



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**EFFECTO DE LA ERITROPOYETINA SOBRE LA MUERTE INDUCIDA POR
ETOPÓSIDO Y VINCRISTINA EN CÉLULAS RENALES Y DE NEUROBLASTOMA.**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARÍA JOSÉ VÁZQUEZ-MELLADO PETIT

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. LETICIA ROCHA ZAVALITA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR:

DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DRA. MARÍA DE LOURDES MASSIEU TRIGO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

CIUDAD DE MÉXICO, MAYO 2017



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.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por darme la oportunidad de estudiar un posgrado y hacer ciencia. Al programa de **Doctorado en Ciencias Biomédicas** por permitirme realizar un proyecto de mi interés, y a su personal por la ayuda proporcionada a lo largo de todo mi doctorado. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) (152492) y al **PAPIIT** (IN209613) por las becas y apoyos otorgados que me permitieron realizar y finalizar mis estudios.

A mi tutora, la **Dra. Leticia Rocha Zavaleta** por su apoyo a lo largo de todos estos años, por enseñarme todo lo que sé, por siempre tener tiempo para escucharme y ayudarme, por darme la oportunidad de trabajar sobre un proyecto que amo, por la paciencia y por todos sus consejos dentro y fuera del laboratorio.

A la Maestra en Ciencias **María Cecilia Aguilar Zacarías** por su apoyo técnico y amistad durante todos mis estudios.

A los miembros de mi comité tutorial, la **Dra. María de Lourdes Massieu Trigo** y la **Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez** por la paciencia y por aportar valiosas ideas a mi proyecto y enriquecerlo con sus conocimientos.

A los miembros de mi jurado, **Dra. Marcela Lizano Soberón**, **Dra. Eugenia Flores Figueroa** **Dr. Abel Santamaría Del Angel** y **Dra. Angélica Zepeda Rivera**, por la revisión de mi trabajo y por los comentarios que enriquecieron esta tesis.

A mi **familia**, por ser parte de mi vida y rescatarme muchas veces.

A todos los **compañeros** que han pasado por este mismo laboratorio, porque cada uno de ustedes ha aportado cosas valiosas a mi formación como científica y como persona.

Esta tesis está dedicada a Dios, por darme fuerza y
valor todos los días...

A mamá y papá, por dejarme luchar por alcanzar
mis sueños...

A mis abuelitos por acompañarme en este camino...

A todos los pequeños que padecen cáncer, mis
ídolos más grandes, los guerreros más fuertes, por
ser mi inspiración y motivación todos los días y un
ejemplo de vida...

“Hay que vivir con alegría las pequeñas cosas de la vida cotidiana (...). No te prives de
pasar un buen día”

–Jorge Mario Bergoglio

ÍNDICE

	Pág.
I. Resumen	1
Abstract	2
II. Introducción	4
2.1 El sistema nervioso	4
2.1.1 Células nerviosas	6
2.1.2 Neuroglia	7
2.2 La cresta neural	9
2.3 Los neuroblastomas	11
2.3.1 Etapas del neuroblastoma	14
2.3.2 Tratamiento de los neuroblastomas	16
2.3.2.a Etopósido	18
2.3.2.b Vincristina	18
2.4 Anemia	19
2.4.1 Consecuencias de la anemia en pacientes con cáncer	20
2.5 La eritropoyetina y su receptor	21
2.5.1.a Vía JAK/STAT	24
2.5.1.b Vía PI3K/AKT	24
2.5.1.c Vía MAPK	25
2.5.2 Eritropoyetina recombinante humana	29
2.5.3 La eritropoyetina y su receptor en tejidos no eritroides	29
2.5.3.1 La eritropoyetina y su receptor en el sistema nervioso	30
2.5.3.1.a La eritropoyetina y su receptor en el sistema nervioso central	32
2.5.3.1.b La eritropoyetina y su receptor en el sistema nervioso periférico	33
2.5.4 La eritropoyetina y su receptor en tejido tumoral	34
2.5.4.a La eritropoyetina y su receptor en neuroblastomas	35
III. Justificación	37
IV. Objetivos	39
V. Metodología	41
5.1 Cultivos celulares	41
5.2 Extracción de ARN	41
5.3 RT-PCR	42
5.4 Lisado celular y Western Blot	42
5.5 Tinción con hematoxilina-eosina	43
5.6 Inmunocitoquímica	44
5.7 Ensayo de MTT	44

5.8 Ensayos de estimulación con eritropoyetina	44
5.9 Determinación de la proliferación celular mediada por eritropoyetina	45
5.10 Determinación de las dosis letales de los quimiofármacos	46
5.11 Ensayos de protección con eritropoyetina	46
5.12 Ensayos de inhibición de las vías de señalización activadas por eritropoyetina	46
5.12.1 Inhibición de JAK 2	46
5.12.2 Inhibición de PI3K	47
5.12.3 Inhibición de MEK 1/2	47
5.13 Inducción de hipoxia en cultivos celulares	48
5.14 Tratamiento con ácido retinoico y NGF	48
5.15 Análisis estadístico	48
VI. Resultados	50
6.1 Expresión del receptor de eritropoyetina	50
6.2 Expresión de eritropoyetina	51
6.3 Efecto de la eritropoyetina sobre la viabilidad celular	52
6.4 Determinación de las dosis letales	54
6.5 Efecto de la eritropoyetina sobre la muerte inducida por etopósido y vincristina	54
6.6 Vías activadas por eritropoyetina	56
6.7 Inhibición de la vía JAK/STAT	58
6.8 Inhibición de la vía PI3K/AKT	59
6.9 Inhibición de la vía MAPK	59
6.10 Expresión del gen del receptor de eritropoyetina en distintas líneas celulares de neuroblastoma humano	60
6.11 Efecto de la hipoxia sobre la expresión del receptor de eritropoyetina	61
6.12 Efecto del tratamiento con ácido retinoico y NGF sobre la expresión del receptor de eritropoyetina	62
6.13 Dosis letales en células tratadas con ácido retinoico y NGF	64
6.14 Efecto de la eritropoyetina sobre la viabilidad de las células HEK293 luego del tratamiento con ácido retinoico y NGF	65
6.15 Efecto de la eritropoyetina sobre la viabilidad de las células MSN luego del tratamiento con ácido retinoico y NGF	66
6.16 Efecto de la eritropoyetina sobre la viabilidad de las células SK-N-MC luego del tratamiento con ácido retinoico y NGF	67
6.17 Efecto de la eritropoyetina sobre la viabilidad de las células SK-N-AS luego del tratamiento con ácido retinoico y NGF	68
6.18 Expresión de HIF-1 α luego del tratamiento con ácido retinoico y NGF	69
VII. Discusión	73
VIII. Conclusiones	95
IX. Perspectivas	97

X. Referencias bibliográficas	99
XI. Apéndice	118
11.1 Buffer de corrida	118
11.2 Buffer RIPA	118
11.3 Buffer de transferencia	118
11.4 Inactivación del suero fetal bovino	118
11.5 PBS	119
11.6 Solución Hank's	119
11.7 Solución de MTT	119
11.8 TBS	119
XII. Publicaciones	122

I. RESUMEN

La eritropoyetina (Epo) es una hormona producida principalmente en el riñón. Su función principal es la de inducir la proliferación y diferenciación de los progenitores eritroides presentes en la médula ósea así como inhibir su muerte. La eritropoyetina recombinante humana (rhEpo) se utiliza hoy en día para tratar la anemia que se presenta en los pacientes con cáncer como consecuencia de los tratamientos (quimioterapia o radioterapia) o del propio tumor. Actualmente se sabe que el receptor para eritropoyetina (Epo-R) no es exclusivo de los progenitores eritroides, sino que las células de otros órganos como el riñón y el cerebro también lo expresan. Los neuroblastomas son tumores originados en el sistema nervioso periférico y las dosis empleadas de los fármacos que se utilizan en su tratamiento se ven limitadas por los efectos secundarios de éstos, entre los que se encuentra la nefrotoxicidad. Como el riñón expresa el Epo-R y la Epo puede inducir la inhibición de la muerte celular una vez que se une a su receptor, en este estudio se evaluó si la rhEpo podía proteger a las células del riñón de los efectos de dos de los fármacos que se emplean en México para tratar los neuroblastomas, el etopósido y la vincristina. Además, se estudió si la rhEpo afectaba la muerte de tres líneas celulares derivadas de neuroblastoma inducida por estos mismos quimiofármacos ya que también se ha reportado que el tejido tumoral puede expresar el Epo-R. Se encontró que aunque ambos tipos celulares expresan el Epo-R, la rhEpo no tiene efecto sobre las células renales pero si puede inhibir la muerte de las células de neuroblastoma. También se encontró que las células renales expresan una isoforma del Epo-R que no se encontró en las células de neuroblastoma. La expresión de la isoforma en los neuroblastomas pudo ser inducida mediante el tratamiento con ácido retinoico o NGF, lo que resultó en la inhibición de los efectos protectores de la rhEpo. Estos resultados sugieren que cuando la isoforma del Epo-R no está presente, las células responden al estímulo con rhEpo. Estos hallazgos podrían ayudar al momento de diseñar el esquema de tratamiento en los pacientes con neuroblastoma.

ABSTRACT

Erythropoietin (Epo) is a hormone produced mainly in the kidneys. Its main role is to stimulate the proliferation and differentiation of erythroid progenitors present in the bone marrow and protect them from cell death. Human recombinant erythropoietin (rhEpo) is used to treat anemia which occurs due to treatment or the tumor itself in cancer patients. It is now accepted that the erythropoietin receptor (Epo-R) is not only present in erythroid progenitor cells but also in cells from different organs, such as the kidneys and the brain. Neuroblastomas are pediatric tumors which originate in the peripheral nervous system. The drugs used to treat these tumors have limitations due to side effects which include nephrotoxicity. Considering that kidney cells express Epo-R, and that Epo is able to inhibit cell death once it binds to its receptor, in the present study we evaluated if the rhEpo could protect kidney cells from the side effects of drugs like etoposide and vincristine used in México to treat these tumors. The effect of rhEpo on neuroblastoma derived cells was also evaluated in three different cell-lines because it has been reported that cancer cells can also express the Epo-R. We found that even when both cell types express the Epo-R, rhEpo only had effect on neuroblastoma cells without modifying the cell death of renal cells. In addition, we observed that renal cells, but not neuroblastoma cells express an Epo-R isoform. However, the expression of the isoform could be induced in neuroblastoma cells by retinoic acid or NGF pre-treatment, resulting in the inhibition of the rhEpo-mediated protection against the etoposide- and vincristine-induced cell death. Our results suggest that when the Epo-R isoform is not present, cells respond to the stimulation with rhEpo. These findings could help designing better treatment schemes for neuroblastoma patients.

INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

2.1 EL SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso se refiere a todas las neuronas y células gliales de un organismo. El sistema nervioso humano está integrado por el cerebro, la médula espinal, los órganos sensoriales y todos los nervios que conectan estos órganos con el resto del cuerpo. Es el encargado de regular la respuesta a los estímulos tanto internos como externos de todo el cuerpo. Recibe la información del entorno, la interpreta y genera una respuesta. Controla todas las funciones del organismo y permite que exista comunicación entre todos los órganos del cuerpo y también del cuerpo con su entorno. Es el sistema más importante de un organismo pues de él depende el buen funcionamiento de todos los demás. Participa en todas las acciones voluntarias e involuntarias de un organismo, incluidas las emociones, el dolor, el sueño, la sensación de hambre y la memoria. El sistema nervioso se desarrolla a partir del ectodermo del embrión, que es la misma capa embrionaria que da origen a la epidermis. La primera estructura que se identifica como origen del sistema nervioso es la placa neural, que aparece en el embrión humano a los 16 días luego de la fertilización. Las células de la placa neural proliferan y se vuelven más grandes y dos días después se forma el surco neural. Cada lado del surco recibe el nombre de pliegue neural. Estos pliegues neurales empiezan a fusionarse formando el tubo neural. Para el día 22 aproximadamente, comienza a cerrarse el tubo neural, proceso que termina alrededor del día 27. A las células que recubren el tubo neural se les conoce como neuroepitelio, y es el que dará origen a todas las neuronas y a la mayoría del resto de células del sistema nervioso central. Entre la semana 4 y la 20 se originan las neuronas dentro del tubo neural. Las neuronas jóvenes migran a

distintas regiones del tubo y una vez establecidas, comienza a crecer su citoplasma y empiezan a formar conexiones sinápticas entre ellas. Alrededor de estas neuronas se observan las células conocidas como glía radial, que son células con características celulares similares a las de los astrocitos y que están presentes en el sistema nervioso en desarrollo con la finalidad de guiar la migración de las neuronas que se están formando (Campbell K, Götz M 2002). La mayoría de los astrocitos y oligodendrocitos se generan del neuroepitelio durante la etapa fetal. A las 19 semanas ya se observan células gliales con características morfológicas y que expresan marcadores que identifican células diferenciadas en astrocitos u oligodendrocitos, lo que en ocasiones se conoce como “glía madura”. La microglía es la única que tiene un origen distinto, pues se origina a partir del mesodermo junto con las células hematopoyéticas. En el tubo neural se forman más neuronas de las que llegarán al cerebro, por lo que durante el desarrollo muchas mueren de forma natural por apoptosis. Normalmente mueren las que no hacen sinapsis. El sistema nervioso central (SNC) está formado por el cerebro y la médula espinal, protegidos por el cráneo y la columna vertebral respectivamente. Como se mencionó anteriormente, el SNC se forma a partir del tubo neural mientras que el sistema nervioso periférico (SNP), que está formado por todos los nervios que corren a lo largo del organismo (Fig. 1a), se forma a partir de la cresta neural. La cresta neural se forma por las células que cuando se cierra el tubo neural quedan entre el ectodermo y la placa neural. Por lo tanto, las primeras células en diferenciarse en el sistema nervioso son las neuronas, que son las células especializadas en la comunicación. Posteriormente, se forman las células de la glía también conocidas como neuroglia, que desempeñan funciones necesarias para la homeostasis del sistema nervioso, manteniendo un microambiente correcto, protegiendo y nutriendo a las neuronas, favoreciendo las sinapsis entre neuronas y eliminando células dañadas entre otras funciones (Allen NJ, Barres BA 2009). Las divisiones principales del sistema nervioso central que son la médula espinal, la médula oblonga (o bulbo raquídeo), el puente, el mesencéfalo (o cerebro medio), el diencefalo y los hemisferios cerebrales aparecen desde la cuarta semana luego de la

fertilización. El cerebelo aparece después a partir el tallo cerebral (el tallo cerebral es el conjunto del mesencéfalo, el puente y la médula oblonga) (Fig. 1b).

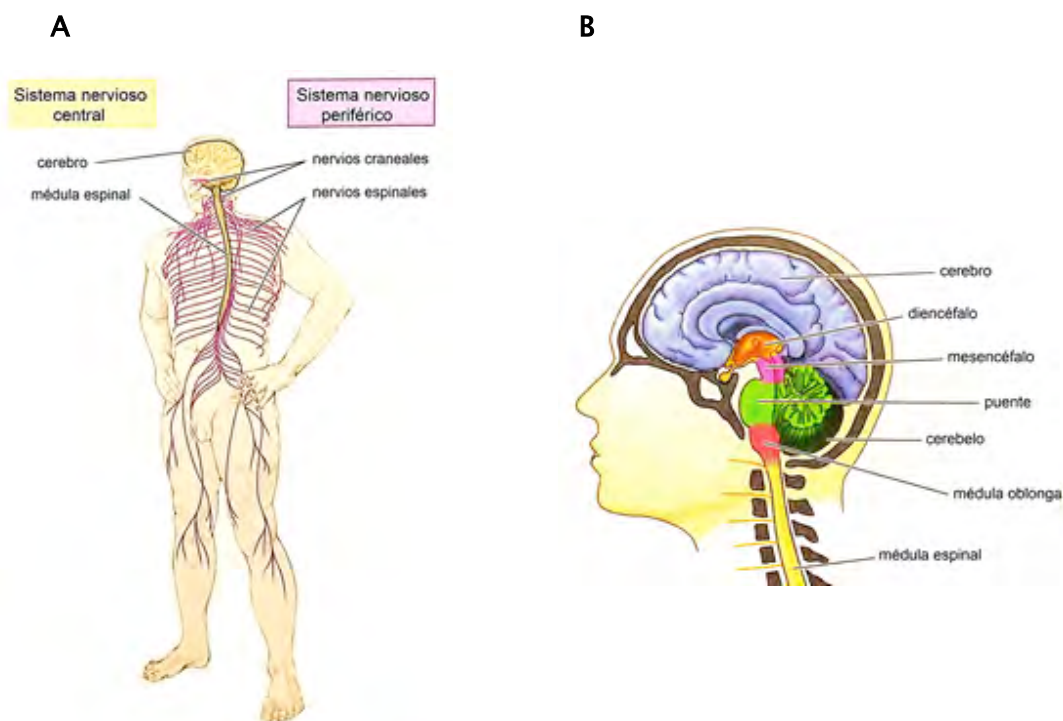


Figura 1. A) Esquema de la división del sistema nervioso. **B)** Regiones del sistema nervioso central.

2.1.1 Células nerviosas

Las neuronas son las células del sistema nervioso especializadas en señalización. La señalización en el sistema nervioso puede ser química (mediada por neurotransmisores) o eléctrica (mediada por impulsos eléctricos). La morfología de las neuronas favorece la comunicación entre células y por eso poseen proyecciones citoplásmicas llamadas neuritas. Dentro de las neuritas se encuentran las dendritas, que son ramificaciones que salen del cuerpo neuronal (Fig. 2). A través de las dendritas la célula recibe e integra la información que proviene de otras neuronas. La información procesada sale por la región de la neurona llamada axón, que es una extensión del cuerpo neuronal también conocida como fibra nerviosa. La longitud de los axones es variable. A la región terminal de las neuritas se les conoce como terminales sinápticas y al paso de información entre células nerviosas se le llama sinapsis. Al conjunto de axones en el SNC se le llama tracto, y es lo que se conoce

como materia blanca. En el SNP, un conjunto de axones forma lo que se conoce como nervio, y los nervios son los encargados de mantener comunicados al SNC y al SNP. Se llama nervios aferentes a los que transportan las señales del exterior que son recibidas por los órganos sensoriales al cerebro. Los nervios eferentes son los que conducen las señales desde el cerebro hacia los músculos y glándulas una vez que el cerebro ha emitido una respuesta a los estímulos recibidos. Debido a lo anterior, el SNP se divide en dos, el sensorial (o aferente) y el motor (o eferente). A su vez, el SNP motor se divide en autónomo y somático. El autónomo se refiere a las respuestas involuntarias del organismo, los nervios de esta división del SNP inervan músculo liso, músculo cardíaco y glándulas. Por el otro lado, la división somática hace referencia a las respuestas voluntarias. Los nervios en este caso inervan músculo esquelético. Por último, la división autónoma se puede dividir en simpática y parasimpática. Las respuestas simpáticas son las respuestas involuntarias que se dan cuando el organismo está en condiciones de alerta o estrés, mientras que las respuestas parasimpáticas son las que se dan durante el reposo. Los cuerpos de las neuronas, llamados somas, forman lo que se conoce como materia gris. En el SNC, se conoce como “núcleo” al conjunto de somas. En el SNP los cuerpos neuronales ocurren en forma de estructuras nodulares que reciben el nombre de ganglios.

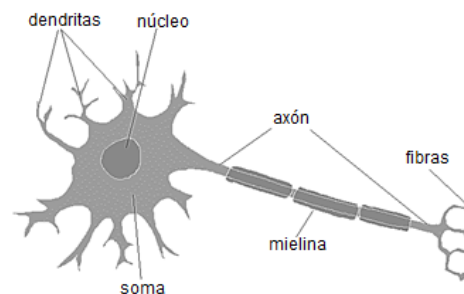


Figura 2. Esquema de una neurona y sus estructuras.

2.1.2 Neuroglia

Las células de la neuroglia son más abundantes que las neuronas en una relación de aproximadamente 3:1. En el SNC, el 90% de las células son células gliales. Estas células llevan

a cabo funciones necesarias para la supervivencia neuronal y el buen funcionamiento de todo el sistema nervioso. Las células de la glía participan en varios procesos como el transporte y procesamiento de la glucosa desde el torrente sanguíneo que es convertido en lactato por los astrocitos y que es el principal nutriente de las neuronas (Magistretti PJ, Pellerin L 1999). La neuroglia participa además en la captura necesaria para el reciclamiento de algunos neurotransmisores como el glutamato (Schousboe A *et al.*, 2004), regula la concentración de iones de potasio en el medio extracelular para que las neuronas puedan enviar señales mediante potenciales de acción (Ransom BR, Sontheimer H 1992), sintetiza y libera factores neurotróficos (Gee JR, Keller JN 2005), realiza funciones inmunológicas (Harry GH, Kraft AD 2008), produce la mielina necesaria para cubrir los axones de las neuronas y permitir la rápida propagación de los potenciales de acción (Ransom BR, Sontheimer H 1992) y puede participar en la reparación de daños luego de una lesión (Banati RB 2003). Al igual que las neuronas, tienen ramificaciones que salen de sus cuerpos aunque éstas son menos prominentes y a diferencia de las proyecciones de las neuronas, estas no generan potenciales de acción ni transmiten señales por medio de impulsos eléctricos. La glía es muy importante porque mantiene el micro-ambiente correcto y necesario para las neuronas, ayuda en su desarrollo y participa en procesos neuronales luego de una lesión. En el sistema nervioso central hay 3 tipos de glía: Los astrocitos, que obtienen su nombre de su forma celular que semeja a una estrella y que se encargan principalmente de mantener el ambiente químico apropiado para que las neuronas puedan sobrevivir y generar señales eléctricas; los oligodendrocitos, que son los encargados de producir una cubierta laminada rica en lípidos llamada mielina, que envuelve a la mayoría de los axones neuronales. La mielina es importante para que las señales eléctricas que viajan por los axones no se dispersen y por lo tanto, las señales puedan transmitirse rápidamente. En el sistema nervioso periférico las células que llevan a cabo esta función reciben el nombre de células de Schwann; la microglía, cuyo origen es hematopoyético, es la encargada de remover los desechos celulares o las células muertas, semejando lo que hacen los macrófagos en otros tejidos. Estas células además secretan moléculas que modulan la inflamación local. Por ejemplo, luego de un daño

cerebral, el número de células de microglía aumenta dramáticamente. Por último, en el sistema nervioso periférico, el cuerpo neuronal, así como las dendritas y los axones de las neuronas están rodeados por unas células que reciben el nombre de células satélite cuya función es darles protección, nutrición y soporte físico (Hanani M 2005).

2.2 LA CRESTA NEURAL

Como se mencionó brevemente antes, se conoce como cresta neural a las células que se originan en la unión entre la placa neural y las células del ectodermo y que se agrupan en la línea media de la región dorsal del tubo neural en formación sin que sean parte de éste (Fig. 3). Las células multipotenciales de la cresta neural migran lateral y ventralmente y dan origen a los ganglios dorsales de los que serán los nervios espinales. También dan origen a algunas neuronas de los ganglios sensoriales de los nervios craneales, los ganglios autónomos, la glía del SNP (células satélite y células de Schwann) y las células secretoras de la médula adrenal (parte interna de las glándulas adrenales o suprarrenales). Además, otro porcentaje de células de la cresta neural da origen a células que no serán parte del sistema nervioso, como los melanocitos de la piel, las células secretoras de calcitonina de la glándula tiroides, las células quimiosensibles de la carótida y cuerpos aórticos, los odontoblastos de los dientes y algunos huesos y músculos de la cabeza, por lo que se ha llegado a considerar a esta estructura transitoria como la cuarta capa germinal. La migración de las células de la cresta neural está determinada por señales que provienen del mesodermo, capa que se forma antes de la aparición de las células de la cresta. N-myc es necesario para esta migración, así como para la supervivencia y diferenciación de estas células. La expresión de N-myc está determinada por Hedgehog, wnt y otros factores de crecimiento. Conforme las células avanzan hacia el lado más ventral, son expuestas a distintas señales BMP, como BMP2, 4 y 7 que inducen la expresión de Mash-1, un factor de transcripción expresado en la progenie autónoma. Phox2b comienza a expresarse en el linaje simpatoadrenal (subgrupo de células de la cresta que da origen a los ganglios simpáticos y a la región medular de las glándulas

adrenales) y es necesario para que la expresión de Mash-1 se mantenga. Las neuronas que forman los ganglios sensoriales comienzan a extender sus neuritas para formar los nervios periféricos hacia el tubo neural. A la octava semana de la vida intrauterina ya hay conexiones sinápticas entre las neuronas del SNP y las neuronas de la médula espinal. El número de sinapsis y su complejidad continúa incrementándose incluso después del nacimiento, al igual que la generación de la glía.

