que estos fármacos, ejercen su efecto antineoplásico mediante la generación de EROs <sup>48</sup>, a través de JNK, con la subsecuente activación del factor transcripcional AP-1, el cuál regula la transcripción de genes involucrados en la inducción del proceso apoptótico como Bax, Fas y Fas-R <sup>44</sup>. Por otra parte JNK, induce apoptosis mediante la fosforilación (Ser87) e inactivación de Bcl-2 <sup>73</sup>, ya que no permite la interacción de esta con proteínas pro-apoptóticas como Bax, Bad, Bim y Bid <sup>74</sup>. Otro blanco de JNK, son las proteínas serina treonina cinasa 14-3-3, las cuales secuestran e inactivan a Bax. La inactivación de las proteínas 14-3-3 por JNK, permite la translocación de Bax citosólico a la mitocondria, con la subsecuente liberación de *cyt c* e inducción de apoptosis <sup>75</sup>. Finalmente, Alemón y colaboradores, demostraron que las Casiopeínas inducen lipoperoxidación y daño al DNA, por la generación de EROs, en la línea celular HeLa <sup>76</sup>. Las EROs producidas por las Casiopeínas (II gly, III-Ea y III-ia) son peróxido de hidrógeno y ión superóxido <sup>77</sup>.

De acuerdo a lo anterior, la Cas III-La puede inducir apoptosis en la línea celular de glioma U-373 MG, a través de la generación de EROs, llevando al aumento de la proteína pro-apoptótica Bax y activación de caspasa-3, e inactivación de la proteína anti-apoptótica Bcl-2.

Los GBM presentan una gran invasividad local involucrando vías anatómicas preferenciales a lo largo de las fibras blancas, en particular en la vía del cuerpo caloso y membrana basal de los vasos sanguíneos, lo que sugiere una permisividad variable del estroma frente al proceso tumoral, esta infiltración tumoral glial hace imposible la

resección total del tumor después de la cirugía, lo que permite una alta recurrencia tumoral.

En el presente trabajo, evaluamos el efecto anti-invasivo de la Casiopeína III-La en la línea celular de glioma humano U-373 MG. Cas III-La disminuyó significativamente la invasión celular, con una activación de GSK-3 $\beta$  y un aumento en la fosforilación de  $\beta$ -catenina. Estos resultados sugieren que la Cas III-La inhibe la inactivación de GSK-3 $\beta$ , lo que permite la formación del complejo de destrucción de  $\beta$ -catenina, mediante su fosforilación <sup>33</sup>.

Se ha demostrado que la Temozolamida reduce la expresión de Wnt en células stem aisladas de tejido de pacientes con GBM, mediante la metilación de la región promotora de este gen, lo que conduce a la activación de GSK-3 $\beta$  y la degradación de  $\beta$ -catenina <sup>78</sup>. Tian y colaboradores, demostraron que el inhibidor de PI3K (LY294002) inhibe el proceso invasivo en la línea C6 de glioma, a través de la activación de GSK-3 $\beta$ , y la inactivación de Akt y MMP-9 <sup>79</sup>. De manera similar Han y colaboradores, sugieren que la inactivación de PI3K/AKT, disminuya el proceso invasivo mediante la activación de GSK-3 $\beta$ , y la disminución en los niveles de expresión de  $\beta$ -catenina, Fra-1 (Fos-related antigen 1), c-myc y ciclina D, en las líneas de glioma LN229 Y U251 <sup>80</sup>. GSK-3 $\beta$  puede actuar como un supresor de tumores, durante el proceso tumorigénico en células epidermales <sup>81</sup>. También ha sido demostrado que la inactivación farmacológica de GSK-3 $\beta$ , estabiliza a  $\beta$ -catenina, aumentando los niveles de ciclina D y la tumorigénesis, en células epiteliales de mama C57MG <sup>82</sup>.

Por otro lado, se ha reportado que GSK-3 $\beta$  puede inducir arresto en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, ya que media la fosforilación y la subsecuente degradación de la Cyc D a nivel nuclear <sup>83</sup>. También GSK-3 $\beta$  promueve la apoptosis al fosforilar a Bax, lo que conlleva a la translocación de la proteína pro-apoptotica del citosol a la mitocondria <sup>84</sup>, así como el secuestro en el núcleo de survivina, miembro de la familia de las IAPs, en la línea celular de cáncer de pulmón A549 <sup>83</sup>. También se encarga de fosforilar otras proteínas importantes en el metabolismo y señalización celular, como acetil Co A carboxilasa, AMPK y piruvato deshidrogenasa, entre otras <sup>30</sup>.