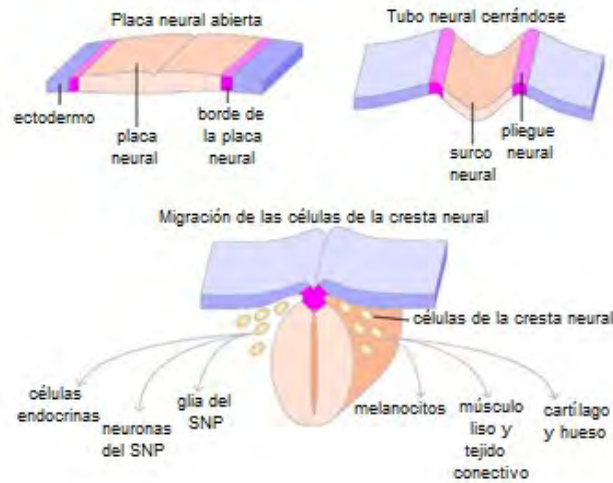


Figura 3. Esquema de la formación de la cresta neural y de las células que se producen en ella.

Los tumores embrionarios llamados neuroblastomas se originan en su mayoría a partir de las células derivadas de la cresta neural en el abdomen, adyacentes a la aorta en la región del riñón o en la región medular de las glándulas adrenales. Phox2b parece importante en la aparición de los neuroblastomas pues se han encontrado mutaciones en el gen *PHOX2B* en algunas poblaciones de células de estos tumores y se puede considerar como un supresor de tumores pues como se mencionó, es necesario para la diferenciación de neuronas autonómicas y la inhibición de la proliferación de las células progenitoras de éstas, por lo que si está mutado, las células continúan proliferando y pueden formar tumores (Raabe EH *et al.*, 2007). Otro factor importante en la cresta neural es EGF (factor de crecimiento epidermal), quien contribuye a la formación de neuronas y melanocitos al final de su

migración desde la cresta neural. La sobre-expresión de éste factor y su receptor está asociada con la proliferación de células de neuroblastoma (Da Motta *et al.*, 1997). El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) también tiene un papel muy importante en la proliferación y diferenciación de las células de la cresta neural durante el desarrollo. Lo anterior, activando la vía PI3K/AKT e incrementado la expresión del gen de la proteína anti-apoptótica survivina. VEGF está sobre-expresado en los neuroblastomas de etapas avanzadas (Eggert A *et al.*, 2000). Así mismo, el receptor TrkA, cuyo ligando es el factor de crecimiento nervioso (NGF), es crucial para el desarrollo de varios linajes celulares simpáticos ya que participa en la diferenciación y supervivencia de dichas células. TrkA es miembro de la familia de receptores con actividad de cinasas de tirosina conocida como Trk. Los miembros de esta familia, TrkA, TrkB y TrkC siendo los más comunes, son receptores para neurotrofinas (NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor) o NT4 (neurotrophin-4) y NT3 (neurotrophin-3) respectivamente). La señalización a través de estos receptores es importante para la supervivencia, proliferación y diferenciación de células neuronales, así como la formación de dendritas y axones (Segal RA, Greenberg ME 1996). TrkA regula la maduración del SNP y su expresión en neuroblastomas es favorable pues participa en la diferenciación y arresto celular de las células tumorales (Matsushima H, Bogenmann E, 1994). TrkA y TrkC son importantes en el SNP principalmente mientras que TrkB lo es para el SNC. El NGF es producido por las células de Schwann y por fibroblastos cercanos a los nervios (Matsuoka I *et al.*, 1991).

2.3 LOS NEUROBLASTOMAS

Los neuroblastomas son los tumores sólidos más comunes en los menores de 5 años y el tercer tipo de cáncer más común en menores de 15 años. En algunos casos muy raros, pueden detectarse casos de neuroblastoma por medio de ultrasonidos incluso antes del nacimiento. Son considerados tumores embrionarios, que son aquellos que se originan cuando hay defectos en la diferenciación de células progenitoras en células maduras durante el desarrollo. Se originan a partir de células derivadas de la cresta neural que durante el

desarrollo normal dan origen a las células del sistema nervioso periférico simpático. El sistema simpático forma parte del sistema nervioso autónomo, responsable de las funciones del cuerpo como la respiración, la presión arterial, los latidos del corazón y la digestión entre otras. El sistema simpático incluye los nervios que corren junto a la médula espinal, las células nerviosas de las glándulas suprarrenales (o adrenales) y los ganglios (agrupaciones de cuerpos de neuronas fuera del sistema nervioso central) del cuerpo. Un tercio de los neuroblastomas se desarrolla en los ganglios de las glándulas suprarrenales, otro tercio en los ganglios del abdomen y el resto, en los ganglios del cuello, el pecho o la pelvis. Con frecuencia se expande a los huesos, la médula ósea, el hígado o el sistema nervioso central. Aunque la transformación de neuroblasto simpático sano a neuroblastoma no es clara, hay ciertas características que se repiten en todos los neuroblastomas y que además determinan el grado de malignidad del tumor. Algunos defectos cromosómicos presentes en las células de neuroblastoma son: pérdidas de alelos en el brazo 1p y en el 11q, copias extra del brazo 17q y el más importante, la amplificación del proto-oncogén *MYCN*, presente en el 25% de todos los neuroblastomas. *MYCN* es el gen que codifica para la proteína proto-oncogénica n-myc. Esta proteína nuclear con función de factor de transcripción favorece la proliferación celular, la pluripotencialidad y la inhibición de la diferenciación celular (Knoepfler PS *et al.*, 2002) y se expresa ampliamente en el riñón y en el cerebro fetal y es crucial para el desarrollo de éste. La amplificación de este gen, así como la sobre expresión de la proteína se asocia al desarrollo de tumores. En los neuroblastomas es señal de un mal pronóstico y favorece las metástasis induciendo la inhibición de las integrinas $\alpha 1$ y $\beta 1$, lo que hace que las células se desprendan de la matriz extracelular posteriormente migrando e invadiendo otros órganos (Tanaka N, Fukuzawa M, 2008, van Golen CM *et al.*, 2003). El tratamiento con ácido retinoico en células de neuroblastoma primero regula negativamente a *MYCN*, y posteriormente se observan cambios en el ciclo celular y morfológicos (Thiele CJ *et al.*, 1985). Los casos de neuroblastomas hereditarios representan menos del 5% de todos los casos y se ha mapeado la predisposición de heredar neuroblastoma en los cromosomas 16p12-13 y 4p16. El pronóstico es más favorable mientras menor sea la edad del paciente al

momento del diagnóstico. Por ejemplo, en infantes menores al año de edad, la supervivencia a 5 años se da en el 90% de los pacientes, si el paciente está entre el año de edad y los 4 años, la supervivencia a 5 años disminuye al 68% de los pacientes pero si el paciente tiene más de 5 años, la supervivencia a 5 años disminuye hasta el 52% de los pacientes (OMS, 2009). Algo único de los neuroblastomas es el hecho de que por mecanismos que aún no se conocen bien, las células pueden activar la apoptosis y el tumor desaparece. Esto es más común mientras más joven sea el paciente. Además, las células tumorales pueden madurar espontáneamente a células que forman ganglios y que dejan de dividirse, formando lo que se conoce como ganglioneuroma y que es considerado un tumor benigno. Altos niveles de TrkA en asociación con baja o nula expresión de N-myc se asocian con tumores que comúnmente regresan espontáneamente y son favorables. Los tumores favorables normalmente expresan también a NGF (Eggert A *et al.*, 2000). Si la expresión es alta, las células tienden a diferenciarse, y si la expresión es relativamente baja, las células mueren por apoptosis. Por lo tanto, la vía TrkA/NGF parece jugar un papel importante en la regresión espontánea de algunos neuroblastomas. En contraste, la expresión del receptor TrkB se asocia con tumores clínicamente desfavorables y se relaciona con la amplificación de *MYCN* (Aoyama N *et al.*, 2001). Su ligando, BDNF también está altamente expresado en estos tumores, lo que genera un circuito que amplifica la supervivencia, la capacidad de hacer metástasis y la resistencia a fármacos (Scala S *et al.*, 1996). Por último, TrkC también se asocia con neuroblastomas favorables que normalmente también expresan ciertas cantidades de su ligando, la neurotrofina-3 (Hoehner JC *et al.*, 1995). Otro defecto común en muestras tumorales es la falta o delección de la caspasa 8, lo que se asocia con que la enfermedad reaparezca, haga metástasis y los tumores sean más agresivos, lo anterior no sólo se ha observado en neuroblastomas, también en meduloblastomas, glioblastomas y retinoblastomas (Teitz T *et al.*, 2000). Además la caspasa 8 es importante en la respuesta a algunos fármacos como el etopósido. Algunos tumores resistentes a la quimioterapia además de no tener caspasa 8 sobre-expresan Bcl-2 o Bcl-XL. La tasa de incidencia en varios países del mundo es muy similar (aproximadamente 550 casos al año), lo que sugiere que factores ambientales no

participan en la aparición de esta enfermedad. Los síntomas incluyen irritabilidad, fiebre, aumento en la presión sanguínea, diarrea, enrojecimiento de la piel y sudoración excesiva. Si se desarrolla en el abdomen, se puede palpar la masa tumoral. Cuando ha hecho metástasis, si afecta los huesos puede provocar problemas para caminar o si afecta la médula espinal, puede provocar adormecimiento de los miembros, parálisis y debilidad corporal. Si la metástasis se da en la médula ósea, los pacientes pueden presentar una disminución en el número de células rojas, blancas y plaquetas circulantes en la sangre, lo que trae como consecuencia anemia, infecciones constantes y sangrados excesivos luego de un golpe o accidente. Debido a que los síntomas se pueden confundir con otros padecimientos, se deben realizar pruebas de sangre y orina para determinar si se trata de la presencia de un neuroblastoma o no. Conforme las células de la cresta neural migran a la aorta, comienzan a expresar tirosina hidroxilasa (TH), enzima crucial en la biosíntesis de catecolaminas (dopamina, adrenalina y noradrenalina) y debido a que las células de neuroblastoma se derivan de células que se transforman durante esta migración, la mayoría de los neuroblastomas secretan catecolaminas. Los metabolitos de estas catecolaminas (ácido homovanílico y ácido vanilmandélico) pueden ser detectados en la sangre o en la orina. En el 90% de los pacientes de neuroblastoma, los niveles de estos metabolitos son muy altos y pueden ser detectados en pruebas de laboratorio, lo que se utiliza como diagnóstico de la enfermedad. Además, se utilizan pruebas imagenológicas como los rayos X, las tomografías y las resonancias magnéticas para buscar la masa tumoral.

2.3.1 Etapas del neuroblastoma

Desde mediados de los 90's se utiliza la clasificación conocida como INSS (International Neuroblastoma Staging System). De manera simplificada, las etapas son:

- 1 Localizado extirpable. El tumor se encuentra sólo en el lugar donde se originó y puede removerse completamente mediante cirugía. Los ganglios linfáticos

- están libres de células cancerosas
- 2A Localizado no-extirpable. El tumor se encuentra sólo en el sitio en el que se originó pero por su tamaño, localización o relación con otros órganos no puede ser removido en su totalidad mediante cirugía. Los ganglios linfáticos están libres de células cancerosas.
 - 2B Localizado no-extirpable. Hay células cancerosas en los ganglios linfáticos que están en el mismo lado del cuerpo que el tumor.
 - 3 Regional. El cáncer ha avanzado a tejidos cercanos al lugar de origen del tumor. Hay células cancerosas en los ganglios linfáticos cercanos al tumor pero en ambos lados del cuerpo.
 - 4 Diseminado. El cáncer se ha propagado a ganglios linfáticos distantes, los huesos, la piel, el hígado, la médula ósea u otros órganos.
 - 4S También llamado especial. El tumor primario se encuentra sólo en un lado del cuerpo. Puede haber células cancerosas en los ganglios linfáticos del lado del tumor. El neuroblastoma puede haberse propagado a ciertos órganos. No hay daño en los huesos. El paciente es menor al año de edad.

La etapa llamada 4S es una categoría única de infantes cuya enfermedad ya ha hecho metástasis. En esta categoría se incluye a los infantes menores a los 12 meses de edad con metástasis limitada al hígado, la piel, la médula ósea (con menos del 10% de células remplazadas con células tumorales) y cuyo tumor primario aún está localizado (tumores de etapa 1 y 2). Los pacientes que presentan neuroblastomas de esta etapa representan del 7 al 10% de todos los pacientes y tienen un pronóstico mucho más favorable que otros pacientes que presentan metástasis. Los tumores de esta etapa tienen la peculiaridad de presentar maduración y regresión espontánea. Si no hay amplificación de *MYCN* casi siempre regresan espontáneamente y el 95% de los pacientes sobrevive más de 5 años sin que el cáncer regrese (Alvarado CS *et al.*, 2000).

Hay 3 hipótesis acerca de la regresión espontánea de los tumores 4S:

-Estos tumores dependen de factores de crecimiento y proteínas que están presentes a bajas concentraciones y que una vez el tumor alcanza cierto tamaño son insuficientes y el tumor muere por apoptosis.

-Estos tumores se presentan en pacientes muy jóvenes y conforme se va desarrollando el paciente, el tumor es reconocido y destruido por el sistema inmune.

-Las células se vuelven responsivas a las señales del medio y maduran o desencadenan vías que llevan a la apoptosis (Brodeur GM, Bagatell R 2014).

Además de la clasificación por etapas, se puede clasificar a los tumores como de riesgo bajo, intermedio o alto en base a la edad, el estado de *MYCN* y la histopatología. Las etapas 1 - 2A incluyen tumores pequeños de bajo riesgo. Las etapas 2B y 3 incluyen a pacientes cuya enfermedad se considera de riesgo intermedio, los tumores son localizados y no presentan defectos cromosómicos estructurales. La etapa 4 incluye a los pacientes con tumores considerados de alto riesgo caracterizados por alteraciones genéticas graves como la amplificación de *MYCN*. El 60% de los pacientes ya presentan metástasis al momento del diagnóstico (Simon T *et al.*, 2004).

2.3.2 Tratamiento de los neuroblastomas

El tratamiento consiste en cirugía, quimio o radioterapia o incluso una combinación de los tratamientos. El tratamiento es diferente para cada paciente y depende de la edad y la etapa del neuroblastoma principalmente. En algunos casos primero se remueve la mayor parte del tumor mediante cirugía y después se da quimio o radioterapia o incluso ambas, esto por ejemplo en los pacientes con tumores considerados de bajo riesgo o intermedio. Aproximadamente el 80% de los pacientes se curan. En otros casos, primero se da la quimio o la radioterapia para reducir el tamaño del tumor y que éste pueda ser removido con cirugía. La quimioterapia es el uso de fármacos para tratar el cáncer. Es una terapia sistémica pues el fármaco entra al torrente sanguíneo y viaja por la circulación atacando todas las células cancerosas que puedan estar en cualquier parte del cuerpo. Por lo anterior, es muy útil

cuando el cáncer se ha expandido a los ganglios linfáticos, el hígado, la médula ósea, los pulmones u otros órganos. El 63% de los pacientes, que corresponde a los pacientes con tumores de riesgo intermedio o alto necesitarán quimioterapia. Ésta puede ser un solo fármaco o varios en combinación. Los fármacos más utilizados para tratar el neuroblastoma son: ciclofosfamida, cisplatino, vincristina, doxorubicina, etopósido y topotecán. Para los tumores de alto riesgo los fármacos se administran en combinación. La quimioterapia no afecta únicamente a las células cancerosas, también daña a las células normales. Los efectos secundarios temporales más comunes de los fármacos utilizados en la quimioterapia son: náuseas, vómito, pérdida del cabello, depresión del sistema inmune y supresión de la médula ósea. Lo último significa que la médula ósea es incapaz de reemplazar las plaquetas, células blancas y células rojas viejas por nuevas, lo que provoca leucopenia y anemia. Otros efectos secundarios graves de los fármacos son: daño renal, daño hepático, daño neural, pérdida de la audición y cardiotoxicidad. Los efectos anteriores empeoran si como se mencionó anteriormente, la quimioterapia se administra en conjunto con radioterapia. En pacientes de alto riesgo en algunos casos se utiliza terapia biológica con el uso de ácido retinoico (13-*cis*-retinoic acid), que es un inductor de la diferenciación celular. Para eliminar células tumorales residuales en algunos pacientes se opta por el uso de un anticuerpo en contra de GD2 (dinutuximab). GD2 es un disialogangliósido presente en células de neuroblastoma, en donde sus niveles de expresión son más altos en comparación con los que hay en neuronas, melanocitos y fibras periféricas del dolor sanas, lo que lo vuelve un buen candidato para ser utilizado en tratamientos anti-tumorales. En este tratamiento, se administra un anticuerpo monoclonal que induce lo que se conoce como citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos o ADCC por sus siglas en inglés. La región variable del anticuerpo se une al antígeno presente en la célula tumoral, mientras la región Fc se une al receptor Fc presente en los monocitos, macrófagos, neutrófilos y/o células NK (natural killer) que estimulan la lisis celular (Simon T *et al.*, 2004).

En México, dos de los fármacos más utilizados para tratar el neuroblastoma son el etopósido y la vincristina.

2.3.2.a Etopósido

Es un inhibidor de la topoisomerasa II que se obtiene a partir de la toxina de la planta mandrágora (*Podophyllum*). El etopósido se une a la topoisomerasa II impidiendo que se doble y por lo tanto, impidiendo que lleve a cabo su función de ligar las moléculas libres de ADN, lo que se conoce como "interrupción del ciclo catalítico" y que resulta en la acumulación de rompimientos de cadena sencilla y doble, lo que provoca una inhibición de la replicación del ADN así como su transcripción, lo que culmina en una muerte apoptótica. En los neuroblastomas tratados con etopósido se observa la activación de PKC δ y de las caspasas 3, 2 y 8. Este fármaco actúa principalmente en las células cuando éstas entran a la fase S (síntesis del material genético) y G2 (fase de crecimiento celular, síntesis de proteínas y revisión del material genético antes de la mitosis) del ciclo celular. La entrada de éste fármaco al SNC a través de la barrera hematoencefálica es baja pero el fármaco es metabolizado en el hígado y es eliminado por excreción renal, por lo que puede resultar tóxico para dichos órganos si la dosis no es la correcta o en tratamientos prolongados. El principal efecto secundario del etopósido es la supresión de la producción de células en la médula ósea, lo que provoca anemia y leucopenia. Otros efectos secundarios son: náusea, alopecia, vómito, diarrea y fiebre. (Lehne RA 2003).

2.3.2.b Vincristina

Es un alcaloide obtenido de la planta de la vinca (*Vinca rosea*). Inhibe la división celular en la mitosis temprana cuando se une a los monómeros de tubulina evitando la formación de los microtúbulos, lo que impide el movimiento de los cromosomas. Los cromosomas duplicados no se pueden separar y la célula no se puede dividir, lo que se conoce como arresto metafásico (su nombre se debe a que ocurre en la fase de la mitosis conocida como

metafase). El arresto metafásico es una señal para que la célula inicie los procesos de muerte por apoptosis. Luego del tratamiento con vincristina se observa un aumento en la activación de la caspasa 3. La entrada al SNC es pobre, el fármaco es metabolizado en el hígado, pasa al sistema biliar, luego al intestino y sale por las heces. Sólo un pequeño porcentaje es eliminado por la orina. Su efecto secundario más grave es ser tóxica para los nervios periféricos, lo que provoca lo que se conoce como neuropatía periférica y que da a los pacientes síntomas como hormigueos en las extremidades, adormecimientos y problemas para caminar, lo que limita la dosis empleada. Otros efectos secundarios son: diarrea, pérdida de peso, náuseas, vómito, leucopenia y anemia. (Lehne RA 2013).

2.4 ANEMIA

La anemia está definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una condición en la que los niveles de hemoglobina son menores a los 13g/dl de sangre en hombres y menores a 12g/dl de sangre en mujeres. En los menores de 15 años, se considera una anemia leve a partir de concentraciones de 10g/dl de hemoglobina en la sangre y una anemia severa si es menor a 8g/dl. Sus síntomas como los mareos, dolores de cabeza, debilidad y falta de concentración entre otros, disminuyen la calidad de vida de los pacientes que presentan esta condición. La disminución en los niveles de hemoglobina trae como consecuencia niveles bajos de oxígeno en órganos vitales, lo que puede provocar daño en dichos órganos e incluso la muerte por paro cardíaco. Existen varios tipos de anemia y del tipo de anemia dependerá el tratamiento. En los pacientes con cáncer el origen es multifactorial y va desde deficiencias nutricionales, sangrados y hemolisis hasta daños en la médula ósea por la propia enfermedad o por el tratamiento con radioterapia y quimioterapia. La quimioterapia causa anemia pues los fármacos que se utilizan afectan a los progenitores eritroides presentes en la médula ósea, por lo que no se produce la cantidad necesaria de glóbulos rojos. Además, algunos de estos fármacos también dañan a los riñones, en donde se produce el factor más importante para la proliferación, diferenciación y supervivencia de los progenitores eritroides: La eritropoyetina (Epo). Este tipo de anemia no se puede corregir

únicamente con suplementos alimenticios como el hierro, la vitamina B12 o el ácido fólico ya que estos no inducen la producción ni diferenciación de los progenitores eritroides en la médula ósea, por lo que el tratamiento debe ser mediante una transfusión sanguínea o con inyecciones de eritropoyetina recombinante humana (rhEpo). Debido a las complicaciones de las transfusiones sanguíneas como la disponibilidad del tipo sanguíneo adecuado, el tiempo que tiene que pasar el paciente en el hospital, la posibilidad de transmisión de enfermedades como la hepatitis C o del uso de sangre con desequilibrios electrolíticos que pueden tener consecuencias en la salud, hoy en día el tratamiento por excelencia de la anemia en pacientes con cáncer es el uso de la rhEpo.

2.4.1 Consecuencias de la anemia en pacientes con cáncer

La anemia es un factor pronóstico de supervivencia en pacientes con cáncer. 72% de los pacientes con neoplasias hematológicas y 66% de los pacientes con tumores sólidos presentan anemia en alguna etapa de la enfermedad (Birgegård G *et al.*, 2005). Esta condición se asocia con tumores más agresivos. La disminución en la concentración de oxígeno en el organismo, provoca que se generen distintos microambientes tumorales (Vaupel P 2008). En estos casos, no todo el tumor recibe la misma cantidad de oxígeno y las células más alejadas de los vasos sanguíneos se encuentran en condiciones de hipoxia, lo que provoca que las células tumorales lleven a cabo una glucólisis anaerobia y produzcan lactato para ganar ATP y poder llevar a cabo sus funciones. La producción de lactato genera que el microambiente en esta zona sea ácido, lo que se asocia con el origen de células tumorales más agresivas y que responden menos o no responden al tratamiento. Lo anterior en parte debido a que se seleccionan células que han perdido a p53 y que por lo tanto no sufren apoptosis. Muchos fármacos necesitan oxígeno para llevar a cabo sus funciones formando radicales libres y si el oxígeno es bajo, no pueden reducir el oxígeno y matar así a las células tumorales. Los fármacos pueden cruzar las membranas celulares cuando estas no tienen carga pero el microambiente ácido las vuelve protonadas y los fármacos entran en menor cantidad. Además, algunos fármacos necesitan transportadores, mismos que dejan de

funcionar cuando el pH es bajo. En los ambientes ácidos se observa un aumento en la expresión de glicoproteína-P, que se encarga de expulsar a los fármacos de las células por lo que tampoco pueden dañar a las células. En condiciones de hipoxia, se activa el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF) que induce angiogénesis pero que además, activa varias vías de supervivencia lo que protege a las células tumorales (Vaupel P 2008). Si bien la proliferación celular disminuye en las zonas hipóxicas del tumor, estas células son más resistentes como se ha mencionado y además algunos fármacos actúan mejor en células en división durante la fase de síntesis del ADN (Nordsmark M *et al.*, 1996).

2.5 LA ERITROPOYETINA Y SU RECEPTOR

La Eritropoyetina (Epo) se describió inicialmente como una citocina hematopoyética que inducía la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de los progenitores eritroides presentes en la médula ósea. Es una glicoproteína de 34 kD que contiene 165 aminoácidos y 4 cadenas de carbohidratos (Koury MJ, Bondurant MC 1992) (Fig. 4). La región de los carbohidratos es rica en ácido sialico y es crucial para dar estabilidad a la molécula y actividad biológica.

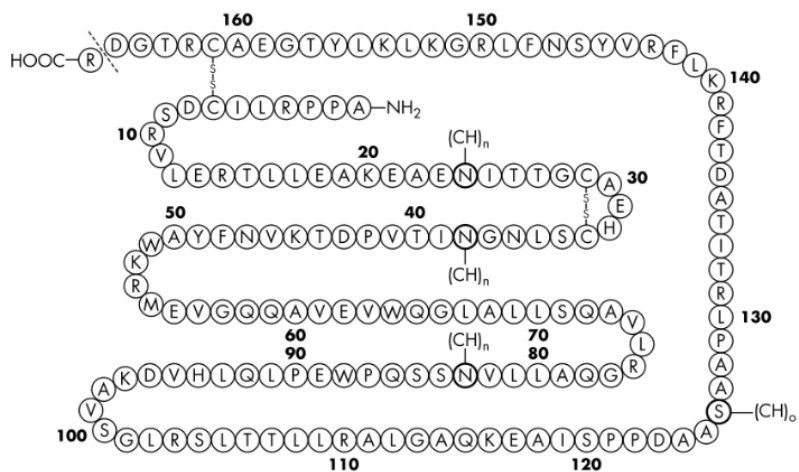


Figura 4. Estructura primaria de la Eritropoyetina. Se muestra la posición que ocupan las cadenas de carbohidratos.

En etapas fetales es producida en el hígado pero a partir del nacimiento, se produce principalmente en las células intersticiales tipo 1 parecidas a fibroblastos que se localizan en el espacio peritubular en la corteza y la medula exterior del riñón. La Epo es crucial para la eritropoyesis y por lo tanto para la supervivencia del embrión. Los ratones que carecen de la expresión de Epo o del receptor para Epo, o cuya expresión está mutada, mueren al día 13. Además de la eritropoyesis defectuosa en el hígado, estos animales tienen defectos en el corazón (hipoplasia ventricular) y el cerebro (mayor sensibilidad a la falta de oxígeno, aumento de la muerte apoptótica de neuronas, menor número de progenitores neurales). Uno de los blancos más primitivos de la Epo son los progenitores eritroides conocidos como unidades formadoras de brotes eritroides (BFU-E), que dan origen a las unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E), que son las células más sensibles a la Epo por poseer el mayor número de receptores para Epo en su superficie (se estima que pueden ser 1,000–3,000 por célula) (Broudy VC *et al.*, 1991). Conforme van madurando las células, va disminuyendo el número de receptores (Fig. 5).

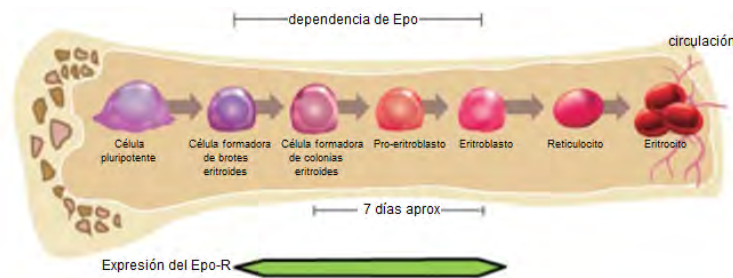


Figura 5. Eritropoyesis. Se muestran las células dependientes de Epo y la expresión del EpoR.

Hoy se sabe que la producción de Epo no es exclusiva del riñón y que otros tejidos entre los que se encuentra el tejido nervioso (Digicaylioglu M *et al.*, 1995), producen ciertas cantidades. Otros órganos que producen ciertas cantidades de Epo en condiciones de hipoxia son los testículos, el útero, los pulmones, el bazo, el corazón y la médula ósea. Para llevar a

cabo sus funciones, la Epo debe unirse a su receptor, el receptor para Eritropoyetina (Epo-R). El Epo-R es parte de la superfamilia de receptores para citocinas clase I. Está formado por 484 aminoácidos y posee sólo un dominio transmembranal (Fig. 6). Se encuentra en la membrana citoplásmica como un homodímero pre-formado que cuando se une a la Epo presenta un cambio conformacional que permite que las regiones intracitoplásmicas queden lo suficientemente próximas para que las moléculas de JAK2 que ahí se encuentran se transfosforilen (Youssoufian H *et al.*, 1993). Una vez que las moléculas de JAK2 están fosforiladas, fosforilan a su vez a los residuos de tirosina que hay en todo lo largo de la región citoplásmica del receptor. A estos residuos de tirosina fosforilados se unen distintas moléculas que sirven de anclaje para activar vías como JAK/STAT, PI3K/AKT, MAPK, PKC y NFkB (Fig. 7). Las moléculas de STAT son reclutadas en los residuos Y343 y Y401 del Epo-R (Damen JE *et al.*, 1995, Quelle FW *et al.*, 1996).

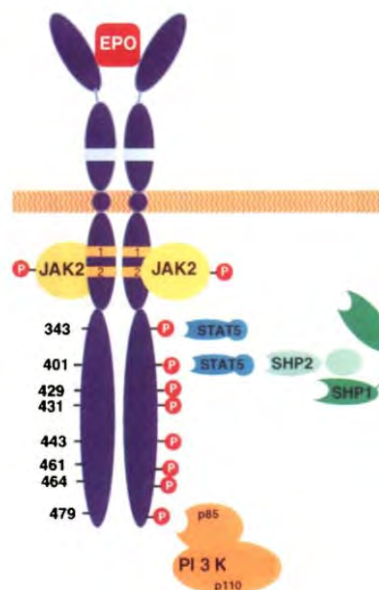


Figura 6. Esquema del receptor para Eritropoyetina (EpoR).

2.5.1.a Vía JAK/STAT

Como se mencionó anteriormente, en la región intracelular del Epo-R se encuentran moléculas de JAK2 (Janus kinase 2) que se transfosforilan una vez que la Epo se une al receptor y este presenta un cambio conformacional que permite que las moléculas de JAK2 se aproximen lo suficiente. Las moléculas de JAK2 fosforiladas en residuos de tirosina, fosforilan a su vez los residuos de tirosina que existen a lo largo de la región citoplásmica del Epo-R. Estos residuos fosforilados reclutan diversas moléculas de señalización intracelular entre las que se encuentra STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription). Una vez reclutado, STAT5 es fosforilado por las propias moléculas de JAK2. Una vez fosforiladas, las moléculas de STAT5 se dimerizan y se translocan al núcleo celular en donde se unen a secuencias específicas de ADN y permiten la transcripciones de genes. STAT5 induce genes anti-apoptóticos como Bcl-xL y el principal mecanismo de acción de la Epo es la supresión de apoptosis. Dentro de las vías de señalización que puede activar la Epo, se considera la activación de JAK2/STAT5 como la vía canónica de la Epo y también la más importante. (Darnell JE Jr 1997).

2.5.1.b Vía PI3K/AKT

Otra vía que se activa luego de la unión de Epo a su receptor es la conocida como PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase) y AKT (protein kinase B). Las PI3Ks son miembros de la familia de cinasas de lípidos. Están formadas por la subunidad catalítica p110 y la subunidad reguladora p85 y se activan por cinasas de tirosina presentes en receptores como el Epo-R en este caso. La subunidad p85 se une al residuo 479 del Epo-R, lo que induce su fosforilación. Una vez que p85 se ha fosforilado se activa y puede fosforilar y por lo tanto activar el grupo 3'-OH de los 24 uración 24 24 os de inositol como por ejemplo el fosfatidilinositol 3,4-bifosfato (PIP₂), lo que resulta en la formación de segundos mensajeros

como el fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃), que sirve de anclaje para la unión de la familia de cinasas AKT a la membrana celular para que puedan ser fosforiladas por PDK1. La activación de AKT es necesaria para que la Epo por ejemplo, lleve a cabo sus efectos neuroprotectores (Ruscher K *et al.*, 2002). AKT es una cinasa de treoninas y serinas que fosforila a proteínas apoptóticas como Bad y caspasa 9, inactivándolas. Esta vía de igual manera induce un aumento en la activación de la proteína anti-apoptótica Bcl-xL y puede activar al factor nuclear NF-κB que está involucrado en la activación de varias vías anti-apoptóticas (Zhou H *et al.*, 2000).

2.5.1.c Vía MAPK

La vía MAPK (mitogen activated protein kinases) es capaz de regular procesos como la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. Una vez que el Epo-R se activa, puede reclutar a proteínas adaptadoras como Shc y GRB2, lo que permite que se active la clásica cascada de señalización Shc/GRB2/SOS/Ras/c-Raf-1/MEK/ERK, involucrada en la proliferación celular. En los eritroblastos, para que Epo ejerza sus efectos sobre el crecimiento celular es necesario que se active la vía de las MAPK. De la magnitud y duración de la señal depende si la célula prolifera o se diferencia. Una señal de duración corta induce proliferación, mientras que si la señal es prolongada, la vía induce diferenciación. De manera indirecta, cuando se activa la vía PI3K/AKT o el NFκB luego de la activación del Epo-R, se puede activar ERK1/2. (Ratajczak J *et al.*, 2001).

En los eritroblastos las 3 vías mencionadas anteriormente son necesarias para que la Epo lleve a cabo sus funciones.

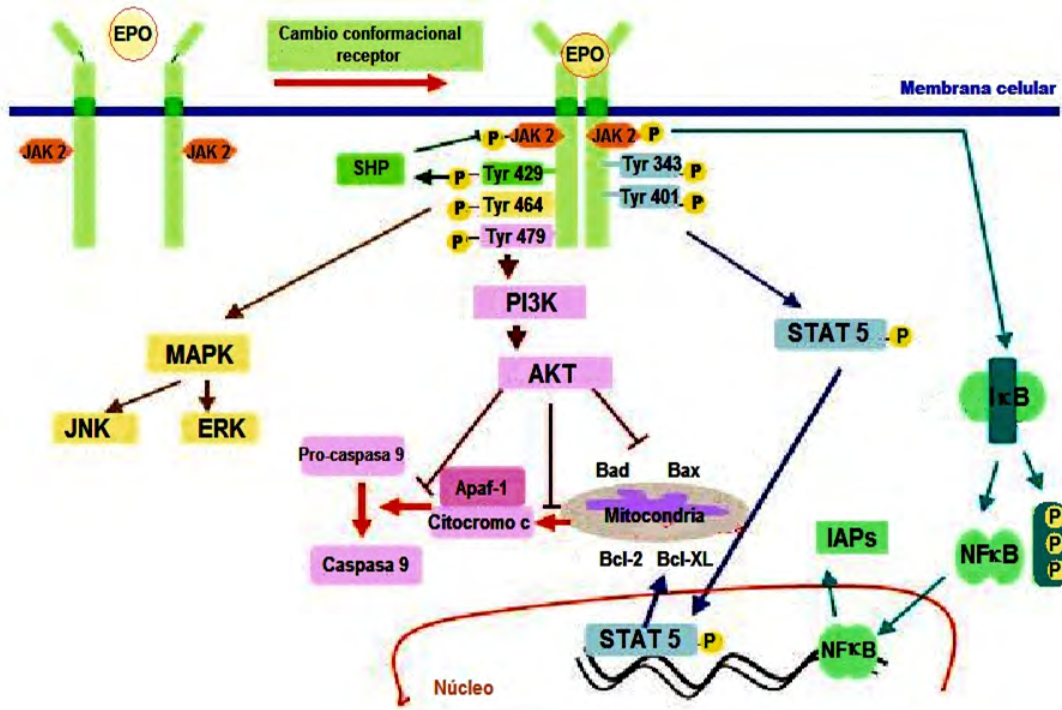


Figura 7. Vías activadas por la Eritropoyetina. (Genc S et al., 2004).

La señalización del Epo-R se inhibe por la proteína SH2 inducible por citocinas 3 (CIS3 o SOCS-3) que se puede unir al Epo-R fosforilado y a JAK2. El efecto de la Epo también termina por la acción de la fosfatasa de células hematopoyéticas (HCP) que cataliza la desfosforilación de JAK2. Mutaciones en HCP provocan casos de eritrocitosis. De igual manera, las fosfatasas SHP1 (fosfatasa de tirosina 1) y PTP1B (fosfatasa de proteínas de tirosina 1B) pueden desfosforilar a JAK2 y los residuos de tirosina del receptor. En estudios *in vitro* se ha observado que los niveles de las moléculas implicadas en las vías de señalización que activa la Epo vuelven a sus niveles basales luego de 30-60 minutos. El complejo Epo/Epo-R es internalizado luego de la fosforilación del receptor y el proteasoma controla la duración de la señal inhibiendo la renovación de expresión de moléculas del receptor en la superficie celular. Se ha encontrado que células endoteliales, enterocitos, células de músculo liso, esquelético y cardíaco, la placenta, células productoras de insulina y células neuronales y no-neurales del sistema nervioso, poseen receptores funcionales (Arcasoy MO 2008). Se han descrito isoformas del Epo-R que se producen por *splicing* alternativo y que producen

receptores anclados en la membrana pero incompletos en la región citoplásmica o formas solubles. Todas estas isoformas se consideran reguladores negativos porque captan la Epo circulante pero no inducen señalización, por lo que la Epo no genera ningún efecto de los que se han venido mencionando. En las células endoteliales del cerebro de rata por ejemplo, se han descrito dos isoformas: el receptor silvestre y una isoforma soluble que se une a la Epo pero que no induce señalización (Yamaji R *et al.*, 1996). De hecho, en personas sanas, las células mononucleares de la médula ósea y de la sangre periférica poseen dos formas del Epo-R: la silvestre o completa y la forma truncada o incompleta en la región citoplásmica. El ARNm de la forma incompleta tiene restos del intrón VII mientras que el de la forma completa comprende solo exones del I al VIII. La forma incompleta no está presente en las células de pacientes con *Policitemia vera*, padecimiento en el que se produce un exceso de eritrocitos principalmente, lo que demuestra la importancia de esta isoforma como un regulador negativo del efecto de la Epo (Chiba S *et al.*, 1997). Líneas celulares de eritroleucemias tampoco presentan la forma incompleta del Epo-R. La expresión del gen de Epo es regulada en la mayoría de los tejidos, incluido el sistema nervioso, por la concentración de oxígeno. La concentración de Epo en sangre es de alrededor de 15 U/l, pero puede aumentar hasta 10,000 U/l si los niveles de oxígeno, hemoglobina o presión arterial disminuyen. En el útero en cambio, es regulado por la concentración de estrógeno. En el sistema nervioso, también la expresión del Epo-R es regulada por la concentración de oxígeno, siendo la hipoxia, su principal estímulo, sin embargo, los mecanismos son poco claros (Sanchez PE *et al.*, 2009). Otros estímulos de la producción de Epo en el sistema nervioso son la hipoglucemia o la producción de especies reactivas al oxígeno en las mitocondrias. En todos los casos, la expresión es regulada por el factor de transcripción inducible por hipoxia HIF (Fig. 8). En condiciones de normoxia, la disponibilidad de oxígeno permite la degradación de la subunidad α de HIF presente en el citoplasma mediante la hidroxilación de sus residuos de prolina, ya que a estos residuos hidroxilados se puede unir la proteína von Hippel-Lindau (pVHL), lo que permite la ubiquitinación y posterior degradación de la subunidad mediante el proteasoma. La disponibilidad de oxígeno también permite la hidroxilación de las

asparaginas del extremo C-terminal del dominio de transactivación de HIF- α , lo que bloquea su interacción con coactivadores transcripcionales. Cuando no hay oxígeno, dichas hidroxilaciones no se llevan a cabo y la subunidad α es estable y puede viajar al núcleo para formar un heterodímero con la subunidad β que se encuentra ahí. El heterodímero de HIF recluta coactivadores transcripcionales que permiten la transcripción de distintos genes como VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), el transportador de glucosa GLUT1 o la propia Epo, que al inicio de sus genes poseen una secuencia conocida como HRE (elemento de respuesta a hipoxia) a donde HIF se puede unir (Sharp FR, Bernaudin M 2004).

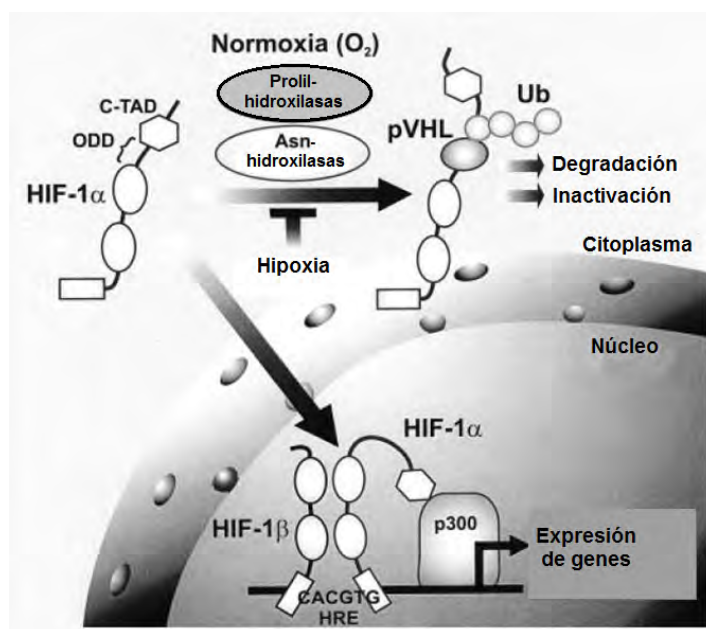


Figura 8. Regulación de HIF-1. (Jelkmann W. 2004).

La expresión de Epo disminuye por la exposición a citocinas inflamatorias como la interleucina 1- β , 6 y el TNF- α . Los mecanismos de degradación de la Epo en circulación son poco claros pero se acepta que es removida de la circulación por la toma de Epo en células que poseen el Epo-R (Lasne F, de Ceaurriz J 2000).

2.5.2 Eritropoyetina recombinante humana

El gen EPO en los humanos se localiza en el cromosoma 7 y consiste de 5 exones y 4 intrones. En 1977 se purificó Epo humana de la orina de pacientes anémicos (Miyake T *et al.*, 1977) y en 1985 se clonó y transfectó exitosamente el gen de la Epo humana en células de ovario de hámster (CHO) (Lin FK *et al.*, 1985) lo que permitió producir industrialmente eritropoyetina recombinante humana (rhEpo). Desde 1989, la FDA aprobó su uso en el tratamiento de la anemia de pacientes con fallas renales, cáncer, nacimientos prematuros, inflamación crónica e infección por VIH. La administración puede ser subcutánea o intravenosa aunque se ha encontrado que cuando es subcutánea es más efectiva pues se absorbe mayor porcentaje de la dosis administrada, además, la vida media de la Epo cuando es administrada intravenosamente es de 4–9 horas mientras que cuando es administrada subcutáneamente es de más de 24 horas. La dosis varía ampliamente entre un tratamiento y otro, pero una de las dosis más comunes es la administración de 40,000 U de rhEpo una vez por semana.

2.5.3 La eritropoyetina y su receptor en tejidos no eritroides

Como se ha mencionado, la Epo y su receptor se han encontrado en tejidos no eritroides. Por ejemplo, en el útero, las células endoteliales expresan al Epo-R y la Epo juega un papel muy importante en la angiogénesis del endometrio uterino (Yasuda Y *et al.*, 1998). La producción de la Epo en el útero es dependiente del estradiol 17- β (E2). Entre otros efectos que se han descrito de la Epo sobre células endoteliales se encuentra la inducción de quimiotaxis y proliferación de células derivadas del cordón umbilical (Ribatti D *et al.*, 1999). En los capilares del cerebro, la Epo induce mitosis en las células endoteliales de una forma dosis dependiente. En etapas post-natales, la Epo induce la neovascularización promoviendo la movilización de células precursoras endoteliales así como previniendo el daño celular y la fragmentación del ADN. Luego de un evento isquémico, en los vasos sanguíneos del cerebro se observa un aumento en la expresión de Epo y su receptor, lo que contribuye a la formación de nuevos vasos en el área que sufre hipoxia. La expresión de Epo y su receptor

en células endoteliales podría deberse a que estas células provienen al igual que las células hematopoyéticas, del mismo precursor mesenquimal, el hemangioblasto. En tejido cardíaco, la Epo induce la proliferación de los miocitos de rata (Wald MR *et al.*, 1996) y ha tenido efectos protectores sobre la muerte inducida por antraciclina como la doxorubicina (Fu P, Arcasoy MO 2007). En conejos, la administración de rhEpo protege de las consecuencias de una oclusión coronaria (Rafiee P *et al.*, 2005). También hay trabajos en los que se ha encontrado que la rhEpo protege los riñones de la rata de eventos isquémicos y de lesiones provocadas por la reperfusión que se da luego de ésta (Moeini M *et al.*, 2013). En los enterocitos también se han encontrado receptores funcionales y en estudios *in vitro* la Epo estimula la migración de estas células (Juul SE *et al.*, 2001). Los efectos *in vivo* de la Epo en estas células incluyen la protección y una recuperación más rápida luego de lesiones necrotizantes en los intestinos (Shiou SR *et al.*, 2011).

2.5.3.1 La Eritropoyetina y su receptor en el sistema nervioso

Desde que comenzó el uso de la rhEpo como tratamiento de los pacientes que padecían anemia a consecuencia de fallas renales, los médicos reportaban mejorías en las funciones cognitivas de estos pacientes (Briggs WA, Gimenez LF 1994). Al principio se pensó que esto se debía al incremento en la concentración de glóbulos rojos que traía como consecuencia un aumento en la concentración de oxígeno en la sangre y por lo tanto una mejor oxigenación del cerebro. Hasta el año 2000 se pensaba que la Epo que se producía en el riñón, o que era administrada subcutáneamente era incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica intacta debido a su gran tamaño (Buemi M *et al.*, 2000), por lo que hasta ese momento se descartó la posibilidad de que la Epo tuviera un efecto directo sobre las células nerviosas. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que la Epo administrada subcutáneamente es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (Ehrenreich H *et al.*, 2004, Kim YJ *et al.*, 2010) al parecer mediante transcitosis pues las células endoteliales expresan al Epo-R. Estas observaciones provocaron que se comenzara a estudiar si las células nerviosas expresaban al Epo-R, eran capaces de producir su propia Epo y si la Epo tenía algún efecto en dichas

células. Se ha encontrado que los distintos tipos celulares del tejido nervioso producen Epo y expresan a su receptor. En los humanos se ha encontrado que las neuronas, la glia y las células endoteliales producen Epo y expresan el Epo-R (Sirén AL *et al.*, 2001). La expresión de la Epo y del Epo-R cambian a lo largo del desarrollo del sistema nervioso, lo que señala un papel importante durante el neurodesarrollo. Conforme la edad gestacional incrementa, la expresión del Epo-R disminuye (Juul SE *et al.*, 1998). Las células neuroepiteliales indiferenciadas expresan por igual Epo y Epo-R, pero conforme avanza el desarrollo, la expresión del Epo-R se da principalmente en neuronas, mientras que la Epo se produce principalmente en los astrocitos. En los mamíferos, el ARNm tanto de la Epo como de su receptor se encuentra principalmente en las células del hipocampo, la corteza, la capsula interna y el mesencéfalo. En cultivos hechos con células progenitoras neuronales de rata, la producción de Epo aumenta en condiciones de hipoxia y se producen de dos a tres veces más neuronas, lo que señala que la Epo tiene efecto sobre la proliferación y diferenciación neuronal (Shingo T *et al.*, 2001). Además se ha encontrado que la Epo posee propiedades neuroprotectoras en condiciones de isquemia (Ehrenreich H *et al.*, 2002), neurotoxicidad (Kumral A *et al.*, 2005), excitotoxicidad (Kawakami M *et al.*, 2001) o estrés metabólico (Sirén AL *et al.*, 2001). La Epo producida en el cerebro es ligeramente más pequeña que la que se encuentra en circulación y además es más activa a bajas concentraciones. Lo anterior se debe a la sialilación de la molécula (Masuda S *et al.*, 1994). En el cerebro, la hipoxia no es el único estímulo que induce la producción de Epo, también la hipoglucemia o una elevada producción de especies reactivas de oxígeno. En todos los casos, la expresión se da por la activación de HIF-1 principalmente o bien, HIF-2. HIF-1 en el cerebro se encuentra principalmente en neuronas, mientras que HIF-2 en células gliales (Wiesener MS *et al.*, 2003). En estudios hechos en ratones, se encontró que el aumento en la expresión del ARNm de la Epo luego de condiciones hipóxicas es más lento en el cerebro que en los riñones. En los riñones, la máxima expresión se alcanza a las 2 horas de hipoxia continua, mientras que en el cerebro, se requieren 4 horas. Sin embargo, en el riñón, a las 8 horas la expresión ha disminuido a solo un 30% mientras que en el cerebro se mantiene en el máximo nivel por 24

horas (Chikuma M *et al.*, 2000). Por sus propiedades, la Epo se ha convertido en un candidato atractivo a ser utilizada como neuroprotector luego de una embolia, como tratamiento en distintas patologías como el Parkinson, la esquizofrenia, la epilepsia, la esclerosis múltiple, la neuropatía diabética o la degeneración de la retina. En estudios realizados en roedores, la Epo ha mostrado un papel benéfico en el tratamiento de algunas de las patologías mencionadas anteriormente (Genc S *et al.*, 2001, Ehrenreich H *et al.*, 2004, Brines ML *et al.*, 2000, Diem R *et al.*, 2005).