## 7. CONCLUSIÓN

La Cas III-La es un agente prometedor para el tratamiento de GBM, dada su capacidad anti-proliferativa, pro-apoptótica y anti-invasiva.

La Cas III-La ejerce un efecto anti-proliferativo (diminución de la viabilidad celular y niveles de PCNA), promueve muerte celular (TUNEL positivo) mediante la inducción de apoptosis (aumento de la proteína pro-apoptótica Bax y activación de la caspasa ejecutora-3) e inactivación del proceso invasivo (ensayo de invasión, activación de GSK-3 $\beta$  y degradación de  $\beta$ -catenina).

## 8. REFERENCIAS

1. Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science*. 2008;319(5868):1352-1355.
2. Ruddon R. *Cancer Biology*. illustrate. Oxford University Press; 2007.
3. Sosa-Durán EE, García-Rodríguez F. Panorama epidemiológico del cáncer en México. *Rev Mex Anesthesiol*. 2013;36(Sup. 1):130-132.
4. INEGI. *Estadísticas a Propósito De... Día Mundial Contra El Cáncer (4 de Febrero) Datos Nacionales.*; 2014.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
6. Newton HB. *Handbook of Brain Tumor Chemotherapy*. (Newton HB, ed.). Academic Press; 2005.
7. De Angelis LM. Brain Tumors. *N Engl J Med*. 2001;344(2):114-123.
8. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, et al. The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro Oncol*. 2014;16(7):896-913.
9. Swapan KR. *Glioblastoma: Molecular Mechanisms of Pathogenesis and Current Therapeutic Strategies*. 1° ed. (Ray SK, ed.). Columbia, USA: Springer; 2010.
10. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007;114(2):97-109.
11. Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol*. 2003;21(8):1624-1636.
12. Westphal M, Lamszus K. The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12(9):495-508.
13. Appin CL, Brat DJ. Molecular Genetics of Gliomas. *Cancer J*. 2014;20(1):66-72.
14. Miller CR, Perry A. Glioblastoma: Morphologic and Molecular Genetic Diversity. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;131:397-406.
15. Giese A, Westphal M. Glioma Invasion in the Central Nervous System. *Neurosurgery*. 1996;39(2):235-252.
16. Juliano RL. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: Functions of Integrins, Cadherins, Selectins, and Immunoglobulin-Superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2002;42:283-323.

17. Van Aken E, De Wever O, Correia da Rocha AS, Mareel M. Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. *Virchows Arch*. 2001;439(6):725-751.
18. Lewis-Tuffin LJ, Rodriguez F, Giannini C, et al. Misregulated E-Cadherin expression associated with an aggressive brain tumor phenotype. *PLoS One*. 2010;5(10).
19. Motta FJN, Valera ET, Lucio-Eterovic a. KB, et al. Differential expression of E-cadherin gene in human neuroepithelial tumors. *Genet Mol Res*. 2008;7(2):295-304.
20. Fukushima Y, Ohnishi T, Arita N, Hayakawa T, Sekiguchi K. Integrin  $\alpha 3\beta 1$ -mediated interaction with laminin-5 stimulates adhesion, migration and invasion of malignant glioma cells. *Int J Cancer*. 1998;76:63-72.
21. Grobben B, De Deyn PP, Slegers H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res*. 2002;310(3):257-270.
22. Giancotti FG. Integrin Signaling. *Science*. 1999;285(5430):1028-1033.
23. Binder DK, Berger MS. Proteases and the biology of glioma invasion. *J Neurooncol*. 2002;56:149-158.
24. Hood JD, Cheresch DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(2):91-100.
25. Brooks PC, Strömblad S, Sanders LC, et al. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin  $\alpha v\beta 3$ . *Cell*. 1996;85:683-693.
26. Dass K, Ahmad A, Azmi AS, Sarkar SH, Sarkar FH. Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer Treat Rev*. 2008;34(2):122-136.
27. Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J. Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol*. 2005;17(5):559-564.
28. Salhia B, Tran NL, Symons M, Winkles JA, Rutka JT, Berens ME. Molecular pathways triggering glioma cell invasion. *Expert Rev Mol Diagn*. 2006;6(4):613-626.
29. Atkins RJ, Dimou J, Paradiso L, et al. Regulation of glycogen synthase kinase-3 beta ( GSK-3 $\beta$  ) by the Akt pathway in gliomas. *J Clin Neurosci*. 2012;19(11):1558-1563.
30. Atkins RJ, Stylli SS, Luwor RB, Kaye AH, Hovens CM. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  ( GSK-3 $\beta$  ) and its dysregulation in glioblastoma multiforme. *J Clin Neurosci*. 2013;20(9):1185-1192.
31. Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of  $\beta$ -catenin. *EMBO J*. 2012;31(12):2714-2736.