2.5.3.1.a La eritropoyetina y su receptor en el sistema nervioso central

Se ha encontrado que la Epo tiene diversos efectos en las células del cerebro. Por ejemplo, puede proteger a las células neuronales de la muerte por exceso de glutamato (Digicaylioglu M, Lipton SA 2001). En las neuronas la Epo induce un aumento de las proteínas anti-apoptóticas XIAP y Bcl-2, lo que resulta en una disminución en la activación de caspasas. Un hecho muy importante es que al parecer en las neuronas no es necesaria la participación de STAT5 para que la Epo tenga efectos protectores (Digicaylioglu M, Lipton SA 2001). También está involucrada en funciones neurológicas complejas como la transmisión sináptica (Weber A *et al.*, 2002), mayor tolerancia al dolor (Campana WM, Myers RR 2003), mejor respuesta al miedo (Miu AC *et al.*, 2004), mejora en las funciones cognitivas (Ehrenreich H, Sirén AL 2001) y un mejor desempeño en la navegación espacial (Sadamoto Y *et al.*, 1998). Aunque los mecanismos específicos de estos efectos son poco claros, se piensa que pueden deberse en parte a la capacidad que se ha encontrado que tiene la Epo de activar canales de calcio en las neuronas e inducir la liberación de neurotransmisores como la dopamina y la activación de la vía MAPK (Koshimura K *et al.*, 1999). También se ha encontrado que la Epo induce la diferenciación de precursores neuronales a neuronas dopaminérgicas (Studer L *et al.*, 2000) y puede provocar la producción de progenitores neuronales en condiciones de hipoxia (Shingo T *et al.*, 2001). La Epo tiene además funciones anti-inflamatorias luego de un evento isquémico pues se ha encontrado reduce el reclutamiento de microglia en el área infartada (Villa P *et al.*, 2003). En cultivos de microglia de rata, la Epo favorece la supervivencia de

estas células activando a Bcl2 (Vairano M *et al.*, 2002). En cuanto a la glia, se ha encontrado que la Epo induce la proliferación de astrocitos de rata *in vitro* (Sugawa M *et al.*, 2002). En los astrocitos también estimula a la glutatión-peroxidasa, lo que ayuda a reducir los niveles de especies reactivas al oxígeno que son neurotóxicas. Los astrocitos son los principales productores de Epo en el cerebro (Masuda S *et al.*, 1994). Esta producción se estimula por eventos hipóxicos o por el estímulo con insulina y factores de crecimiento de tipo insulina (IGFs) (Masuda S *et al.*, 1997). En los oligodendrocitos, la expresión del Epo-R se ha encontrado en células O4 positivas, que corresponden a oligodendrocitos inmaduros, y se ha encontrado que la Epo tiene un papel en la maduración de estas células (Sugawa M *et al.*, 2002). En resumen, en cuanto a las células del sistema nervioso central, se ha encontrado que la Epo induce proliferación y supervivencia de células gliales y también puede modular el reclutamiento de la microglia, lo que en algunos casos podría participar en la protección neuronal.

2.5.3.1.b La eritropoyetina y su receptor en el sistema nervioso periférico

En el nervio ciático de la rata, la expresión de Epo aumenta luego de una lesión, principalmente en las células de Schwann (Campana WM, Myers RR 2001). En este tipo de lesiones, se producen citocinas inflamatorias como el TNF- α , pero en animales que reciben rhEpo, la producción de esta citocina por las células de Schwann disminuye y se asocia con una recuperación más rápida y con una degeneración axonal menor (Campana WM *et al.*, 2006). También se ha reportado que la rhEpo administrada sistémicamente protege a las neuronas sensoriales involucradas en la transmisión de dolor y a la glia periférica cuando hay lesiones en los nervios espinales, inhibiendo la apoptosis de las células satélite y las neuronas sensoriales (Campana WM, Myers RR 2003). En resumen, las neuronas del sistema nervioso periférico y las células de Schwann expresan el Epo-R y una cantidad baja de Epo que aumenta luego de una lesión. Cuando se expone a cultivos de células obtenidas a partir de ganglios espinales (también llamados ganglios de raíces dorsales) a neurotoxinas como la proteína gp120, glicoproteína de la envoltura del VIH (virus de inmunodeficiencia humana) o

al antiretroviral ddC que se sabe causan neuropatías periféricas, la expresión de Epo aumenta en las células de Schwann que están en la periferia de las neuronas y es secretada al medio. Si los cultivos se hacen exclusivamente de células de Schwann, las neurotoxinas no inducen la expresión de Epo. Lo anterior sugiere que las neuronas dañadas son las que envían el estímulo a las células de Schwann para producir Epo (Keswani SC *et al.*, 2004).

2.5.4 La eritropoyetina y su receptor en tejido tumoral

La expresión de Epo, así como la de su receptor se ha encontrado también en tejido de origen tumoral de distintos tipos. Tejido tumoral de vejiga, mama, ovario, utero, endometrio, tracto gastrointestinal, cabeza y cuello, riñón, hígado, pulmón, piel, prostata, páncreas, sistema nervioso (como glioblastomas y meduloblastomas por ejemplo), tiroides, así como sarcomas y leucemias expresan Epo, Epo-R o ambos (Hardee ME *et al.*, 2006). La expresión de la Epo es inducible por hipoxia en la mayoría de los casos. En el año 2003, se publicaron los primeros resultados de estudios en los que se encontró que la administración de rhEpo a pacientes con cáncer de mama no había sido favorable. De hecho, el estudio tuvo que ser interrumpido antes de tiempo debido a la alta mortalidad que se presentó en el grupo de pacientes que recibió rhEpo en conjunto con la quimioterapia (Leyland-Jones B 2003). Ese mismo año, se reportó que pacientes con cáncer de cabeza y cuello que habían recibido rhEpo antes de su tratamiento de radioterapia tuvieron peores resultados que los pacientes que no recibieron la rhEpo (Henke M *et al.*, 2003). A partir de ahí comenzaron a surgir varios reportes más en donde la expresión de Epo o su receptor, así como la administración de rhEpo en pacientes con tumores sólidos de distinto origen (entre los que se encuentran tumores cervicales, mamarios y pulmonares) se asociaba a un peor pronóstico, a tumores más agresivos, a una respuesta pobre al tratamiento y a un aumento en la mortalidad (Temkin SM *et al.*, 2006, Saintigny P *et al.*, 2007, Larsson AM *et al.*, 2009). Además comenzaron a surgir reportes de estudios hechos en líneas celulares de tumores cervicales, ováricos (Solar P *et al.*, 2008), renales (Li J *et al.*, 2007) y de melanoma (Mirmohammadsadegh A *et al.* 2010), en los que la rhEpo disminuía la muerte inducida por la

radiación ionizante y distintos fármacos como los compuestos de platino (cisplatino y carboplatino) y taxanos (paclitaxel). Se ha encontrado que lo anterior es debido a que la rhEpo puede inducir la activación de vías como PI3K/AKT y MAPK así como un aumento en la expresión de moléculas anti-apoptóticas como Bcl-xL en la mayoría de los casos tal y como lo hace en los progenitores eritroides (*Hardee ME et al., 2006, Solar P et al., 2008*). Todos estos trabajos han llevado a que se ponga en duda si la administración de rhEpo en pacientes con cáncer es segura. Tal y como ocurre de manera normal en los progenitores eritroides de personas sanas, en algunas líneas celulares de cáncer de colon, pulmón, próstata, mama y ovario, así como en biopsias de tumores primarios se han descrito isoformas del Epo-R. Se han descrito 3 formas incompletas en la región citoplásmica del Epo-R y 2 formas solubles. Las formas solubles son secretadas al medio (*Arcasoy MO et al., 2003*). Esto podría modular los efectos de la Epo en dichas células pues como se mencionó anteriormente, los receptores incompletos o solubles, no inducen señalización después de la captación de Epo.

2.5.4.a La Eritropoyetina y su receptor en neuroblastomas

En la línea celular derivada de un neuroblastoma humano SH-SY5Y, se ha reportado que la Epo protege de la muerte inducida por Estaurosporina y TNF- α aumentando la expresión de Bcl-2 y Bcl-x. Si las mismas células se diferencian a neuronas con ácido retinóico, el efecto protector de la Epo se pierde, esto al parecer debido a que el tratamiento con ácido retinóico induce una disminución en la expresión del Epo-R en estas células (*Wenker SD et al., 2010*). Los efectos protectores de la Epo son dependientes de la activación de JAK2 y de la vía PI3K/AKT. En los neuroblastomas, se asocia el incremento en la vascularización con la progresión de la enfermedad. Los tumores con alta vascularización correlacionan con el desarrollo de metastasis, pronóstico pobre y biología tumoral agresiva. Se ha encontrado que la densidad microvascular en los neuroblastomas está relacionada con un aumento en la expresión de Epo y Epo-R conforme avanzan las etapas de la enfermedad (*Ribatti D et al., 2007*).

➤ JUSTIFICACIÓN ➤

III. JUSTIFICACIÓN

La Epo es una citocina producida principalmente en el riñón cuya función es la de inducir la proliferación y la diferenciación celular de los progenitores eritroides en la médula ósea. Debido a esto, se utiliza eritropoyetina recombinante humana (rhEpo) para corregir la anemia, condición que afecta comúnmente a los pacientes con cáncer. Sin embargo, hoy se sabe que el Epo-R que se creía exclusivo de los progenitores eritroides se expresa también en otros tejidos entre los que se encuentra el riñón (Westenfelder C *et al.*, 1999). Cuando la Epo se une a su receptor, se activan vías de señalización como JAK/STAT, PI3K/AKT y MAPK que pueden proteger a las células de la muerte o inducir su proliferación. En el riñón por ejemplo, la Epo puede proteger a las células de la muerte por isquemia (Zou YR *et al.*, 2016) y podría proteger a las células de la muerte que inducen como efecto secundario dos de los fármacos empleados para tratar los neuroblastomas en nuestro país, el etopósido y la vincristina, lo que permitiría que las dosis empleadas fueran las óptimas para tratar los tumores sin provocar nefrotoxicidad en los pacientes. Sin embargo, el Epo-R también ha sido identificado en tejido tumoral de distinto origen, incluidos los neuroblastomas (Batra S *et al.*, 2003). Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es determinar si la rhEpo puede proteger a las células sanas de riñón de la muerte inducida por etopósido y vincristina sin que disminuya la muerte de las células de neuroblastoma lo que permitiría su uso no únicamente para corregir la anemia de forma segura en los pacientes, sino también proteger los tejidos sanos que son afectados durante los tratamientos de quimioterapia.

» OBJETIVOS «

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la rhEpo sobre la muerte inducida por etopósido y vincristina y las vías de señalización implicadas en células de riñón embrionario humano y en células derivadas de neuroblastomas humanos.

4.1.1 Objetivos particulares

- Determinar la expresión del Epo-R en líneas celulares derivadas de riñón embrionario humano y de neuroblastomas humanos.
- Evaluar la activación del Epo-R en las líneas celulares.
- Determinar la expresión de Epo en las mismas líneas celulares.
- Evaluar el efecto de la rhEpo sobre la proliferación celular.
- Determinar la DL 50 de etopósido y vincristina para cada línea celular.
- Evaluar el efecto de la rhEpo sobre la muerte inducida por etopósido y vincristina.
- Estudiar la activación de las vías JAK/STAT, PI3K/AKT y MAPK mediada por rhEpo en las distintas líneas celulares.
- Determinar el papel de las vías de señalización en el efecto de la rhEpo.

☞ METODOLOGÍA ☞

V. METODOLOGÍA

5.1 CULTIVOS CELULARES

Las líneas celulares HEK293 (riñón embrionario humano), HeLa (carcinoma cervical humano) y HepG2 (carcinoma hepático humano) se cultivaron en medio DMEM (In vitro S.A) con 10% de suero fetal de bovino inactivado (ByProductos S.A de C.V) y 1% de una solución de penicilina-estreptomicina (10,000 U/mg/ml) (In vitro, S.A). La línea celular MSN (neuroblastoma humano) se cultivó en medio RPMI/F12 1:1 (In vitro S.A) con 15% de suero fetal de bovino inactivado y 1% de penicilina-estreptomicina (10,000 U/mg/ml). La línea SK-N-MC (neuroblastoma humano) se cultivó en medio MEM (In vitro S.A) mientras que la línea SK-N-AS (neuroblastoma humano) se cultivó en DMEM (In vitro S.A) adicionado con 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (In vitro S.A), ambas con 10% de suero fetal de bovino inactivado y los antibióticos que se mencionó anteriormente. Por último, la línea celular K562 (leucemia mieloide humana) se mantuvo en medio RPMI (In vitro S.A) con 10% de suero fetal bovino inactivado y antibióticos. Todas las líneas celulares se mantuvieron en incubación a 37°C de temperatura y 5% de CO₂.

5.2 EXTRACCIÓN DE ARN

Se utilizó el kit Qiagen RNeasy. Brevemente: Las células se lavaron 2 veces con solución Hank's y se desprendieron con una solución de tripsina-verseno 0.05%/0.05% (In vitro S.A). Se cosecharon 3×10^6 células a las que se agregaron 350 μ l del buffer de lisis (RLT). Se resuspendió vigorosamente y el homogenado se colocó en una columna para extracción de ADN que se centrifugó a 10,000 rpm por 30 segundos. Posteriormente, se agregaron 350 μ l de etanol al 70% al sobrenadante y el homogenado se trasladó a una columna para extracción de ARN. Se centrifugó por 15 segundos a 10,000 rpm y se desechó el sobrenadante. A la misma columna se agregaron 700 μ l de buffer RW1 y se centrifugó por 15 segundos a 10,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se agregaron 500 μ l del buffer RPE a la misma columna. Se centrifugó por 2 minutos a 10,000 rpm y se repitió el proceso una

segunda ocasión. Finalmente, se agregaron 40 µl de agua libre de RNasas a la columna y se centrifugó 1 minuto a 10,000 rpm para coleccionar el ARN. La concentración de ARN se obtuvo leyendo la absorbancia de 2 µl de muestra a 260 nm en un NanoDrop™ 3300.

5.3 RT-PCR

Se utilizó el kit Qiagen One-step RT-PCR. Se utilizaron 50 ng de ARN y los primers se utilizaron a una concentración final de 0.6 µM. Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes: Para Epo f: 5'-ACT CTG CTT CGG GCT CTG GGA GCC CAG AAG-3' y Epo r: 5'-AAG CAA TGT TGG TGA GGG AGG TGG TGG AT-3', para Epo-R f: 5'-GGC AGT GTG GAC ATA GTG GC-3' y Epo-R r: 5'-AGC AGG ATG GAT TGG GCA GA-3', y por último, como control interno β-actina f: 5'-GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG-3' y β-actina r: 5'-GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG-3'. La transcripción reversa se llevó a cabo a 50°C por 30 minutos. El protocolo para la amplificación por PCR fue de 15 minutos a 95°C seguida de 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C. Finalmente, 10 minutos a 72°C para la extensión. Para evaluar Epo, Epo-R y β-actina se corrieron 5 µl de la reacción final en un gel de agarosa (Sigma) al 1%. Los gels fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio (Gibco) 0.5mg/ml por 15 minutos.

5.4 LISADO CELULAR Y WESTERN BLOT

Para la obtención de proteínas membranales exclusivamente, las células se lisaron en un buffer que contenía 50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 1% de NP40, 0.5% de ácido deoxicólico, 1ml/100ml cocktail de inhibidores de fosfatasa (Sigma) y 40 µl/ml del cocktail de inhibidores de proteasas de Roche preparado según instrucciones del fabricante. El lisado se centrifugó 90 minutos a 4°C a 13,000 rpm. El sobrenadante, correspondiente a la fracción soluble, se guardó para usos posteriores. El pellet, correspondiente a la fracción membranal, se resuspendió en 200 µl del buffer de lisis mencionado anteriormente. Para la obtención de proteína total, las células se lisaron con buffer RIPA a 4°C en agitación por 15 minutos. El lisado se centrifugó por 10 minutos a 5,000 rpm y el sobrenadante se almacenó a -80 °C

hasta su utilización. Para la inmunodetección se tomaron 30 µg de lisado protéico que se sometieron a separación por SDS-PAGE al 8% o 10% según la proteína a estudiar. Luego de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de polivinilidenofluorido (PVDF). La membrana se bloqueó durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente con leche en polvo sin grasa al 5% en TBS-Tween (BioRad) al 0.1%. Posteriormente se incubó con el anticuerpo contra Epo-R (Sigma), STAT5, STAT5 (phospho Tyr694), AKT1+2+3, AKT1 (phospho Ser473), ERK1/2, ERK (phospho Thr185+Thr202+Tyr204+Tyr187), caspasa 3 (activa), HIF1 α , TrkA, NeuN o GAPDH (GeneTex Inc.) diluidos 1:1000 en solución de bloqueo. Los anticuerpos se dejaron actuar toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó 3 veces (10 minutos cada una) con TBS-Tween 0.1% y posteriormente se incubó por 90 minutos a temperatura ambiente con un anticuerpo anti-cabra para Epo-R y anti-conejo para el resto de anticuerpos acoplado a peroxidasa (Zymed) que se diluyó 1:5000 en solución de bloqueo. El anticuerpo secundario se detectó por quimioluminiscencia (Immobilon Western kit, Millipore, USA) luego de lavar 3 veces (10 minutos cada una) con TBS-Tween 0.1%. Para la inmunoprecipitación, 150 µg de lisado protéico se incubaron con perlas de agarosa A (Santa Cruz Biotechnology) que previamente habían sido acopladas con el anticuerpo para Epo-R (Sigma). Luego de la separación por SDS-PAGE al 10%, se determinó la fosforilación del Epo-R utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina (clone 4G10) (Millipore, USA) hecho en ratón que se detectó por quimioluminiscencia como se describió previamente.

5.5 TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA

Con el fin de detectar cambios morfológicos en las células luego del tratamiento con ácido retinoico y NGF, las células se cultivaron sobre cubre-objetos y cuando alcanzaron el 90% de confluencia se retiró el medio de cultivo y se lavaron con PBS. Posteriormente se fijaron 10 minutos en etanol al 96% a 4°C. El etanol se lavó con agua desionizada y se incubó a las muestras por 2 minutos con hematoxilina (BioRad). Se lavó 10 veces con hidróxido de amonio al 0.084% y 2 veces con agua desionizada. Posteriormente se incubó con eosina

(Biocare Medical) por 30 segundos luego de los cuales se lavó con agua desionizada 2 veces para finalmente cubrir con el medio de montaje (Biocare Medical).

5.6 INMUNOCITOQUÍMICA

Para determinar si las células producían su propia Epo, cultivos en placas de 6 pozos al 90% de confluencia se fijaron 10 minutos en acetona a -20°C . Luego de lavarlas con PBS, se incubaron 30 minutos con albumina (Santa Cruz Biotechnology) al 1% en PBS-Tween 0.1% (BioRad). Posteriormente, las células se incubaron toda la noche a 4°C con un anticuerpo contra Epo (Sigma) diluido 1:100 en PBS-Tween. Luego de lavar con PBS, las muestras se incubaron 2 horas a 37°C con un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa (Invitrogen) y diluido 1:500. Transcurrido este tiempo, las muestras se incubaron con el cromógeno DAB (Biocare Medical), se lavaron con agua y se contra-tiñeron con hematoxilina (BioRad).

5.7 ENSAYOS DE MTT

Para evaluar la viabilidad celular se disolvió el 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-bromuro de tetrazolio (MTT) (Sigma) en PBS (1 mg/ml). Transcurrido el tiempo del ensayo que se deseaba evaluar, se retiró el medio en el que estaban las células y se agregaron 100 μl de medio fresco y 50 μl de la solución de MTT. Se dejó incubar por 2 horas en atmósfera húmeda a 37°C con 5% de CO_2 . Transcurrido este tiempo, se retiró ese medio y se agregaron 100 μl de isopropanol para disolver los cristales de formazán formados. Se leyó la absorbancia a 570 nm en un lector para placas Biotek ELx800.

5.8 ENSAYOS DE ESTIMULACIÓN CON EPO

Se utilizó eritropoyetina recombinante humana (rhEpo) de los laboratorios Pisa (Exetin-A). Las células se sembraron en medio con suero fetal bovino inactivado (57°C por 30 minutos) a una concentración de 12,000 células/pozo en placas de 96 y se dejaron pegar por 2 horas. Pasado este tiempo, se estimuló a las células con concentraciones crecientes de rhEpo

(Exetin-A) (0.01, 0.05, 0.5, 1, 10, 50 U/ml). Cada 24 horas se renovó la rhEpo. A las 48 horas se realizó una prueba de MTT para evaluar la viabilidad celular.

5.9 DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIADA POR EPO

Se utilizó el kit Click-iT EdU Alexa Fluor 647 Imaging Kit de Invitrogen. Brevemente: Las células se sembraron en cubreobjetos en placas de 24 pozos a una densidad de 100,000/pozo que se dejaron pegar por dos horas. Transcurrido este tiempo, se estimuló con 10U/ml de rhEpo. A las 24 horas, se renovó al rhEpo. Como control, se adicionó medio de cultivo fresco. A las 42 horas, se agregó el 5-etinil-2 deoxiuridina (EdU) a una concentración final de 10 μ M que se dejó actuar por 6 horas. Pasado este tiempo, se retiró el medio de cultivo y se fijaron las células con formaldehído al 3.7% en PBS que se dejó actuar 15 minutos a temperatura ambiente. La solución fijadora fue retirada y las células se lavaron dos veces con BSA al 3% en PBS. Posteriormente se permeabilizó a las células con Tritón X-100 al 0.5% en PBS que se dejó actuar por 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente dos veces con BSA 3% en PBS y se agregó el cocktail que contenía CuSO₄ y azida Alexa Fluor que se preparó en el buffer contenido en el kit según las indicaciones del fabricante. Éste se dejó actuar por 30 minutos a temperatura ambiente siempre protegido de la luz. Posteriormente se lavó dos veces y por último se tiñeron los núcleos con Hoechst 33342 a una concentración de 5 μ g/ml preparado en PBS que se dejó actuar por 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Los cubreobjetos se cubrieron con medio de montaje Dako y se analizaron en el microscopio de fluorescencia. De cada muestra se seleccionaron 5 áreas al azar. De cada área, se contaron las células que habían incorporado EdU con Alexa Fluor 647 y que por lo tanto se observaban anaranjadas (positivas) de cada 100 células. Se sacó un promedio y el porcentaje promedio de células positivas es lo que se reportó en los resultados.

5.10 DETERMINACIÓN DE LAS DOSIS LETALES DE LOS QUIMIOFÁRMACOS

Para determinar la dosis letal 50 (DL 50) de los quimiofármacos, se sembraron 40,000 células/pozo en placas de 96 pozos. Después de dos horas de incubación, se añadieron concentraciones crecientes de los fármacos en un rango desde 0.1 µg/ml hasta 100 µg/ml. Se realizó una prueba de MTT a las 24 horas para obtener el porcentaje de viabilidad celular que había luego del tratamiento con cada dosis. Los datos se sometieron a una regresión lineal en el programa Excel (Microsoft) y con base a la ecuación obtenida se calculó la DL 50 de etoposido y vincristina para cada una de las líneas celulares.

5.11 ENSAYOS DE PROTECCIÓN CON EPO

Las células se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 40,000/pozo. Después de 2 horas de incubación se estimularon con diferentes concentraciones de rhEpo (Exetin-A, Pisa) (0.01 - 100 U/ml) que se dejó actuar 2 horas para posteriormente agregar la DL 50 de cada uno de los fármacos que había sido calculada previamente. A las 24 horas del tratamiento se realizó una prueba de MTT para evaluar la viabilidad celular.

5.12 ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR EPO

5.12.1 Inhibición de JAK 2

Se sembraron 50,000 células / pozo en placas de 96 que se dejaron adherir por 3 horas. Transcurrido este tiempo, se pre-incubó con el inhibidor de JAK2 AG490 (Tirfostina) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 50 µM por dos horas. Posteriormente se adicionaron 10 U/ml de rhEpo y luego de dos horas, se agregó la DL 50 de los quimiofármacos. A las 24 horas, se realizó un ensayo de MTT para evaluar la viabilidad celular. Para extracción de proteína, las

células se sembraron en cajas de 100mm y al alcanzar 80% de confluencia recibieron los tratamientos con las dosis señaladas previamente de inhibidor, rhEpo y el fármaco correspondiente. A las 24 horas se extrajo la proteína total como se mencionó con anterioridad.

5.12.2 Inhibición de PI3K

Se sembraron 50,000 células / pozo en placas de 96 pozos que se dejaron pegar por 3 horas. Transcurrido este tiempo, se pre-incubó con el inhibidor de PI3K wortmanina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 100 nM por 30 minutos. Posteriormente se adicionaron 10 U/ml de rhEpo y luego de dos horas, se agregó la DL 50 de los quimiofármacos. A las 24 horas, se realizó un ensayo de MTT para evaluar la viabilidad celular. Para extracción de proteína, las células se sembraron en cajas de 100 mm y al alcanzar 80% de confluencia recibieron los tratamientos con las dosis señaladas. A las 24 horas se extrajo la proteína total como se mencionó previamente.

5.12.3 Inhibición de MEK 1/2

Se sembraron 50,000 células / pozo en placas de 96 pozos que se dejaron pegar por 3 horas. Transcurrido este tiempo, se pre-incubó con el inhibidor de MEK1/2 U0126 (monoetanolato) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 20 μ M por una hora. Posteriormente se adicionaron 10 U/ml de rhEpo y luego de dos horas, se agregó la DL 50 de los quimiofármacos. A las 24 horas, se realizó un ensayo de MTT para evaluar la viabilidad celular. Para extracción de proteína, las células se sembraron en cajas de 100mm y al alcanzar 80% de confluencia recibieron los tratamientos como se indicó previamente. A las 24 horas se extrajo la proteína total como se mencionó.

5.13 INDUCCIÓN DE HIPOXIA EN CULTIVOS CELULARES

Se utilizó la técnica descrita por Pitts y Toombs (2004). Brevemente: Se sembraron 1×10^6 células/pozo en placas de 6 pozos y cuando los cultivos alcanzaron el 80% de confluencia se colocó un cubreobjetos sobre una región de la monocapa del cultivo. Esto crea una región hipóxica en la que el cubreobjetos sirve como barrera para la libre difusión de oxígeno y nutrientes. A las 24 horas se colectaron las células para extracción de ARN.

5.14 DIFERENCIACIÓN A LINAJE NEURONAL CON ÁCIDO RETINOICO Y NGF

Las células se cultivaron durante 7 días en el medio indicado para cada línea celular adicionado con ácido retinoico $10 \mu\text{M}$ (Sigma), 50 ng/ml de factor de crecimiento nervioso (NGF) (Peprotech) o ambos. El medio se renovó cada tercer día.

5.15 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistica ver. 6 (Statsoft). Los datos se analizaron mediante una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas si $P < 0.05$.

RESULTADOS

VI. RESULTADOS

6.1 EXPRESIÓN DEL EPO-R

El primer objetivo de este trabajo fue determinar si las líneas celulares HEK293 y MSN expresaban al Epo-R. Primero se determinó mediante RT-PCR si dichas células expresaban el gen del receptor. Como control positivo se utilizó la línea celular K562 que proviene de una eritroleucemia humana y se sabe que expresa al Epo-R silvestre. Como control negativo se utilizó agua ultrapura en lugar de ARN. Como se puede apreciar en la figura 9A, se detectó una banda del peso esperado para Epo-R (497 pb) en las líneas celulares estudiadas. Dicha banda fue idéntica a la obtenida en el control positivo. Como se sabe que para que el Epo-R pueda inducir señalización debe estar presente en la membrana celular, se determinó la expresión del Epo-R mediante Western Blot en extractos de proteína membranal, como controles positivos se utilizaron las líneas celulares K562 y HeLa (carcinoma cervical humano) pues en nuestro laboratorio ya se había detectado la presencia del Epo-R en esta línea celular así como su funcionalidad. Tanto en la línea celular HEK293 como en MSN, se obtuvo una banda específica con un peso de aproximadamente 60 kDa, como la que se detectó en los controles y que corresponde al peso del Epo-R completo que puede anclarse a la membrana celular (Fig. 9B). Cuando el Epo-R se activa luego de la unión de su ligando, éste se fosforila por la acción de las moléculas de JAK2 que se encuentran asociadas a él. Por lo anterior, se verificó si el receptor encontrado en las células HEK293 y MSN se activaba luego de la estimulación con Epo exógena. Para esto, se estimuló a las células con 10 U/ml de rhEpo y se analizó mediante Western Blot la fosforilación del Epo-R. Como se observa en la figura 9C, en las células HEK293 la fosforilación del EPO-R es clara a los 60 segundos de estímulo con rhEpo. En contraste, en las células MSN el Epo-R está constitutivamente fosforilado y el nivel de fosforilación aumenta a los 30 segundos de incubación con rhEpo.

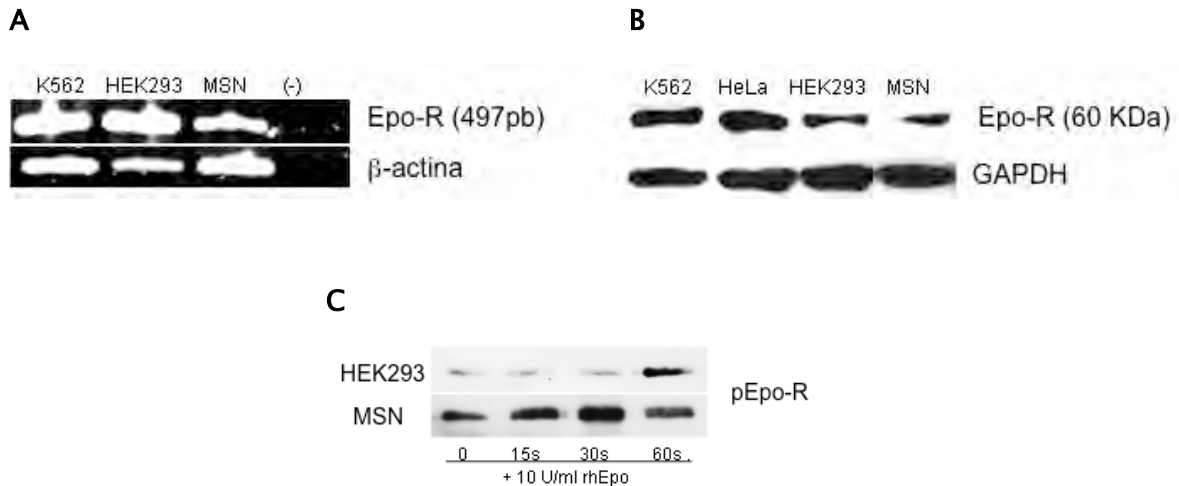


Figura 9. A) Expresión del gen Epo-R. Se realizó RT-PCR con el ARN total que se extrajo de las líneas celulares K562, HEK293 y MSN utilizando oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 497 pb del gen del Epo-R. Como control interno se amplificó un fragmento del gen de β -actina. **B) Expresión de la proteína Epo-R.** Se obtuvieron lisados de proteína membranal de las células K562, HeLa, HEK293 y MSN. 30 μ g de proteína se sometieron a SDS-PAGE. Luego de esto, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se incubaron con un anticuerpo contra Epo-R (Sigma) o con un anticuerpo contra GAPDH (Genetex) como control de carga. **C) Fosforilación del Epo-R.** Se inmunoprecipitó al Epo-R en lisados celulares obtenidos de células HEK293 y MSN que habían sido estimuladas con rhEpo por el tiempo indicado. Se realizó SDS-PAGE. Luego de esto, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se incubaron con un anticuerpo contra fosfo-tirosinas (Millipore).

6.2 EXPRESIÓN DE EPO

En varios tipos celulares, incluidas células tumorales y biopsias de neuroblastomas, se ha reportado que además de Epo-R, se expresa Epo (Batra S *et al.*, 2003), por lo que se evaluó que ocurría en las células HEK293 y MSN. Primero se estudió la expresión del gen de Epo mediante RT-PCR (Fig. 10A) y posteriormente, si se encontraba la proteína mediante inmunocitoquímica (Fig. 10B) utilizando como control positivo la línea celular derivada de un hepatocarcinoma humano, HepG2, pues se sabe que estas células producen Epo de manera endógena en condiciones de normoxia (Goldberg M *et al.*, 1987). Como se observa en la figura 10A, las células control HepG2 presentan una banda que corresponde al fragmento amplificado del gen de Epo, mientras que HEK293 y MSN no, lo que señala que estas células no expresan Epo. Lo anterior fue corroborado mediante inmunocitoquímica, en donde como

se observa en la figura 10B, no hubo tinción positiva para Epo en HEK293 ni en MSN, contrario a lo que se observó en el control positivo.

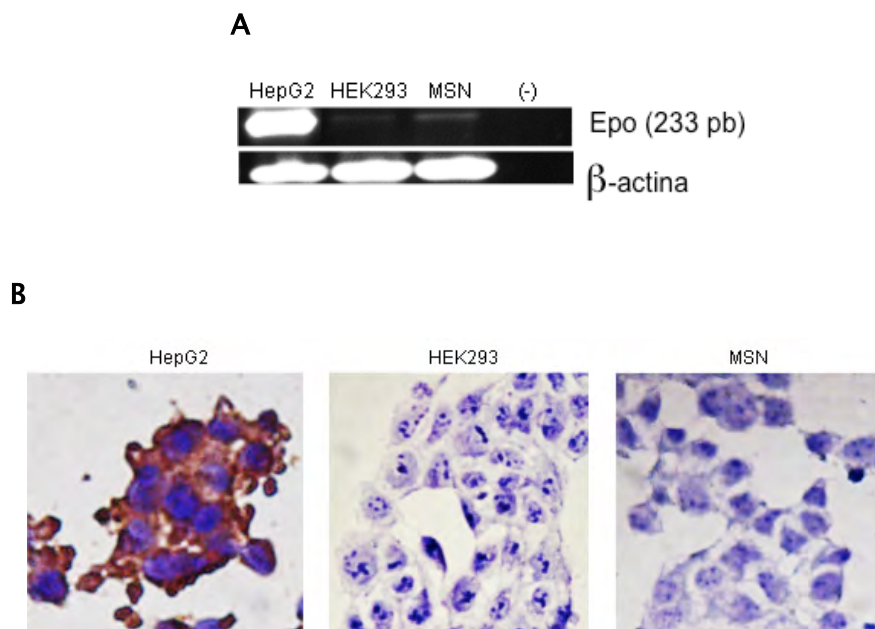


Figura 10. A) Expresión del gen de Epo. Se realizó RT-PCR con el ARN total que se extrajo de las líneas celulares HepG2, HEK293 y MSN utilizando oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 233 pb del gen de Epo. Como control interno se amplificó un fragmento del gen de β -actina. **B) Expresión de la proteína Epo.** Se realizó inmunocitoquímica para estudiar la expresión de Epo en las células HEK293 y MSN. Como control positivo se utilizaron células HepG2.

6.3 EFECTO DE LA EPO SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

Luego de encontrar que las líneas celulares HEK293 y MSN expresaban al Epo-R, se investigó si la estimulación con Epo exógena tenía algún efecto sobre la viabilidad de estas células. Para lo anterior, se estimuló a las células con concentraciones de rhEpo que iban desde 0.01 U/ml hasta 50 U/ml y se evaluó la viabilidad celular a las 48 horas de tratamiento mediante ensayos de MTT. En las células de riñón embrionario HEK293 no hubo efecto significativo de la rhEpo con ninguna de las dosis empleadas ($P > 0.05$) (Fig. 11A). Por el contrario, en las células de neuroblastoma MSN, desde 0.01 U/ml de rhEpo, se observó que el número de células viables aumentaba en un 100% con respecto al control que no había recibido rhEpo ($P = 0.0074$). El máximo porcentaje de células viables se obtuvo con 10 U/ml ($P = 0.0075$). Con 50 U/ml el efecto observado fue menor en comparación con lo que se encontró con dosis

menores ($P = 0.01$), lo que sugiere que con dosis muy altas el Epo-R se satura (Figura 11B). Los resultados obtenidos en los ensayos de MTT en las células MSN sugerían que la rhEpo era capaz de inducir proliferación en estas células, por lo que se decidió determinar si esto ocurría mediante el ensayo de incorporación de 5-etinil-2 deoxiuridina (EdU). Se estimuló a las células con 10 U/ml de rhEpo pues fue la dosis que tuvo mayor efecto de acuerdo a los ensayos de MTT. Se encontró que tal y como sugerían los ensayos de MTT, en las células HEK293 el tratamiento con rhEpo no modificó el porcentaje de células en proliferación (Fig. 11C). Por el contrario, cuando las células MSN se estimularon con rhEpo, el porcentaje de células en fase de proliferación aumentó significativamente de un 3% hasta un 68% (Fig. 11D). Esto señala que la rhEpo tiene efectos proliferativos sobre las células MSN pero no sobre las células HEK293.

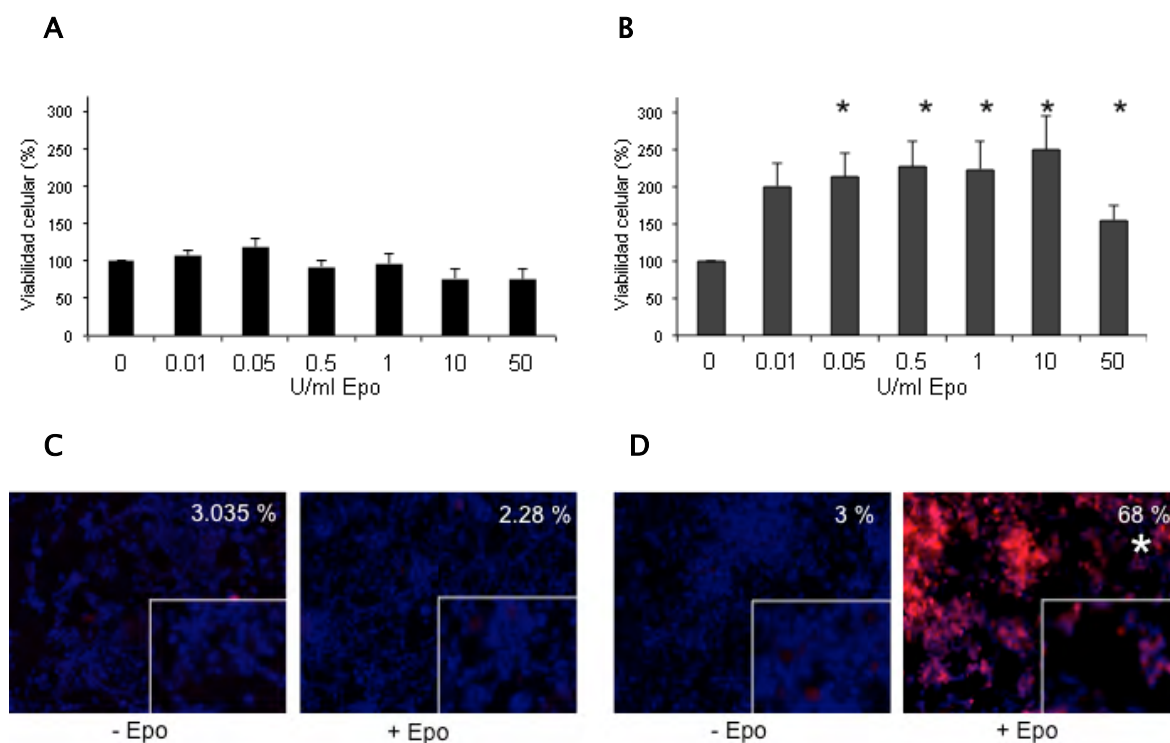


Figura 11. Efecto de la Epo sobre la viabilidad celular. Las líneas celulares HEK293 (**A**) y MSN (**B**), fueron estimuladas con las dosis indicadas de rhEpo. La dosis se renovó cada 24 horas. A las 48 horas se realizó una prueba de MTT para analizar la viabilidad celular. Cada barra representa el promedio de 5 experimentos independientes por triplicado con su desviación estándar. * $P < 0.05$ con respecto al control sin rhEpo. Después, células HEK293 (**C**) y MSN (**D**) fueron estimuladas con 10 U/ml de rhEpo. La dosis se renovó cada 24 horas. A las 42 horas se agregó EdU en una concentración final de $10\mu\text{M}$ que se dejó actuar por 6 horas. El EdU se detectó con azida Alexa Fluor 647. Las muestras se analizaron bajo el microscopio de fluorescencia. Las células en proliferación se observan de color anaranjado. Se promedió el porcentaje de células positivas en 5 áreas distintas de cada muestra seleccionadas al azar. * $P < 0.05$ con respecto al control sin rhEpo.

6.4 DETERMINACIÓN DE LA DL 50

El siguiente objetivo fue determinar la dosis de etopósido y vincristina que inducía la muerte del 50% de las células (DL 50) en los cultivos de HEK293 y MSN. Para esto se expuso a las células a concentraciones crecientes de los fármacos por 24 horas. Luego de este tiempo se evaluó el porcentaje de viabilidad celular por MTT y mediante una regresión lineal se calculó la DL 50. Los resultados para cada fármaco y línea celular se presentan en la tabla 1. Las DL 50 presentadas en la tabla son las que se utilizaron a lo largo de este trabajo.

LÍNEA CELULAR	ETOPÓSIDO μM	VINCRISTINA μM
HEK293	67.9	9.69
MSN	230	18

Tabla 1. Dosis letal 50 determinada para cada línea celular.

6.5 EFECTO DE LA EPO SOBRE LA MUERTE INDUCIDA POR ETOPÓSIDO Y VINCRISTINA

Después de encontrar que la rhEpo inducía proliferación en las células de neuroblastoma sin afectar la proliferación de las células derivadas de riñón embrionario, se evaluó si la rhEpo tenía algún efecto sobre la muerte que induce el etopósido y la vincristina. Para lo anterior, las células se pre-trataron con distintas concentraciones de rhEpo antes de recibir la DL 50 de los fármacos y a las 24 horas se evaluó la viabilidad celular. En el caso de la muerte inducida por etopósido, en la línea celular HEK293 se encontró que únicamente la dosis de 100 U/ml de rhEpo era capaz de inhibir la muerte celular en un 10% ($P = 0.03$) (Fig. 12A). En cambio, en la línea MSN la rhEpo tuvo efectos protectores significativos desde la dosis de 1 U/ml ($P < 0.03$) (Fig. 12B). La protección no fue mayor al 15% con ninguna dosis. Por otro lado, en la muerte inducida por vincristina, la rhEpo no mostró efecto alguno en la línea celular HEK293 (Fig. 12C), pero nuevamente lo tuvo en la línea MSN (Fig. 12D), en donde desde 0.5 U/ml se observaron efectos protectores significativos ($P < 0.03$). La máxima protección se obtuvo con 10 U/ml, y ésta fue de un 30% aproximadamente ($P = 0.000014$). Lo anterior fue reafirmado mediante el estudio de la activación de la caspasa 3 mediante la

evaluación por Western Blot de la expresión del fragmento p17, el cual se origina una vez que la caspasa 3 se activó. En la figura 12E se puede observar como el pre-tratamiento con rhEpo no modifica la activación de la caspasa 3 que inducen el etopósido y la vincristina en las células HEK293. Por el contrario, en las células MSN el pre-tratamiento con rhEpo inhibió la activación de la caspasa 3 inducida por etopósido y vincristina (Fig. 12F), lo que concuerda con lo observado en las pruebas de MTT. Todo lo anterior señala que la rhEpo es capaz de proteger de la muerte inducida por etopósido y vincristina a las células de neuroblastoma pero no a las de riñón embrionario.

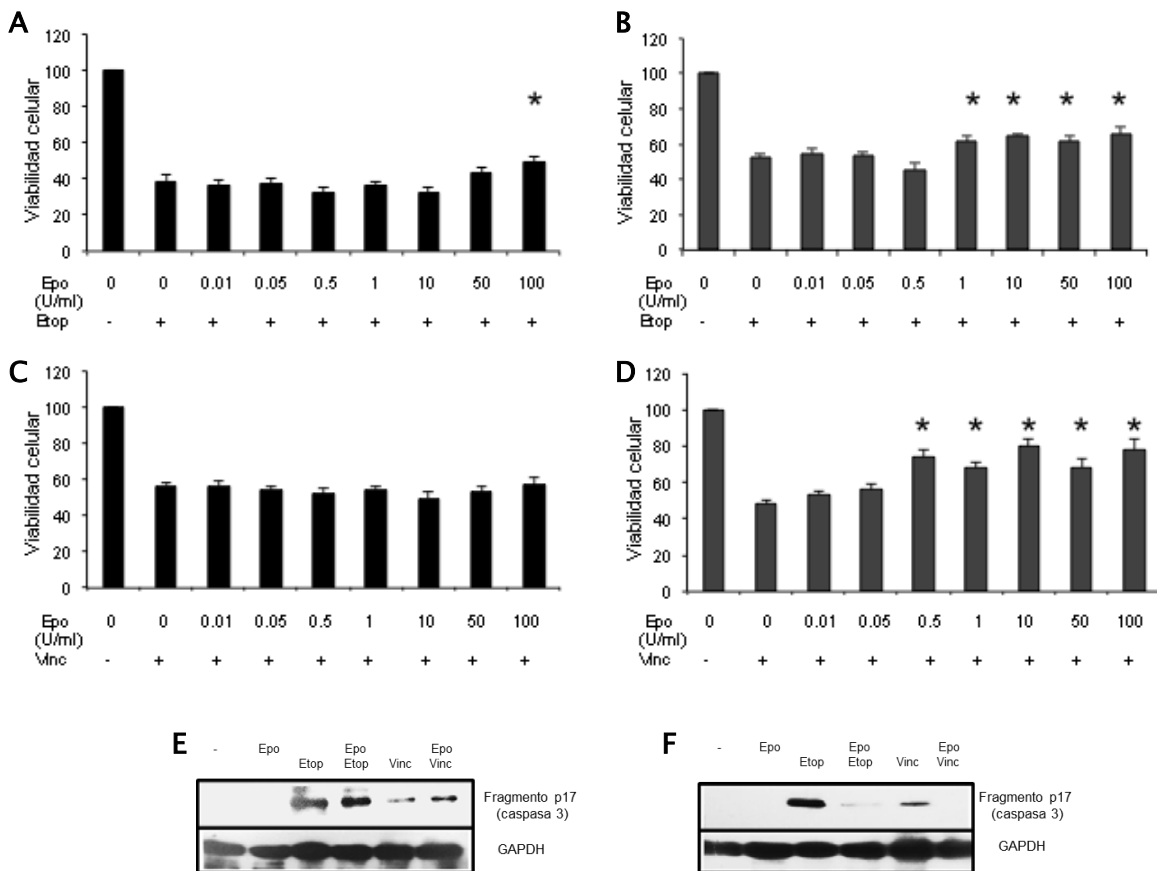


Figura 12. Efecto de la Epo sobre la muerte inducida por etopósido y vincristina. Las líneas celulares HEK293 (A, C) y MSN (B, D) fueron estimuladas con las dosis señaladas de Epo y 2 horas después recibieron la DL 50 determinada para cada línea celular del fármaco indicado. A las 24 horas se realizó una prueba de MTT. Cada barra representa el promedio de 4 experimentos independientes cada uno por triplicado con su desviación estándar. * $P < 0.05$ en comparación con la DL 50 y 0 U/ml de Epo. También se obtuvieron lisados de proteína total luego de los tratamientos en células HEK293 (E) y MSN (F) y se realizó Western Blot utilizando un anticuerpo contra caspasa 3 activa (Genetex). Como control de carga se utilizó un anticuerpo contra GAPDH (Genetex).

6.6 ESTUDIO DE LAS VÍAS ACTIVADAS POR EPO

Luego de encontrar que la rhEpo inducía proliferación y protección sobre la muerte que inducen el etopósido y la vincristina en la línea celular MSN pero no en HEK293, se evaluó mediante Western Blot las vías que se activaban en estas líneas celulares luego del estímulo con rhEpo. Como se mencionó con anterioridad, cuando la Epo se une a su receptor, el EpoR sufre cambios conformacionales que permiten que las regiones citoplásmicas de éste queden lo suficientemente próximas para que las moléculas de JAK2 que ahí se encuentran se transfosforilen. Una vez fosforiladas, esas moléculas de JAK2 fosforilan los residuos de tirosina que hay a lo largo de la región citoplásmica del receptor y a esos residuos fosforilados se pueden unir diversas proteínas que permiten que se activen vías que inducen la proliferación la inhibición de la muerte celular como son las vías JAK/STAT, PI3K/AKT, y la vía MAPK (Jelkman W 1992). Para determinar la activación de la vía JAK/STAT se estudió la fosforilación de STAT5, que se sabe se fosforila por las moléculas de JAK2 ancladas al receptor. Como se observa en la figura 13, tanto en las células HEK293 (A), como en las células MSN (B), STAT5 se fosforiló desde los 30 segundos de estímulo con rhEpo y dicha fosforilación se mantuvo hasta por dos horas. La máxima activación se dio a los 15 minutos en HEK293 y a los 5 minutos en MSN. La activación de la vía PI3K/AKT se determinó evaluando la fosforilación de AKT. En MSN la fosforilación se observó a partir de los 5 minutos de estímulo, mientras que en HEK293, AKT estaba constitutivamente fosforilada aun sin recibir tratamiento con rhEpo. Por último, para determinar la activación de la vía MAPK se evaluó la fosforilación de ERK1 /2 y se encontró que en MSN dicha fosforilación aparecía a los 15 minutos, mientras que en HEK293 era necesaria 1 hora de estimulación con rhEpo. Por lo tanto, la rhEpo induce la activación de STAT5, AKT y ERK1 /2 en las células de neuroblastoma mientras que en HEK293 sólo la de STAT5 y en etapas tardías la de ERK1 /2.