32. Peifer M, Pai L-M, Casey M. Phosphorylation of the Drosophila Adherens Junction Protein Armadillo: Roles for Wingless Signal and Zeste-white 3 Kinase. *Dev Biol.* 1994;166:543-556.
33. Liu C, Li Y, Semenov M, et al. Control of  $\beta$ -Catenin Phosphorylation / Degradation by a Dual-Kinase Mechanism. *Cell.* 2002;108:837-847.
34. Ochoa-Hernández AB, Juárez-Vázquez CI, Rosales-Reynoso MA, Barros-Núñez P. La vía de señalización Wnt- $\beta$ -catenina y su relación con cáncer. *Cir Cirugía.* 2012;80:389-398.
35. Paul I, Bhattacharya S, Chatterjee A, Ghosh MK. Current Understanding on EGFR and Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Glioma and Their Possible Crosstalk. *Genes Cancer.* 2013;4(11-12):427-446.
36. Wang QM, Carol J, Depaoli-roach AA, Roach PJ. Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  Is a Dual Specificity Kinase Differentially Regulated by Tyrosine and Serin/Threonine Phosphorylation. *J Biol Chem.* 1994;269(20):14566-14574.
37. Stambolic V, Woodgett JR. Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochem J.* 1994;704:701-704.
38. Hayat MA. *Tumors of the Central Nervous System Volume 1.* 1st ed. (Hayat MA, ed.). US: Springer; 2011.
39. Ruiz-Azuara L. Casiopeína. U.S. patent 5576326. 1996.
40. Ruiz-Azuara L. Casiopeína. U.S. patent 35458. 1997.
41. De Vizcaya-Ruiz A, Rivero-Muller A, Ruiz-Ramirez L, et al. Induction of Apoptosis by a Novel Copper- based Anticancer Compound, Casiopeina II , in L1210 Murine Leukaemia and CH1 Human Ovarian Carcinoma Cells. *Toxicol Vitro.* 2000;14:1-5.
42. Marín-Hernández A, Garcia-Mora I, Ruiz-Ramírez L, Moreno-Sánchez R. Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas®) on mitochondrial functions. *Biochem Pharmacol.* 2003;65:1979-1989.
43. Alemón-Medina R, Muñoz-Sánchez JL, Ruiz-Azuara L, Garcia-Mora I. Casiopeína II gly induced cytotoxicity to HeLa cells depletes the levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide. *Toxicol Vitro.* 2008;22:710-715.
44. Trejo-Solís C, Jimenez-Farfan D, Rodriguez-Enriquez S, et al. Copper compound induces autophagy and apoptosis of glioma cells by reactive oxygen species and jnk activation. *BMC Cancer.* 2012;12:156.
45. Trejo-Solís C, Palencia G, Zúñiga S, et al. Cas II gly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia.* 2005;7(6):563-574.

46. Mejía C, Ruiz-Azuara L. Casiopeínas IIgly and IIIa Induce Apoptosis in Medulloblastoma Cells. *Pathol Oncol Res.* 2008;14:467-472.
47. Carvallo-Chaigneau F, Trejo-Solís C, Gómez-Ruiz C, et al. Casiopeína III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *Biometals.* 2008;21:17-28.
48. Kachadourian R, Brechbuhl HM, Ruiz-Azuara L, Gracia-Mora I, Daya BJ. Casiopeína IIgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. *Toxicology.* 2010;268(3):176-183.
49. Alemón-Medina R, Bravo-Gómez ME, Gracia-Mora MI, Ruiz-Azuara L. Comparison between the antiproliferative effect and intracellular glutathione depletion induced by Casiopeína IIgly and cisplatin in murine melanoma B16 cells. *Toxicol Vitro.* 2011;25(2011):868-873.
50. Hernández-Lemus E, Gutiérrez AG, Vázquez-Aguirre A, Palma-Tirado ML, Ruiz-Azuara L, Mejía C. Analysis of Apoptotic and Autophagic Pathways in Neuroblastoma by Treatment with Copper Compounds. In: Shimada H, ed. *Neuroblastoma.* USA: InTech; 2013:145-161.
51. Rivero-Müller A, De Vizcaya-Ruiz A, Plant N, Ruiz L, Dobrota M. Mixed chelate copper complex, Casiopeína IIgly ® , binds and degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity. *Chem Biol Interact.* 2007;165:189-199.
52. Chikira M, Tomizawa Y, Fukita D, et al. DNA-fiber EPR study of the orientation of Cu(II) complexes of 1, 10-phenanthroline and its derivatives bound to DNA: mono (phenanthroline) - copper (II) and its ternary complexes with amino acids. *J Inorg Biochem.* 2002;89:163-173.
53. García-Ramos JC, Tovar-Tovar A, Hernández-Lima J, Cortés-Guzmán F, Moreno-Esparza R, Ruiz-Azuara L. A new kind of intermolecular stacking interaction between copper (II) mixed chelate complex (Casiopeína III-ia) and adenine. *Polyhedron.* 2011;30(3):2697-2703.
54. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene.* 2003;22(53):8543-8567.
55. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science.* 1995;267(5203):1445-1449.
56. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis Signaling. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:217-245.
57. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407(6805):770-776.
58. Herr I, Debatin K-M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood.* 2001;98(9):2603-2614.
59. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* 2006;13:1423-1433.