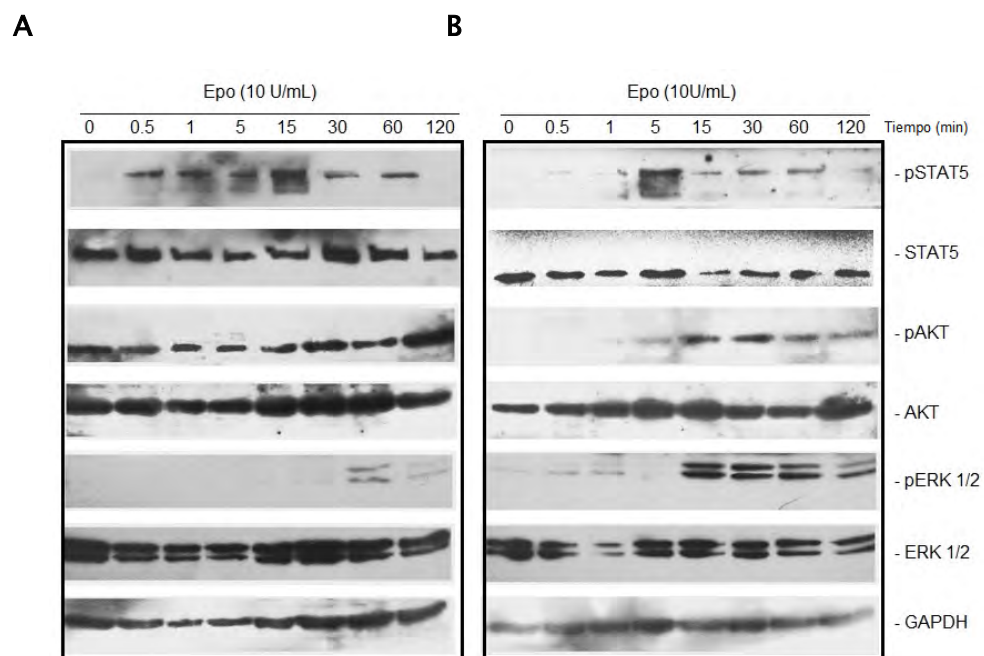


Figura 13. Activación de STAT5, AKT y ERK1/2 luego del estímulo con Epo. Se obtuvieron lisados de proteína total de las líneas celulares HEK293 (A) y MSN (B) luego del estímulo con 10 U/ml de Epo por el tiempo indicado. 30µg de proteína se sometieron a SDS-PAGE. Luego de esto, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se incubaron con anticuerpos contra STAT5, pSTAT5, AKT, pAKT, ERK1/2, pERK1/2 o GAPDH que se utilizó como control de carga (Genetex). Se muestran imágenes de un experimento representativo de 4 que se realizaron de manera independiente.

6.7 INHIBICIÓN DE LA VÍA JAK/STAT

Para definir la participación de la vía JAK/STAT en los efectos protectores que tuvo la rhEpo sobre la muerte inducida por etopósido y vincristina en las células MSN se inhibió con tirfostina AG490 la actividad de cinasa de JAK2 antes de administrar la rhEpo y los fármacos. En la figura 14 se observa como la protección que había inducido la rhEpo sobre la muerte por etopósido (14A) y vincristina (14B) se abatió por completo cuando se pre-incubó con el inhibidor. En la figura 14C se muestra como la fosforilación de STAT5 que se da luego del estímulo con rhEpo desaparece si se inhibe a JAK2. Estos resultados señalan que para que la rhEpo tenga efecto, debe activarse STAT5 y que esta activación se da por la fosforilación mediante JAK2.

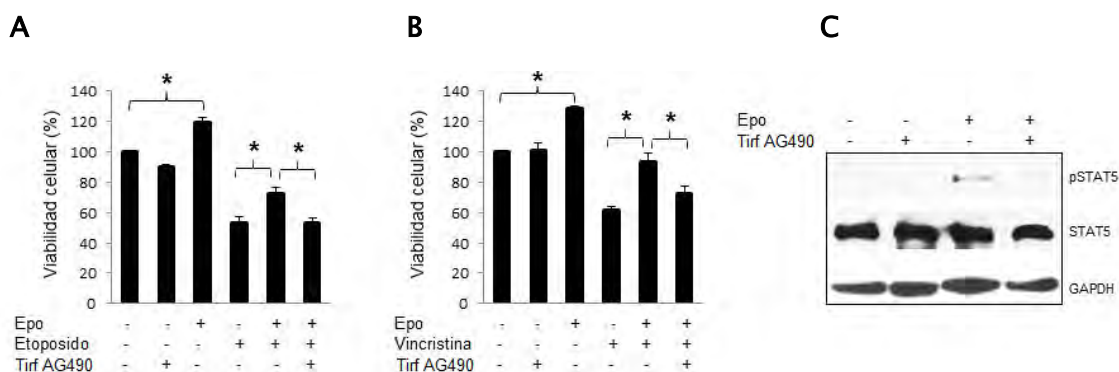


Figura 14. Efecto de la inhibición de JAK2 sobre los efectos mediados por Epo en las células MSN. La línea celular MSN se pre-incubó con 50 μ M de tirfostina AG490 por dos horas. Transcurrido este tiempo, las células fueron estimuladas con 10U/ml de Epo. Dos horas después recibieron la DL 50 de etopósido (A) o vincristina (B). A las 24 horas se realizó una prueba de MTT. Cada barra representa el promedio de 4 experimentos independientes cada uno por triplicado con su desviación estándar. * $P < 0.05$. Se obtuvieron lisados de proteína total luego de los tratamientos. 30 μ g de proteína se sometieron a SDS-PAGE. Luego de esto, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se incubaron con anticuerpos anti STAT5, pSTAT5, y GAPDH como control interno (Genetex) (C).

6.8 INHIBICIÓN DE LA VÍA PI3K/AKT

Para evaluar si la vía PI3K/AKT participaba en los efectos protectores encontrados en las células de neuroblastoma, se pre-trató a las células con el inhibidor específico de PI3K wortmanina antes de estimular con rhEpo y los fármacos. En la figura 15 se observa como los efectos de la rhEpo sobre la muerte inducida por etopósido (A) y vincristina (B) se anulan si se utiliza el inhibidor de PI3K. El pre-tratamiento con wortmanina impidió que la fosforilación de AKT se diera luego del estímulo con Epo (C), lo que señala que esta vía debe activarse para que la Epo pueda inhibir la muerte de las células MSN.

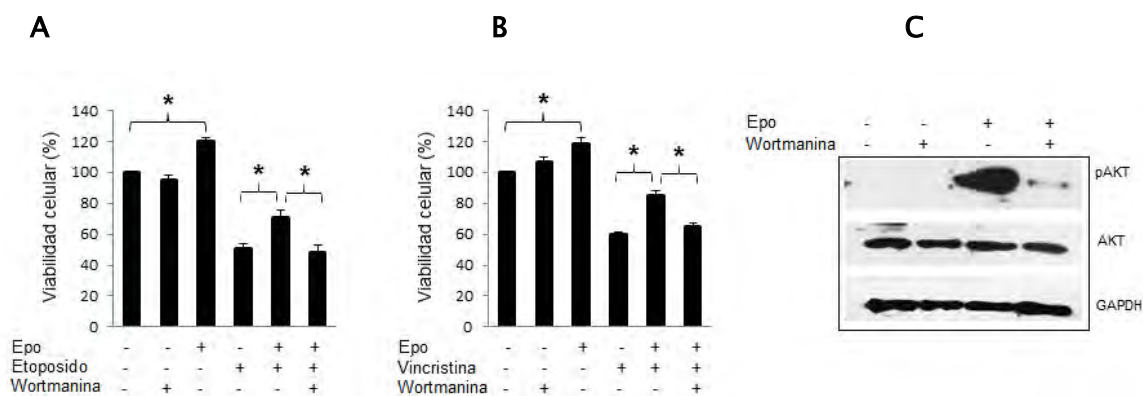


Figura 15. Efecto de la inhibición de PI3K sobre los efectos mediados por Epo en las células MSN. La línea celular MSN se pre-incubó con 100 nM de wortmanina por 30 minutos. Transcurrido este tiempo, las células fueron estimuladas con 10U/ml de Epo. Dos horas después recibieron la DL 50 de etopósido (A) o vincristina (B). A las 24 horas se realizó una prueba de MTT. Cada barra representa el promedio de 4 experimentos independientes cada uno por triplicado con su desviación estándar. * P < 0.05. Se obtuvieron lisados de proteína total luego de los tratamientos. 30µg de proteína se sometieron a SDS-PAGE. Luego de esto, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se incubaron con anticuerpos anti AKT, pAKT, y GAPDH como control interno (Genetex) (C).

6.9 INHIBICIÓN DE LA VÍA MAPK

Como además de la fosforilación de STAT5 y AKT también se encontró que la Epo induce la fosforilación de ERK1/2 en las células MSN, se utilizó U0126 monoetanolato para inhibir a MEK1/2 quien se encarga de fosforilar a ERK y así poder determinar el papel de la vía de las MAPK sobre los efectos encontrados de la Epo en estas células. En la figura 16 se puede observar como al inhibir a MEK1/2 los efectos de la rhEpo sobre la muerte que induce el etopósido (A) y la vincristina (B) se inhiben por completo. La fosforilación de ERK1/2 luego

del estímulo con rhEpo no se da si se pre-trata con U0126 (C). Estos resultados indican que la activación de esta vía es necesaria para que la rhEpo pueda inducir protección en las células de neuroblastoma MSN.

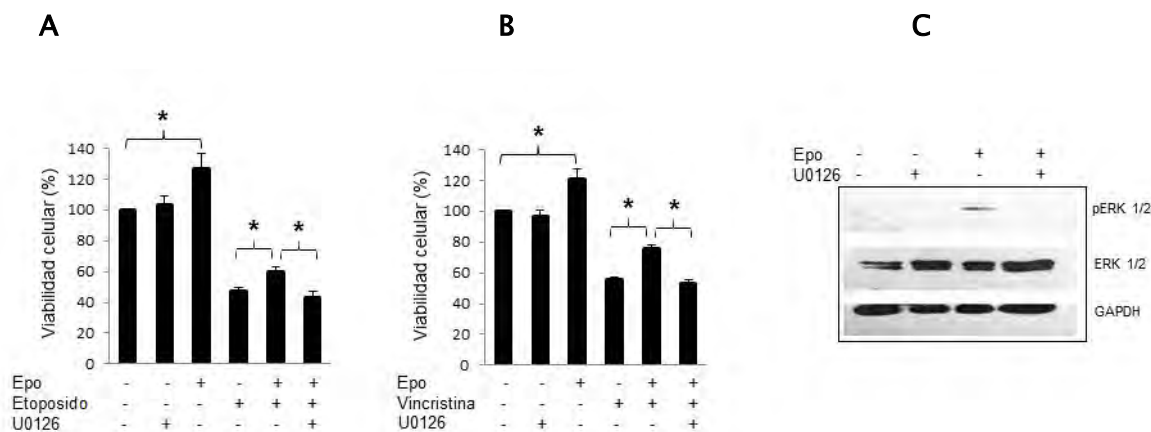


Figura 16. Efecto de la inhibición de MEK1/2 sobre los efectos mediados por Epo en las células MSN. La línea celular MSN se pre-incubó con 20 μ M de U0126 monoetanolato por 1 hora. Transcurrido este tiempo, las células fueron estimuladas con 10U/ml de Epo. Dos horas después recibieron la DL 50 de etopósido (A) o vincristina (B). A las 24 horas se realizó una prueba de MTT. Cada barra representa el promedio de 4 experimentos independientes cada uno por triplicado con su desviación estándar. * $P < 0.05$. Se obtuvieron lisados de proteína total luego de los tratamientos. 30 μ g de proteína se sometieron a SDS-PAGE. Luego de esto, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se incubaron con anticuerpos anti ERK1/2, pERK1/2, y GAPDH como control interno (Genetex) (C).

6.10 EXPRESIÓN DEL GEN DE EPO-R EN DISTINTAS LÍNEAS CELULARES DE NEUROBLASTOMA HUMANO

Como se encontró que en la línea derivada de neuroblastoma MSN se expresaba el Epo-R y que este era funcional alterando la respuesta de estas células al efecto de algunos fármacos empleados para tratar esta enfermedad, se decidió explorar si otras líneas celulares de neuroblastoma también expresaban al Epo-R. Se incluyeron las líneas celulares SK-N-MC (tomada de una metástasis en el área supra-orbital) y SK-N-AS (tomada de una metástasis en médula ósea). Mediante RT-PCR, como se observa en la figura 17, se encontró que las dos nuevas líneas de neuroblastoma expresaban al Epo-R al igual que las células MSN estudiadas previamente y los controles positivos K562 y HeLa. Adicionalmente, se detectó un segundo amplificado de aproximadamente 400 pb en la línea HEK293, lo que sugiere la presencia de

un transcrito alternativo que podría codificar para alguna de las isoformas que se han reportado del Epo-R (Arcasoy M et al., 2003).

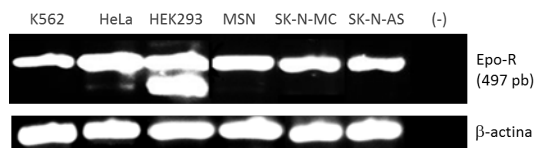


Figura 17. Expresión del gen Epo-R. Se realizó RT-PCR con el ARN total que se extrajo de las líneas celulares K562, HeLa, HEK293, MSN, SK-N-MC, SK-N-AS utilizando oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 497 pb del gen del Epo-R. Como control negativo se utilizó agua libre de RNAsas y DNAsas sin ARN. Como control interno se amplificó un fragmento del gen de β-actina.

6.11 EFECTO DE LA HIPOXIA SOBRE LA EXPRESIÓN DEL EPO-R

A lo largo de este trabajo se ha encontrado que la línea HEK293 no responde a los tratamientos con rhEpo, contrario a lo que ocurre en MSN que responde desde concentraciones bajas. Una diferencia que se encontró entre las células de riñón embrionario y las de neuroblastoma fue que cuando se realizó RT-PCR para evaluar la expresión de Epo-R, las células HEK293 presentaban una banda de ~400 pb que podría ser una isoforma del Epo-R (Fig. 17). Ya se han encontrado isoformas para este receptor en células de cáncer de mama, colon, pulmón, ovario y próstata (Arcasoy MO et al., 2008). Las 5 isoformas son consideradas reguladores negativos pues unen a la Epo pero no inducen señalización. Esto podría explicar lo encontrado hasta ahora en este trabajo, pues las células que parecen tener una isoforma o regulador negativo no responden al estímulo con rhEpo. En el sistema nervioso central se ha encontrado que la hipoxia induce un aumento en la expresión del Epo-R en las neuronas (Sanchez PE et al., 2009) y además, también se ha reportado que en el cerebro de ratón, existe una isoforma soluble del Epo-R que en condiciones de normoxia actúa como regulador negativo de los efectos de la Epo pero que cuando se presentan condiciones de hipoxia, deja de expresarse (Soliz J et al., 2007). Esto sugiere que en el sistema nervioso, la hipoxia regula la expresión tanto del Epo-R como de sus isoformas. Dado lo anterior, se decidió explorar el efecto de la hipoxia en la expresión del Epo-R y de sus isoformas tanto en las células HEK293 como en las de neuroblastoma. Como se observa en la Figura 18, la banda de 497 pb que corresponde al Epo-R se detectó en todas las líneas

celulares luego de la inducción de hipoxia tal y como ocurrió en condiciones de normoxia (Fig. 17). Las condiciones hipóxicas provocaron que la isoforma de HEK293 dejara de expresarse (Fig. 18), mientras que en la línea de neuroblastoma MSN se detectó una banda de aproximadamente 400 pb que no se detectó en condiciones de normoxia, lo que sugiere que la hipoxia puede modificar la expresión de isoformas del Epo-R.

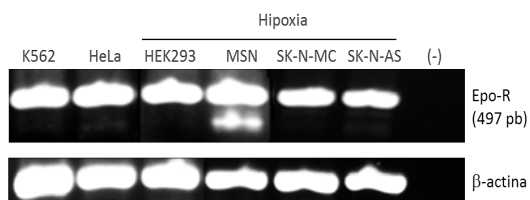


Figura 18. Expresión del gen Epo-R en condiciones de hipoxia. Las células HEK293, MSN, SK-N-MC y SK-N-AS se sometieron a condiciones de hipoxia por 24 horas. Posteriormente se realizó RT-PCR con el ARN total que se extrajo de las líneas celulares utilizando oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 497 pb del gen del Epo-R. Como control negativo se utilizó agua libre de RNAsas y DNAsas sin ARN. Como control interno se amplificó un fragmento del gen de β-actina.

6.12 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ÁCIDO RETINOICO Y NGF SOBRE LA EXPRESIÓN DEL EPO-R

En el 2011 se reportó que el factor de crecimiento nervioso (NGF) puede inducir la activación del factor de transcripción inducible por hipoxia HIF-1 en condiciones de normoxia (Nakamura K et al., 2011) y también se sabe que HIF-1 se activa en condiciones de hipoxia. Por lo anterior, y luego de observar que la hipoxia puede regular la expresión de isoformas del Epo-R, se decidió investigar que ocurría con la expresión del Epo-R si se trataba a las células con ácido retinoico y NGF, tratamiento que se utiliza para inducir la diferenciación de células de neuroblastoma a neuronas. La figura 19 muestra los resultados de la tinción con hematoxilina-eosina de las distintas líneas celulares luego del tratamiento con ácido retinoico, NGF o ambos. En las células MSN se observó que luego del tratamiento con ambos factores, las células son más alargadas y pequeñas, lo que sugiere diferenciación. Lo mismo ocurrió en las células SN-N-MC, mientras que en las líneas HEK293 y SK-N-AS no hubo cambios morfológicos notables. La figura 20 muestra el resultado de la RT-PCR realizada para estudiar la expresión del Epo-R. En las cuatro líneas celulares de interés, bajo todas las condiciones, se observa la banda que corresponde al Epo-R. En las células HEK293, el

tratamiento con ácido retinoico no modificó la presencia de la banda de 400 pb, mientras que NGF hizo que la isoforma del Epo-R dejara de expresarse. El efecto se mantuvo cuando las células recibieron NGF en conjunto con ácido retinoico. En las células MSN, sólo el tratamiento con ambos factores provocó que apareciera la banda de ~400 pb. En las células SK-N-MC, tanto el tratamiento con ácido retinoico, como el tratamiento con NGF provocaron que se expresara la isoforma, sin embargo, cuando las células recibieron ambos tratamientos, la isoforma dejó de expresarse. Por último, en las células SK-N-AS nunca se encontró la expresión de la isoforma. Estos datos sugieren que tanto el ácido retinoico como el NGF pueden regular la expresión de isoformas del Epo-R en condiciones de normoxia.

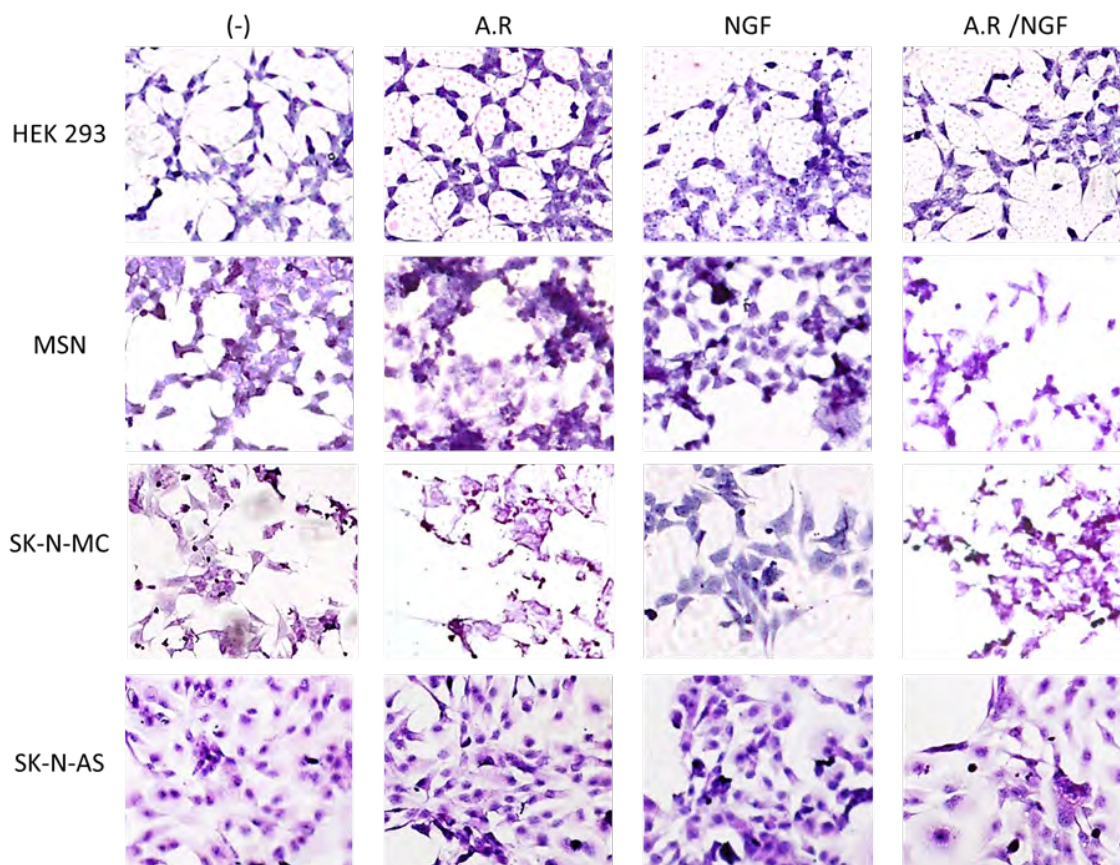


Figura 19. Diferenciación neuronal con ácido retinoico y NGF. Las células HEK293, MSN, SK-N-MC y SK-N-AS se cultivaron por 7 días en presencia de 10 μ M de ácido retinoico (**A.R**), 50 ng/ml de factor de crecimiento nervioso (**NGF**) o ambos. Transcurrido este tiempo, se realizó una tinción con hematoxilina y eosina.

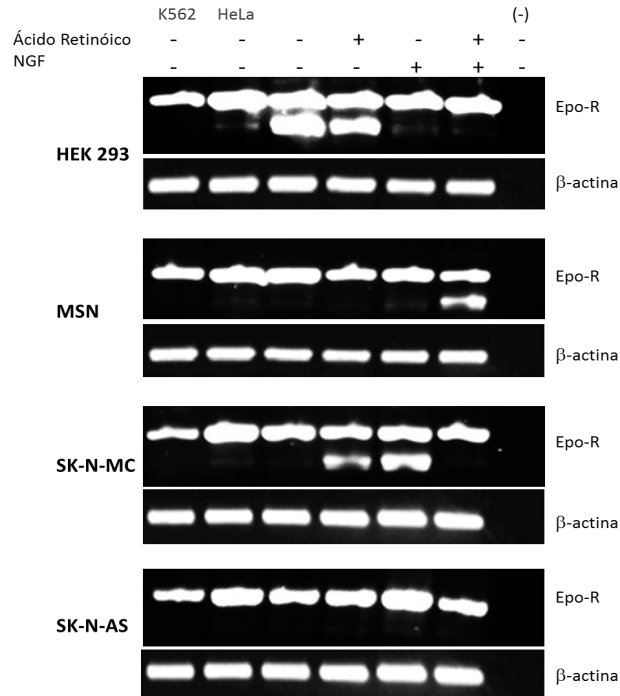


Figura 20. Expresión del gen de Epo-R luego del tratamiento con AR y NGF. Las células HEK293, MSN, SK-N-MC y SK-N-AS se cultivaron por 7 días con ácido retinoico, NGF o ambos, luego de los cuales se extrajo ARN total. Posteriormente se realizó RT-PCR utilizando oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 497 pb del gen del Epo-R. Como control negativo se utilizó agua libre de RNAsas y DNAsas sin ARN. Como control interno se amplificó un fragmento del gen de β-actina.

6.13 DETERMINACIÓN DE LA DL 50 EN CÉLULAS DIFERENCIADAS

Como se encontró que el tratamiento con ácido retinoico y NGF podía modificar la expresión de isoformas del Epo-R en las líneas celulares estudiadas (Fig. 20), se decidió investigar que ocurría en estas células si se administraba rhEpo en conjunto con la DL 50 de etopósido o vincristina. Para esto primero se determinó la dosis necesaria de cada fármaco para inducir la muerte del 50% de las células HEK293, MSN, SK-N-MC y SK-N-AS que habían sido previamente tratadas con ácido retinoico, NGF o ambos. Se expuso a las células a concentraciones crecientes de los fármacos por 24 horas. Luego de este tiempo se evaluó el porcentaje de viabilidad celular por MTT y mediante una regresión lineal se calculó la DL 50. Los resultados para cada fármaco, cada línea celular y cada tratamiento se presentan en la tabla 2. Las células SK-N-AS resultaron ser resistentes al tratamiento con vincristina, por lo

que dichas células solo recibieron tratamiento con etopósido. Las dosis presentadas en la tabla son las que se utilizaron en los siguientes ensayos de viabilidad celular.

LÍNEA CELULAR	ETOPÓSIDO μM				VINCRIPTINA μM			
	(-)	AR	NGF	AR/NGF	(-)	AR	NGF	AR/NGF
HEK293	67.9	195	133.6	148.9	9.69	9.2	7.3	8.7
MSN	230	324	258.1	230	18	19.6	18	25.8
SK-N-MC	1.36	2	2.72	2	10.9	8.1	10.9	8.1
SK-N-AS	100	33.8	46.3	47.6	-	-	-	-

Tabla 2. Dosis letal 50 determinada para cada línea celular luego del pre-tratamiento con ácido retinoico, NGF o ambos.

6.14 EFECTO DE LA EPO SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS HEK293 LUEGO DEL TRATAMIENTO CON ÁCIDO RETINOICO, NGF O AMBOS

Como se mencionó anteriormente, la muerte inducida por etopósido y vincristina no se vio afectada en las células HEK293 por el pre-tratamiento con rhEpo, sin embargo como también se mencionó, el tratamiento con NGF y de éste en conjunto con ácido retinoico suprimió la expresión de una isoforma del Epo-R en estas células, por lo que se investigó si esto modificaba el efecto de la rhEpo. Como se puede observar en la figura 21, la rhEpo no tuvo efectos protectores sobre la muerte inducida por etopósido (Fig. 21A) ni por vincristina (Fig. 21B) en las células HEK293, ni cuando estas fueron pre-tratadas con ácido retinoico. En contraste, cuando las células se pre-trataban con NGF antes de recibir la rhEpo, la muerte por etopósido disminuía un 15% y hasta un 25% si las células se pre-trataban con NGF y ácido retinoico (Fig. 21A). La muerte inducida por vincristina disminuyó un 23% cuando las células se pre-trataron con NGF y un 27% cuando se pre-trataban con NGF y ácido retinoico antes de recibir la rhEpo (Fig. 21B). En conjunto, estos resultados sugieren que cuando se pre-trata a las células HEK293 con NGF o NGF junto con ácido retinoico y se abate la

expresión de la isoforma del Epo-R, la rhEpo tiene efectos protectores sobre la muerte que induce el etopósido y la vincristina.

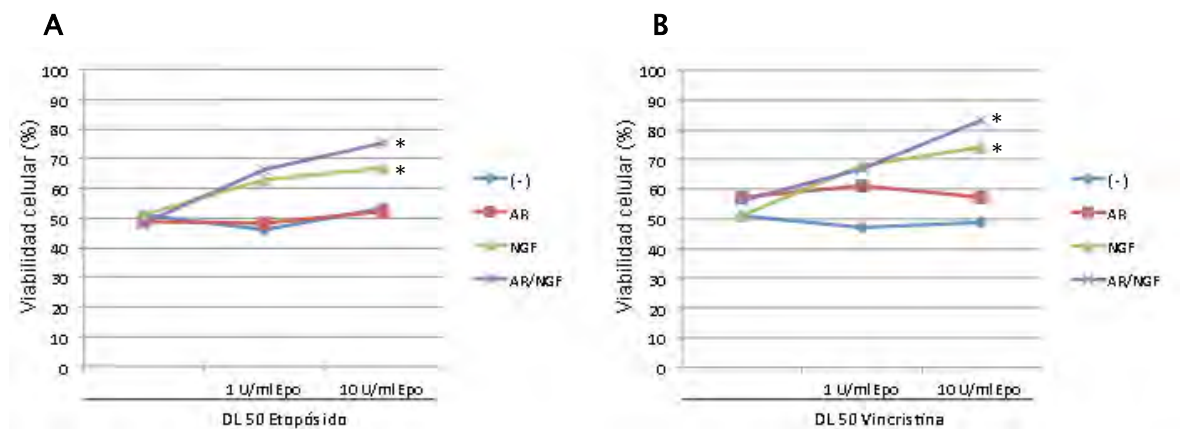


Figura 21. Efecto de la rhEpo sobre la viabilidad de células HEK293 pre-tratadas con ácido retinoico, NGF o ambos. La línea celular HEK293 se trató con 10 μ M de ácido retinoico, 50 ng/ml de NGF o ambos durante 7 días. Pasado este tiempo, las células recibieron la dosis señalada de Epo y dos horas más tarde la DL 50 de etopósido (A) o vincristina (B). A las 24 horas se realizó una prueba de MTT. Cada punto representa el promedio de 4 experimentos independientes cada uno por triplicado. * = $P < 0.05$ comparado con las células que únicamente recibieron la DL 50 del fármaco indicado.

6.15 EFECTO DE LA EPO SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS MSN LUEGO DEL TRATAMIENTO CON ÁCIDO RETINOICO, NGF O AMBOS

En las células MSN se había encontrado que la rhEpo protegía a las células de la muerte inducida por etopósido y vincristina. También se había encontrado que cuando las células se trataban con NGF y ácido retinoico en conjunto, una isoforma del Epo-R se expresaba. Como se puede observar en la figura 22, cuando las células fueron pre-tratadas con NGF y ácido retinoico en conjunto, la rhEpo no tuvo ningún efecto sobre la muerte inducida por etopósido (Fig. 22A) ni sobre la muerte inducida por vincristina (Fig. 22B). Como también se aprecia en la figura 22, ni el tratamiento con ácido retinoico, ni el tratamiento con NGF por separado impidieron que la rhEpo inhibiera la muerte por etopósido y por vincristina, ya que luego de estos tratamientos y 10 U/ml de rhEpo hubo aproximadamente un 20% menos de células muertas por etopósido y hasta un 30% menos de células muertas por el tratamiento con

vincristina. Esto indica que en estas células es necesario el tratamiento con ácido retinoico y NGF en conjunto para que se abata el efecto protector de la rhEpo.

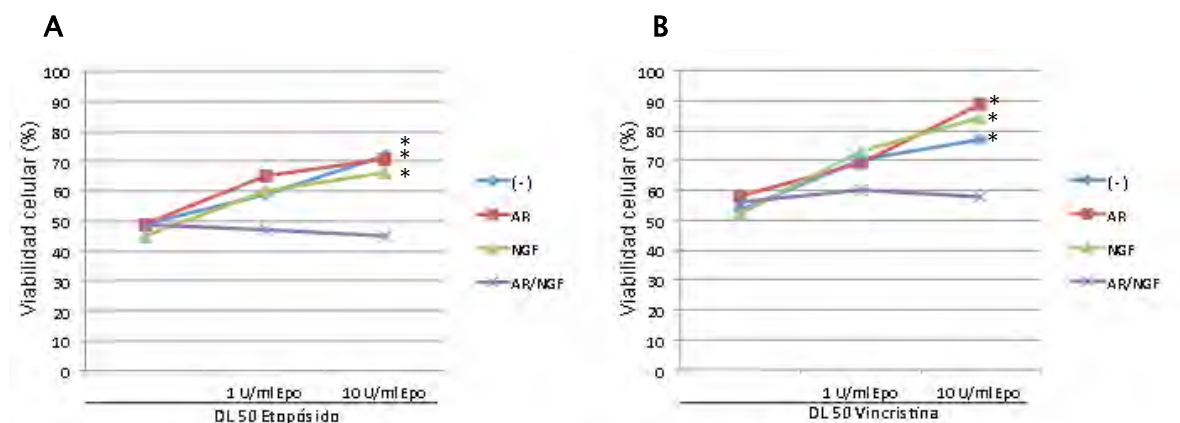


Figura 22. Efecto de la rhEpo sobre la viabilidad de células MSN pre-tratadas con ácido retinoico, NGF o ambos. La línea celular MSN se trató con 10 μ M de ácido retinoico, 50 ng/ml de NGF o ambos durante 7 días. Pasado este tiempo, las células recibieron la dosis señalada de Epo y dos horas más tarde la DL 50 de etopósido (A) o vincristina (B). A las 24 horas se realizó una prueba de MTT. Cada punto representa el promedio de 4 experimentos independientes cada uno por triplicado. * = $P < 0.05$ comparado con las células que únicamente recibieron la DL 50 del fármaco indicado.

6.16 EFECTO DE LA EPO SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS SK-N-MC LUEGO DEL TRATAMIENTO CON ÁCIDO RETINOICO, NGF O AMBOS

En las células SK-N-MC la rhEpo inhibió la muerte por etopósido en un 15% (Fig. 23A) y dicha inhibición aumentó hasta un 50% cuando las células se pre-trataron con NGF y ácido retinoico al mismo tiempo, dando un 100% de células viables con 10 U/ml de rhEpo. La rhEpo también protegió a las células de la muerte inducida por vincristina. Como se aprecia en la figura 23B, si se administraban 10 U/ml de rhEpo antes de la vincristina se obtenía hasta un 20% más de células viables en comparación con las células que no recibían Epo. Si las células además se pre-trataban con NGF y ácido retinoico, la viabilidad celular con 10 U/ml de rhEpo alcanzaba hasta un 97%, es decir, 47% más con respecto a las células que sólo recibían la DL 50 de vincristina. Si las células sólo se pre-trataban con NGF o con ácido retinoico por separado, la rhEpo no tenía efecto sobre la muerte celular inducida por ninguno de los dos

fármacos empleados. Estos datos señalan que en las células SK-N-MC la rhEpo puede inhibir la muerte por etopósido y vincristina. El efecto de la rhEpo se acentúa si las células son pre-tratadas con NGF y ácido retinoico y de forma muy interesante, el efecto se abate si las células se pre-tratan únicamente con NGF o ácido retinoico, que además coincide con el hecho de que las células silvestres y las que recibían el NGF junto con el ácido retinoico no expresan isoformas para el Epo-R, mientras que las que recibían los tratamientos por separado sí.

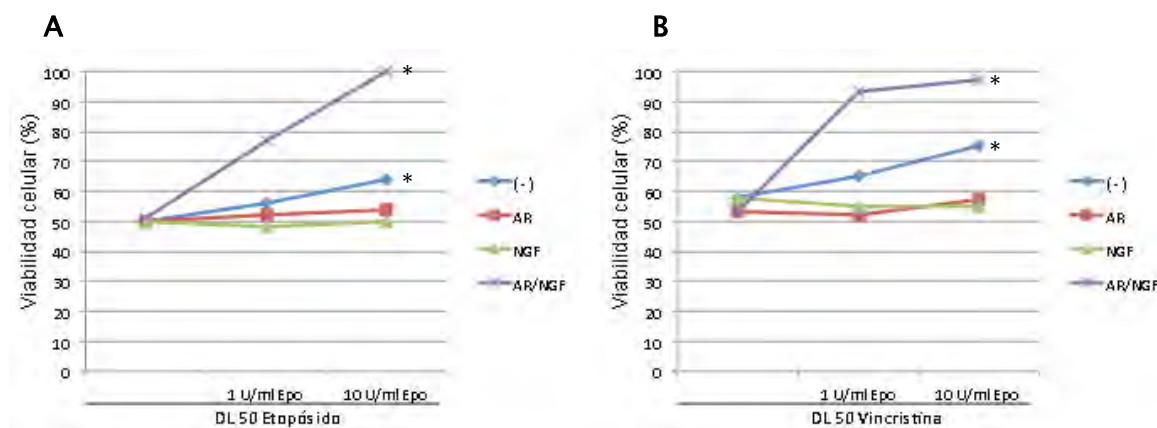


Figura 23. Efecto de la rhEpo sobre la viabilidad de células SK-N-MC pre-tratadas con ácido retinoico, NGF o ambos. La línea celular SK-N-MC se trató con 10 μ M de ácido retinoico, 50 ng/ml de NGF o ambos durante 7 días. Pasado este tiempo, las células recibieron la dosis señalada de Epo y dos horas más tarde la DL 50 de etopósido (A) o vincristina (B). A las 24 horas se realizó una prueba de MTT. Cada punto representa el promedio de 4 experimentos independientes cada uno por triplicado. * = $P < 0.05$ comparado con las células que únicamente recibieron la DL 50 del fármaco indicado.

6.17 EFECTO DE LA EPO SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS SK-N-AS LUEGO DEL TRATAMIENTO CON ÁCIDO RETINOICO, NGF O AMBOS

Las células SK-N-AS resultaron ser resistentes al tratamiento con vincristina, por lo que únicamente se estudió que ocurría con la muerte inducida por etopósido. Como se puede apreciar en la figura 24, en las células silvestres la rhEpo provocó la disminución de la muerte celular por etopósido hasta en un 40%. El efecto protector de la rhEpo se mantuvo cuando las células se pre-trataron con ácido retinoico, NGF o ambos en conjunto. El mayor efecto se observó cuando las células fueron pre-tratadas con ácido retinoico, en el que hubo

un 45% menos de células viables. La muerte celular disminuyó hasta un 25% cuando las células se trataron con NGF antes de recibir la rhEpo y el etopósido. Por último, la rhEpo inhibió la muerte celular hasta un 33% cuando las células se pre-trataron con NGF y ácido retinoico. Por lo tanto, en estas células la rhEpo siempre tuvo un efecto protector sobre la muerte inducida por etopósido. Como se mencionó en resultados anteriores, en estas células nunca se encontró la expresión de la isoforma del Epo-R, lo que podría estar relacionado con los resultados encontrados aquí.

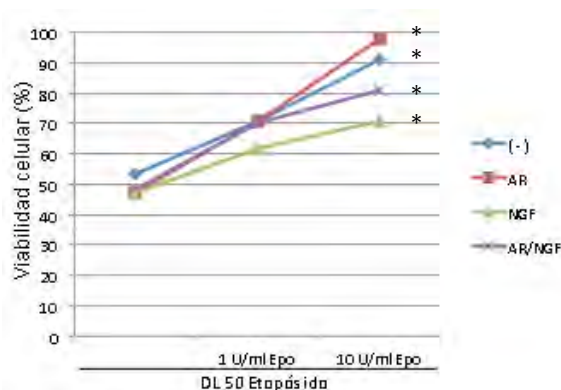


Figura 24. Efecto de la rhEpo sobre la viabilidad de células SK-N-AS pre-tratadas con ácido retinoico, NGF o ambos. La línea celular SK-N-AS se trató con 10 μ M de ácido retinoico, 50 ng/ml de NGF o ambos durante 7 días. Pasado este tiempo, las células recibieron la dosis señalada de Epo y dos horas más tarde la DL 50 de etopósido. A las 24 horas se realizó una prueba de MTT. Cada punto representa el promedio de 4 experimentos independientes cada uno por triplicado. * = $P < 0.05$ comparado con las células que únicamente recibieron la DL 50 del fármaco indicado.

6.18 EXPRESIÓN DE HIF-1 α LUEGO DEL TRATAMIENTO CON ÁCIDO RETINOICO, NGF O AMBOS

Como se encontró que el tratamiento con ácido retinoico y NGF podía modificar la expresión de la isoforma del Epo-R, y que dicha expresión impedía que la rhEpo tuviera efecto sobre la muerte inducida por etopósido y vincristina, se decidió tratar de determinar cuál era el mecanismo involucrado en los cambios de expresión. También se encontró que cultivar a las células en condiciones hipóxicas modificaba de la misma manera la isoforma del Epo-R. Durante la hipoxia, se sabe que el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF) se activa

y como se mencionó anteriormente, hoy se sabe que NGF puede activar a HIF en condiciones de normoxia. Por lo anterior, se estudió la expresión de la subunidad α de HIF-1 luego de los tratamientos con ácido retinoico y NGF. Se debe recordar que para que HIF se active, se necesita que la subunidad α sea estable y deje de degradarse. En la figura 25A se puede observar como en las células HEK293 el tratamiento con NGF y con NGF en conjunto con ácido retinoico provocaron la estabilidad de HIF-1 α . Cabe recordar que justo después de estos tratamientos la isoforma del Epo-R deja de expresarse. En las células MSN, se encontró que HIF-1 α está constitutivamente expresado y que únicamente después del tratamiento con ácido retinoico en conjunto con NGF dicha expresión se abate (Fig. 25B). Esto coincide con el hecho de que cuando estas células se trataban con ácido retinoico y NGF en conjunto las células expresaban la isoforma del Epo-R, no así cuando se trataban con ácido retinoico o NGF por separado. Las células silvestres tampoco expresan la isoforma. En el caso de las células SK-N-MC, se puede observar como el tratamiento con ácido retinoico induce la expresión de HIF-1 α . Lo mismo ocurre con el tratamiento con NGF. Sin embargo, si las células recibían el tratamiento de ambos factores al mismo tiempo, no se detectaba expresión de HIF-1 α , quedando igual que en las células silvestres (Fig. 25C). Contrario a lo encontrado en las líneas celulares comentadas previamente, en estas células la expresión de HIF-1 α coincide con la expresión de la isoforma del Epo-R. Por último, la figura 25D muestra como en las células SK-N-AS HIF-1 α siempre está expresada, en las células silvestres y luego de los tratamientos con ácido retinoico y NGF. En estas células nunca se detectó la expresión de la isoforma del Epo-R. Estos resultados señalan que tanto el ácido retinoico como el NGF pueden modificar la expresión de HIF1- α , lo que podría estar implicado en la regulación de la expresión de la isoforma del Epo-R.

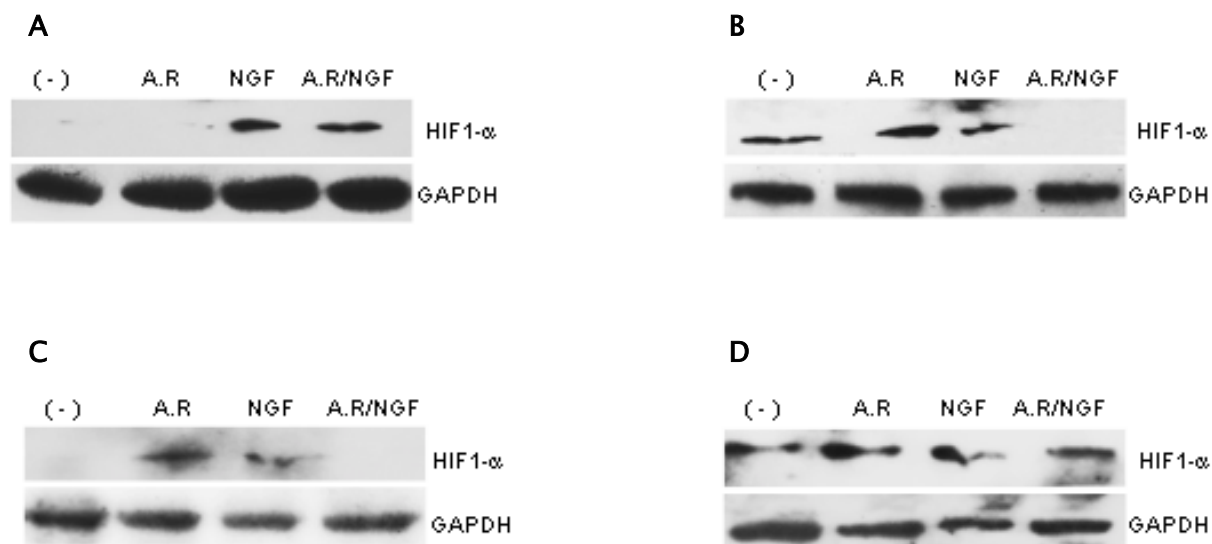


Figura 25. Expresión de HIF1- α . Se obtuvieron lisados de proteína de las líneas celulares HEK293 (A), MSN (B), SK-N-MC (C) y SK-N-AS (D) luego del tratamiento con 10 μ M de ácido retinoico, 50 ng/ml de NGF o ambos por 7 días. 30 μ g de proteína se sometieron a SDS-Page. Luego de esto, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se incubaron con un anticuerpo contra HIF1- α o GAPDH que se utilizó como control de carga (Genetex). Se muestran imágenes de un experimento representativo de 3 que se realizaron de manera independiente.

DISCUSIÓN

VII. DISCUSIÓN

Los pacientes con neuroblastoma reciben como parte de su tratamiento, quimioterapia en la que se utilizan fármacos como el etopósido y la vincristina. Los fármacos empleados tienen efectos secundarios graves entre los que se encuentra el daño a órganos sanos como el corazón, el hígado, el sistema nervioso y los riñones. Esto hace que las dosis empleadas no sean las óptimas y aun así, muchos pacientes siguen presentando daños colaterales a causa de la quimioterapia. Otro efecto negativo de la quimioterapia es la inducción de anemia en los pacientes a causa del daño que provocan los fármacos en los progenitores eritroides que residen en la médula ósea. La anemia es común en los pacientes de neuroblastoma incluso antes del inicio del tratamiento gracias a la infiltración de células tumorales en la médula ósea que se da en etapas avanzadas de la enfermedad, que es cuando la mayoría de los casos son detectados. La anemia es una condición desfavorable pues interfiere con el propio tratamiento antitumoral y además, de no ser atendida puede dañar los órganos de los pacientes, por lo que debe ser corregida. Para tratar la anemia en los pacientes con cáncer hoy en día la primera opción es el uso de rhEpo, que estimula la proliferación y diferenciación de los progenitores eritroides que se encuentran en la médula ósea. Hoy se sabe que la Epo puede además inhibir la muerte celular en órganos como el cerebro o el corazón, por lo que en este trabajo se decidió investigar si podría proteger a células de riñón de la muerte que inducen dos de los quimiofármacos utilizados en México para tratar el neuroblastoma sin afectar la respuesta de las células tumorales. Para llevar a cabo lo anterior, lo primero que se realizó fue determinar si las líneas celulares que se utilizarían a lo largo de este proyecto expresaban el gen para el receptor de eritropoyetina. Debido a que los neuroblastomas se presentan principalmente en menores de 1 año, y se originan de tejido embrionario, para el estudio de los efectos en células renales se utilizaron células HEK293 que también tienen un origen embrionario. Se encontró que tanto las células HEK293 como las células MSN derivadas de un neuroblastoma que había hecho metástasis a la médula ósea, expresaban el Epo-R (Fig. 9A). Desde 1999 se había reportado que el riñón humano expresaba el Epo-R (Westenfelder C *et al.*, 1999), lo que concuerda con lo que se encontró

aquí. Lo encontrado en las células de neuroblastoma coincide con lo encontrado tanto en el sistema nervioso humano sano en donde todos los tipos celulares (excepto los oligodendrocitos maduros) expresan dicho receptor (Nagai A *et al.*, 2001) y con lo reportado para neuroblastomas en donde ya se había encontrado la expresión del Epo-R en biopsias humanas (Ribatti D *et al.*, 2007 y Batra S *et al.*, 2003). Sin embargo, para que el Epo-R sea funcional, debe estar expresado como proteína en la superficie membranal y además debe fosforilarse en los residuos de tirosina presentes a lo largo de su región citoplásmica, por lo que el siguiente objetivo fue precisamente investigar si esto sucedía. Primero se encontró mediante Western Blot que ambas líneas celulares expresaban al Epo-R en lisados protéicos de la fracción membranal (Fig. 9B) y después, se determinó si el Epo-R se fosforilaba en los residuos de tirosina al recibir el estímulo con rhEpo. Aunque en ambas líneas celulares el Epo-R se fosforiló luego de recibir el estímulo con 10 U/ml de rhEpo, las células HEK293 alcanzaron la máxima fosforilación a los 60 segundos de estímulo, mientras que las células MSN lo hicieron en la mitad de tiempo (Fig. 9C). Además, el Epo-R estaba constitutivamente fosforilado en las células de neuroblastoma, por lo que el siguiente paso fue investigar si estas células producían además su propia eritropoyetina, lo que podría estar estimulando al Epo-R todo el tiempo. Aunque se ha encontrado a Epo expresada en algunas biopsias de neuroblastoma (Batra S *et al.*, 2003), no se encontró ni por RT-PCR ni mediante inmunocitoquímica que las células MSN expresaran Epo (Fig. 10), lo que concuerda con lo encontrado en otras líneas celulares derivadas de neuroblastoma en condiciones de normoxia (Batra S *et al.*, 2003). La expresión en las biopsias podría deberse a las condiciones hipóxicas que se presentan en el microambiente tumoral, ya que como se ha mencionado, el principal estímulo de la producción de Epo es la hipoxia y dentro de los tumores se generan zonas en las que la concentración de oxígeno es baja. Dado que las células MSN no producen su propia Epo en condiciones de normoxia, la causa de la activación constitutiva del Epo-R en estas células podría deberse a la interacción del Epo-R con receptores para otras citocinas, como por ejemplo, el receptor para stem cell factor, c-Kit, o el receptor para VEGF (factor de crecimiento vascular-endotelial), VEGFR, ambos de la familia de receptores cinasas