60. Tait SWG, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(9):621-632.
61. Green DR, Reed JC. Mitochondria and Apoptosis. *Science.* 1998;281(5381):1309-1312.
62. Wu C-C, Bratton SB. Regulation of the Intrinsic Apoptosis Pathway by Reactive Oxygen Species. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19(6):546-558.
63. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
64. Berridge M V, Tan AS. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Arch Biochem Biophys.* 1993;303(2):474-482.
65. Berridge M V, Tan ANS, McCoy KD, Wang R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica.* 1996;4:14-19.
66. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 1992;119(3):493-501.
67. Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA Strand Breaks in Individual Apoptotic Cells by the in Situ Terminal Deoxynucleotidyl Transferase and Nick Translation Assays. *Cancer Res.* 1993;53:1945-1951.
68. Chen H-C. Boyden Chamber Assay. *Methods Mol Biol.* 2005;294:15-22.
69. Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol.* 2005;15(5 SPEC. ISS.):378-386.
70. Stupp R, Manson WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352:987-996.
71. Adamson D. *Gliomas Classification, Symptoms, Treatment and Prognosis.* 1st ed. (Adamson DC, ed.). New York, USA: Neuroscience Research Progress; 2014.
72. Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene.* 1997;14:629-640.
73. Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B. JNK-1 Mediated Phosphorylation of Bcl-2 Regulates Starvation-Induced Autophagy. *Mol Cell.* 2008;30(6):678-688.
74. Bassik MC, Scorrano L, Oakes SA, Pozzan T, Korsmeyer SJ. Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca<sup>2+</sup> homeostasis and apoptosis. *EMBO J.* 2004;23(5):1207-1216.

75. Tsuruta F, Sunayama J, Mori Y, et al. JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J.* 2004;23(8):1889-1899.
76. Alemón-Medina R, Breña-Valle M, Muñoz-Sánchez JL, García-Mora MI, Ruiz-Azuara L. Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas®). *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007;60:219-228.
77. Grizett Gutiérrez A, Vázquez-Aguirre A, García-Ramos JC, et al. Copper ( II ) mixed chelate compounds induce apoptosis through reactive oxygen species in neuroblastoma cell line CHP-212. *J Inorg Biochem.* 2013;126(3):17-25.
78. Riganti C, Salaroglio IC, Caldera V, et al. Temozolomide downregulates P-glycoprotein expression in glioblastoma stem cells by interfering with the Wnt3a/glycogen synthase-3 kinase/ $\beta$ -catenin pathway. *Neuro Oncol.* 2013;15(11):1502-1517.
79. Tian Q, Cui H, Li Y, Lu H. LY294002 induces differentiation and inhibits invasion of glioblastoma cells by targeting GSK-3 $\beta$  and MMP. *EXCLI J.* 2012;11:68-77.
80. Han L, Yang Y, Yue X, et al. Inactivation of PI3K/AKT signaling inhibits glioma cell growth through modulation of  $\beta$ -catenin-mediated transcription. *Brain Res.* 2010;1366:9-17.
81. Ma C, Wang J, Gao Y, et al. The Role of Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  in the Transformation of Epidermal Cells. *Cancer Res.* 2007;67(16):7756-7764.
82. Farago M, Dominguez I, Landesman-Bollag E, et al. Kinase-inactive Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Promotes Wnt Signaling and Mammary Tumorigenesis. *Cancer Res.* 2005;65(13):5792-5801.
83. Li J, Xing M, Zhu M, et al. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  induces apoptosis in cancer cells through increase of survivin nuclear localization. *Cancer Lett.* 2008;272(1):91-101.
84. Linseman DA, Butts BD, Precht TA, et al. Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  Phosphorylates Bax and Promotes Its Mitochondrial Localization During Neuronal Apoptosis. *J Neurosci.* 2004;24(44):9993-10002.