de tirosina (RTKs). Se ha reportado que cuando estos receptores se activan por la unión de sus respectivos ligandos, pueden quedar lo suficientemente próximos al Epo-R e inducir su transfosforilación (Wu H *et al.*, 1995, Yang Z *et al.*, 2014). En los neuroblastomas se ha reportado la co-expresión de c-Kit y su ligando (Beck D *et al.*, 1995) y también la expresión de VEGFR (Fakhari M *et al.*, 2002) y la producción de VEGF soluble (Peiris-Pages M *et al.*, 2010). Para determinar si la activación de estos receptores es lo que mantiene al Epo-R constitutivamente fosforilado en las células MSN sería necesario estudiar la expresión en dichas células de c-Kit y VEGFR así como la producción de stem cell factor y VEGF. En las células HEK293 tampoco se encontró expresión de Epo (Fig. 10). Aunque en el humano adulto la Epo es producida principalmente en el riñón, durante la etapa fetal la producción se da en el hígado, lo que podría explicar porque las células de riñón embrionario HEK293 no producen Epo. Se ha reportado que en muestras de tumores de Wilms, tumores renales que se originan de células poco diferenciadas con características de células progenitoras renales que son comunes en niños, se encontró la expresión de Epo mediante inmunohistoquímica y RT-PCR (Batra S *et al.*, 2003). Sin embargo en ese mismo trabajo se encontró que en líneas celulares de tumores embrionarios no se expresaba Epo en condiciones de normoxia. Esto sugiere que al igual que en el caso anterior, la expresión de Epo es detectada en biopsias porque en los tumores se generan zonas hipóxicas, lo que estimula la producción de Epo. Posteriormente, como se encontró que ambas líneas celulares expresaban al Epo-R, y que éste parecía ser funcional pues se fosforilaba luego del estímulo con Epo, se estudió que efecto tenía la Epo sobre la viabilidad celular. En las células HEK293 el tratamiento con Epo no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad celular (Fig. 11A y 11C). Ya se han reportado casos en los que aunque las células expresan el Epo-R, el estímulo con rhEpo no tienen efecto sobre la proliferación celular (Sartelet H *et al.*, 2007). Lo anterior podría deberse a que a pesar de que el Epo-R se fosforila, algunas moléculas necesarias para la señalización mediada por este receptor no se están activando. Por esto, otro objetivo de este trabajo fue determinar que vías de señalización se activaban en las células HEK293 y MSN luego del estímulo con Epo. En cultivos primarios de células tubulares renales humanas, se encontró

que el estímulo con Epo protegía a las células de los efectos de la hipoxia. Además, con 400 U/ml de Epo, la proliferación de estas células aumentaba (Vesey DA *et al.*, 2004). Estos datos no son comparables con los de este trabajo pues aquí las células se cultivaron siempre en normoxia y la dosis máxima empleada en los ensayos de proliferación fue de 50 U/ml. Sería interesante ver que ocurre en las células HEK293 si en condiciones de hipoxia reciben Epo. En las células MSN en cambio, el tratamiento con una dosis tan baja como 0.05 U/ml de rhEpo provocó que hubiera el doble de células viables en comparación con los cultivos de células que no recibieron Epo (Fig. 11B). El tratamiento con 10 U/ml de Epo provocó que a las 48 horas, el 68% de las células MSN estuviera en etapa de proliferación, mientras que en los cultivos sin tratamiento, únicamente el 3% de las células estaban proliferando (Fig. 11D). Esto contrasta con lo encontrado en otras líneas celulares derivadas de neuroblastoma, SH-SY5Y y Kelly, en donde la Epo no tuvo efecto sobre la proliferación celular (Rössler J *et al.*, 2004). Esto sugiere que aunque las células tengan el mismo origen, no se puede generalizar acerca de la respuesta a Epo. Por ejemplo, en un estudio realizado en seis líneas celulares de neuroblastoma, se encontró que el estímulo con Epo no tenía efecto sobre ninguna, pero además, aunque todas provenían de neuroblastomas, tres no expresaban al Epo-R, dos lo hacían de forma muy baja y una de manera moderada (Sartelet H *et al.*, 2007). Otro ejemplo de la diversidad que se presenta en las células aunque tengan un origen común y provengan del mismo tipo tumoral es lo encontrado en células de glioblastoma, un tipo de tumor que se desarrolla en el cerebro, en donde aunque cuatro líneas expresaban al Epo-R, únicamente una respondió al estímulo con Epo (Hassouna I *et al.*, 2008). Estos resultados son muy importantes porque la Epo no tuvo efecto sobre las células de origen renal pero pudo inducir la proliferación de células tumorales como las células MSN, lo que podría contribuir al crecimiento tumoral en los pacientes. Como el tratamiento de los neuroblastomas incluye el uso de fármacos como el etopósido y la vincristina (López-Aguilar E *et al.*, 2003) que no afectan únicamente a las células tumorales, sino también a órganos sanos como los riñones, el principal objetivo de este trabajo era determinar si la rhEpo tenía algún efecto sobre la muerte inducida por éstos fármacos en células renales sanas y en células de neuroblastoma.

Para esto, primero se determinó la DL 50 del etopósido para cada línea celular y se encontró que MSN era mucho más resistente al fármaco que HEK293 (Tabla 1). En líneas celulares de meduloblastoma y glioblastoma multiforme, ambos tumores del sistema nervioso central, se ha descrito que la mayor sensibilidad al etopósido se da cuando se activa p53, seguida de una activación del receptor para Fas que posteriormente activa al factor NFκB quien induce una muerte independiente de caspasas (Meley D *et al.*, 2010) que se ha sugerido podría ser la autofagia, pues se ha encontrado que NFκB puede inducir este tipo de muerte celular (Copetti T *et al.*, 2009). Las células que carecen de una p53 funcional (algo muy común en células tumorales) son las más resistentes al etopósido y dependen totalmente de la activación de la caspasa 3. Si no se activa NFκB, las células activan una muerte dependiente de caspasas y se consideran medianamente resistentes al etopósido. Se sabe que las células HEK293 que provienen de tejido sano, tienen a p53 en estado silvestre, en cambio pudiera ser que p53 estuviera mutada en las células MSN, lo que explicaría porque estas células son más resistentes al etopósido. También cuando se calculó la DL 50 de vincristina, la línea MSN fue más resistente. Se sabe que la resistencia a la vincristina está dada al menos parcialmente por la actividad de transportadores que se encargan de sacar el fármaco de la célula, siendo la proteína MRP1 (multidrug resistance-associated protein 1) la más importante (Akan I *et al.*, 2005), seguida de la glicoproteína P (Stefanková Z *et al.*, 1996). Por lo tanto, es probable que las dos líneas celulares tengan distinta actividad de dichas proteínas y que por tal motivo las DL 50 fueron significativamente diferentes. A pesar de que hay reportes en los que la Epo tuvo efectos protectores sobre la muerte de células renales después de un evento de isquemia (Liu L *et al.*, 2015), del tratamiento con mitomicina C (Rjiba-Touati K *et al.*, 2015) o del tratamiento con gentamicina (Rafieian-Kopaei M *et al.*, 2012) en este trabajo no se encontró que la rhEpo tuviera efectos protectores sobre la muerte inducida por etopósido (Fig. 12A) o vincristina (Fig. 12C) en las células HEK293. Los estudios mencionados previamente en donde la Epo protege a las células renales, han sido realizados en ratas o ratones, lo que difiere de este trabajo en donde las células HEK293 son de origen humano. Además, el mecanismo de acción de los distintos fármacos empleados en

los trabajos mencionados es distinto. Por ejemplo, la nefrotoxicidad causada por la gentamicina se da principalmente por necrosis, consecuencia de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), de la destrucción del ADN y de la activación de PARP (poli- (ADP ribosa) polimerasa) (Biro A *et al.*, 2016). El efecto de la Epo sobre la muerte inducida por la mitomicina C se debió a la disminución en la oxidación de proteínas y lípidos (Rjiba-Touati K *et al.*, 2015), lo que señala el papel de la Epo en la inhibición de muerte generada por ROS, lo que podría explicar también el efecto protector de la Epo en casos en los que se induce un evento isquémico y luego se reoxigena, ya que se sabe que en esos casos, la alta producción de ROS también es la causa de la muerte celular. En cambio, aunque durante el tratamiento con etopósido se generan especies reactivas de oxígeno, esto no es el principal mecanismo de inducción de muerte de este fármaco sino la muerte inducida por autofagia o la activación de caspasas como se mencionó anteriormente, y en el caso de la vincristina, un inductor de catástrofe mitótica, no hay generación de ROS (Yadav N *et al.*, 2015). Lo anterior señala que la Epo puede inhibir la muerte celular pero quizá en base al mecanismo de acción de cada fármaco. En un estudio realizado en pacientes que padecían linfoma de Hodgkin y cuyo tratamiento era a base de etopósido, se encontró que una dosis de 40,000U de rhEpo administrada semanalmente no modificó la respuesta al tratamiento ni el comportamiento tumoral (Engert A *et al.*, 2010), lo que es contrario a lo encontrado en las células de neuroblastoma MSN (Fig. 12B), en donde el pre-tratamiento con rhEpo protegió a las células de la muerte por etopósido dejando hasta un 15% más de células viables. Ya se había reportado que la Epo podía proteger de la muerte por etopósido, pero el estudio fue hecho en ratones y sobre las células formadoras de colonias eritroides presentes en la médula ósea (de Haan G *et al.*, 1995). Además, la rhEpo protegió a las células de neuroblastoma de la muerte inducida por vincristina (Fig. 12D) y en este caso hubo hasta 30% más células viables con 10U/ml de rhEpo. En tejido nervioso de rata, se encontró que la Epo disminuía la neurotoxicidad que provoca la administración intraperitoneal de vincristina (Kassem LA *et al.*, 2011), lo que sugiere que el tejido derivado del sistema nervioso, incluso el tumoral, es susceptible a los efectos de la rhEpo. También se ha reportado algo similar en células de

rabdomiosarcoma, un tumor pediátrico que se origina en el músculo estriado, en donde la Epo hace que las células se vuelvan resistentes al tratamiento con vincristina (Poniewierska-Baran A *et al.*, 2015). La muerte inducida por etopósido fue menos sensible al efecto de la Epo en comparación con la muerte inducida por vincristina pues los efectos protectores significativos comenzaron con 1 U/ml de Epo para el caso del etopósido y con 0.5 U/ml de Epo en el caso de la vincristina. Además la protección máxima fue de un 15% más de células vivas para el caso del etopósido y de un 30% en el caso del tratamiento con vincristina. Estas diferencias encontradas son muy importantes pues nuevamente sugieren que la rhEpo no afecta del mismo modo a todos los fármacos, por lo que sería necesario estudiar el efecto que tiene la Epo cuando se administra en conjunto con cada uno de los fármacos que se utilizan para tratar los neuroblastomas entre los que además del etopósido y la vincristina se encuentran el cisplatino, el carboplatino y la ciclofosfamida entre otros. En este trabajo únicamente se estudió el efecto de la rhEpo sobre la activación de la caspasa 3 (Fig. 12). Ambos fármacos inducen su activación y en ambos casos el pre-tratamiento con rhEpo inhibió esta activación en su totalidad en las células MSN a pesar de que la muerte por vincristina es más sensible a la rhEpo (Fig. 12F). Lo anterior podría deberse a que en la muerte inducida por etopósido y vincristina participan otras moléculas incluidas otras caspasas sobre las que la rhEpo podría tener efectos diversos. A pesar de que en las células MSN el pre-tratamiento con Epo inhibe por completo la activación de la caspasa 3 mediada tanto por etopósido como por vincristina, no se logró inhibir la muerte del 100% de las células en ningún caso, lo que refuerza la hipótesis anterior. Por ejemplo, ya se ha mencionado que en la muerte inducida por etopósido la inducción de autofagia es muy importante. En las células Hep3B que provienen de un hepato-carcinoma humano, el etopósido induce tanto apoptosis como autofagia, y el inhibir únicamente uno de estos mecanismos no inhibe en su totalidad la muerte provocada por este fármaco (Yoo SH *et al.*, 2012), por lo que se podría sugerir que en las células MSN no toda la muerte celular depende únicamente de la activación de la caspasa 3. Tampoco la muerte por vincristina depende en su totalidad de la activación de caspasas. En células de carcinoma renal, la inhibición de las

caspasas no inhibe la muerte inducida por vincristina en su totalidad (Cummings BS *et al.*, 2004). La muerte por catástrofe mitótica, que es el principal mecanismo de acción de la vincristina puede culminar en apoptosis independiente de caspasas o necrosis (Mansilla S *et al.*, 2006). Sería necesario evaluar el efecto del pre-tratamiento con Epo sobre la activación de otras caspasas así como de moléculas involucradas en muerte por necrosis o autofagia. Aunque no ha sido fácil determinar un marcador de necrosis, hoy se acepta el estudio de la liberación extracelular de HMGB1 (High mobility group box 1) (Nowak P *et al.*, 2010). Para estudiar autofagia, se puede determinar la expresión de LC3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3), involucrada en la formación de vacuolas autofagosomales (Glick D *et al.*, 2010). En las células HEK293, la rhEpo no inhibió la activación de la caspasa 3 que provocan los quimiofármacos, lo que podría estar cooperando en el hecho de que en estas células la Epo no tuvo efecto. Como se ha mencionado, para que la Epo pueda regular la proliferación o la inhibición de la muerte celular, es necesario que después de la unión a su receptor, los residuos de tirosina de la región citoplásmica de éste se fosforilen por JAK2 y a estos residuos se unan moléculas que desencadenen vías como JAK/STAT, PI3K/AKT y MAPK. Por lo anterior, el siguiente objetivo fue explorar cuáles de estas vías se activaban en cada una de las líneas celulares luego del estímulo con la rhEpo. Para esto, se realizó Western Blot para pSTAT5, pAKT y pERK1/2 luego del estímulo con 10 U/ml de rhEpo (Fig. 13). En las células MSN como era de esperarse, la Epo provocó la fosforilación de STAT5, AKT y ERK1/2, cosa que no ocurrió en las células HEK293, en donde la Epo únicamente provocó la fosforilación de STAT5. Esto podría ser la causa de que la Epo no provocó que las células HEK293 proliferaran y tampoco inhibió la muerte inducida por etopósido y vincristina. El hecho de que la rhEpo no tuviera efectos sobre la activación de AKT y ERK1/2 en HEK293 sugiere que estas vías son necesarias para que la rhEpo induzca efectos proliferativos o protectores y que no basta con la activación de STAT5. Por ejemplo, se ha reportado que la activación de ERK es necesaria en células de cáncer de mama (Fu P *et al.*, 2009) y en células de gliomas (Pérès EA *et al.*, 2011) para que la Epo induzca proliferación. En la células HEK293, como ya se había reportado previamente (Santi SA *et al.*, 2010; Wang HQ *et al.*,

2005), se encontró que AKT está constitutivamente activa. Aunque AKT normalmente se asocia con la inhibición de la muerte celular pues puede inducir la inhibición de proteínas pro-apoptóticas como Bad y por lo tanto la activación de caspasas como la 3, se ha encontrado que por otro lado AKT también puede regular la actividad de JNK, y que JNK participa en la citotoxicidad que induce el etopósido en células HEK293 (Jamshidiha M *et al.*, 2010) lo que podría estar interfiriendo con el efecto protector de la rhEpo. En las células MSN, la inhibición de JAK2 con tirfostina AG490 inhibió la activación de STAT5 (Fig. 14C) y como consecuencia el efecto protector de la rhEpo sobre la muerte por etopósido se abatió en su totalidad (Fig. 14A). En neuronas corticales de rata, también se ha encontrado que JAK2 participa en los efectos protectores de la Epo sobre la muerte inducida por S-nitrosocisteína (SNOC) (Digicaylioglu M., et al. 2001). La protección sobre la muerte inducida por vincristina no se inhibió por completo, únicamente en un 50%. Esto sugiere que hay otras moléculas que podrían fosforilar al receptor e iniciar cascadas de señalización que también estén involucradas en la protección que induce la rhEpo sobre la muerte inducida por este fármaco. Se ha encontrado por ejemplo que la rhEpo puede inducir también la activación de JAK3 y de STAT3 en células de tumores cervicouterinos (López TV et al., 2011), y se ha asociado la activación de STAT3 con la inhibición de la muerte por vincristina en células de linfoma (Huang X et al., 2012), lo que podría estar ocurriendo en las células MSN. Se ha encontrado que la neuroprotección inducida por Epo es mediada por la activación de AKT o ERK (Um M *et al.*, 2006; Zhang F *et al.*, 2006). Además la vía PI3K/AKT es la responsable del efecto protector que tiene la Epo sobre la muerte que inducen algunos quimiofármacos como el paclitaxel en células de cáncer de mama (Hardee M. et al., 2006) y la doxorubicina en cardiomiocitos de rata (Fu P et. al., 2007). En las células MSN tanto AKT como ERK se activaron luego del estímulo con Epo. Cuando se inhibió la activación de AKT (Fig. 15) y la de ERK (Fig. 16) el efecto de la Epo se abatió. En células neuronales de retina de rata se encontró que cuando Epo activa a AKT, la proteína Bad se fosforila en el residuo de serina 136 y que cuando la Epo activa a ERK, Bad se fosforila en el residuo de serina 112 (Shen J *et al.*, 2010). Cuando Bad se fosforila en estos residuos, libera a las proteínas anti-apoptóticas Bcl2 y Bcl-

xL, lo que promueve la supervivencia celular. Esto podría explicar lo observado en las células MSN. El hecho de que el estímulo con rhEpo no tuviera efecto en la activación de AKT y ERK en las células HEK293 podría deberse a que los residuos de tirosina necesarios para desencadenar dichas vías no se fosforilan en el Epo-R. Una posible causa de que no se fosforilen es que no estén presentes. Como ya se ha mencionado, se sabe que existen isoformas incompletas del Epo-R que aunque están ancladas a la membrana, están incompletos en la región citoplásmica (Arcasoy M et al. 2003) y se consideran reguladores negativos pues captan la Epo pero no inducen señalización. Cuando se realizaron las pruebas de RT-PCR para determinar si las células expresaban al Epo-R, se observó que las células HEK293 presentaban además de la banda correspondiente al Epo-R, otra banda de aproximadamente 400 pb, que podría codificar para una isoforma del Epo-R (Fig. 17). Debido al hecho de que la Epo únicamente tuvo efecto sobre la línea celular de neuroblastoma que sólo presentaba la banda correspondiente al Epo-R silvestre, pero no tuvo efecto sobre las células de origen renal que expresaban además una banda más pequeña a la correspondiente al Epo-R silvestre, se decidió estudiar cómo era la expresión del Epo-R en un par más de líneas celulares derivadas de neuroblastomas humanos y si la Epo se comportaba del mismo modo. Las dos líneas celulares que se incluyeron fueron SK-N-MC (neuroblastoma que había hecho metástasis al área supra-orbital, de donde se tomó la muestra) y SK-N-AS (neuroblastoma que había hecho metástasis a médula ósea, de donde se tomó la muestra). Estas líneas celulares expresaban únicamente la banda correspondiente al Epo-R silvestre, del mismo modo que el otro neuroblastoma estudiado, MSN (Fig. 17). En el sistema nervioso hoy se sabe que la hipoxia induce un aumento en la expresión del Epo-R (el mecanismo aún se desconoce) (Sanchez PE *et al.*, 2009), pero además, se sabe que la hipoxia puede modificar la expresión de isoformas del Epo-R (Soliz J *et al.*, 2007), por lo que se decidió analizar si la hipoxia modificaba la isoforma que se expresaba en las células HEK293 (Figura 18). En ninguna línea celular se observó cambio en la expresión del Epo-R silvestre, pero las condiciones hipóxicas hicieron que la presencia de la banda de aproximadamente 400 pb en la línea HEK293 desapareciera. Esto concuerda con lo encontrado en el cerebro de

ratón, en dónde cuando sometían a los animales a condiciones hipóxicas, la expresión del Epo-R soluble disminuía (Soliz J *et al.*, 2007). Cuando este receptor soluble, que funciona como regulador negativo de los efectos de la Epo, deja de expresarse, los animales pueden aclimatarse a las condiciones de bajo oxígeno. Lo anterior sugiere que cuando el sistema detecta una concentración baja de oxígeno, se prepara para poder utilizar toda la Epo disponible inhibiendo la expresión de reguladores negativos. Por ejemplo, en personas que habitan en regiones con una altitud mayor a los 2,500 metros sobre el nivel del mar, en dónde la concentración de oxígeno es menor hasta en un 40%, se ha encontrado que la concentración de Epo-R soluble en el plasma es menor en comparación con personas que viven a nivel del mar. Al no estar presente el Epo-R soluble, el receptor membranal puede captar toda la Epo disponible, lo que trae como consecuencia que se presente una eritrocitosis excesiva, lo que se conoce como mal de montaña o mal de altura, que se caracteriza por niveles de hemoglobina mayores a los 21 g/dl de sangre. De hecho, en personas que viven en esas mismas zonas altas, pero que no se presenta este mal, se ha encontrado que los niveles de Epo-R solubles son como de personas que viven a nivel del mar (Villafuerte FC *et al.*, 2014). Esto podría explicar porque las células HEK293 no respondieron al tratamiento con Epo, pues se debe recordar que en condiciones de normoxia, que fue en las condiciones en las que se realizaron los ensayos de proliferación y citotoxicidad, estas células presentan una isoforma del Epo-R que podría estar captando la Epo sin inducir señalización. Para resaltar la importancia de estos receptores incompletos que funcionan como reguladores negativos, se debe recordar que una de las isoformas que produce receptores incompletos existe en los progenitores eritroides de humanos sanos en donde regula negativamente los efectos de la Epo sobre la inhibición de la muerte celular (Nakamura Y *et al.*, 1992). Su expresión está disminuida en los progenitores eritroides de pacientes con *Policitemia vera* (Chiba S *et al.*, 1997), una enfermedad en la que se producen células rojas en exceso, lo que confirma su papel en la regulación negativa de los efectos de la Epo. En las células MSN, luego del cultivo en condiciones de hipoxia, se detectó la presencia de una banda también de aproximadamente 400 pb. Hasta el momento, no existen

reportes de casos en los que la baja concentración de oxígeno induzca la expresión de isoformas del Epo-R. Ya se ha reportado que puede haber cambios en el *splicing* alternativo de varios genes que participan en la respuesta a hipoxia ya sea mediante el aumento o la disminución de la expresión de isoformas (Weigand JE *et al.*, 2012; Sena JA *et al.*, 2014). La regulación de isoformas que se da en condiciones de hipoxia puede ser mediada por HIF, como ocurre con PDK1 (pyruvate dehydrogenase kinase 1) (Sena JA *et al.*, 2014), y en el 2011 se reportó que el factor de crecimiento nervioso (NGF) podía inducir la activación de HIF en condiciones de normoxia en células neuronales (Nakamura K *et al.*, 2011). A su vez en el 2012 se reportó que el ácido retinoico puede inducir a HIF1- α en células renales humanas también en normoxia (Fernández-Martínez AB *et al.*, 2012). Considerando que el NGF se ha planteado como tratamiento en algunos pacientes de neuroblastoma pues es un inductor de diferenciación neuronal y que el ácido retinoico se utiliza como tratamiento en algunos pacientes de neuroblastoma, se decidió investigar que ocurría con la expresión del Epo-R y su isoforma si se trataba a las células con estos factores como se utiliza en la práctica para diferenciar a las células de neuroblastoma a neuronas. Aunque sólo hubo cambios morfológicos notables en las células MSN y SK-N-MC luego del tratamiento con ácido retinoico y NGF (Fig. 19), cuando se realizó RT-PCR para estudiar la expresión del Epo-R luego del tratamiento con estos factores (Fig. 20), se encontró que el ácido retinoico por si solo únicamente tuvo efecto en las células SK-N-MC, en las cuales, el tratamiento con ácido retinoico provocó que se empezara a expresar la isoforma del Epo-R. El NGF por su parte provocó que la expresión de la isoforma en las células HEK293 se inhibiera, mientras que en las células SK-N-MC provocó su expresión. En las células MSN fue necesario que estuvieran presentes ambos factores al mismo tiempo para que las células empezaran a expresar la isoforma. En las células SK-N-AS ningún factor tuvo efecto en la expresión de la isoforma. La expresión del Epo-R silvestre no se vio afectada en ninguna línea celular con ninguno de los tratamientos. Los retinoides pueden inducir una marcada diferenciación neuronal en algunas células de neuroblastoma pero en otras su efecto es muy bajo, lo anterior al parecer se debe a que a pesar de que los neuroblastomas expresan constitutivamente los receptores para

ácido retinoico RAR α , RAR β y RAR γ y el receptor para retinoides X (RXR) no todas las líneas celulares expresan a RAR y RXR en las concentraciones óptimas para que se pueda inducir el crecimiento de neuritas y la apoptosis en dichas células (Nguyen T *et al.*, 2003). En especial cuando la expresión de RAR β es alta, las células se vuelven más sensibles al tratamiento con ácido retinoico (Cheung B *et al.*, 1998). Como todo parece indicar que el ácido retinoico puede inducir la expresión de isoformas del Epo-R pero no de la misma manera en las distintas células, podría ser que algunas líneas celulares como MSN y SK-N-AS tengan baja expresión del receptor RAR β y por eso fueron menos sensibles al tratamiento con ácido retinoico que las células SK-N-MC. En el riñón se sabe que son importantes los receptores RAR α y RAR β , y que si éstos no se expresan, los riñones presentan malformaciones (Mendelsohn C *et al.*, 1994). En células de carcinoma renal se encontró que al igual que en los neuroblastomas, una baja expresión de RAR β vuelve a las células menos sensibles al efecto del ácido retinoico (Hoffman AD *et al.*, 1996). En las células HEK293 la isoforma del Epo-R se expresa de manera natural como ocurre en otros tejidos no tumorales como los propios progenitores eritroides (Nakamura Y, *et al.*, 1992) y por RT-PCR no es posible determinar si el tratamiento con ácido retinoico aumenta esta expresión, sería necesario realizar RT-PCR en tiempo real. Otra posibilidad sería que en estas células la expresión de RAR β fuera baja y que el ácido retinoico no tuviera efecto en este caso sobre la isoforma del Epo-R y que la que se observa es la que ya está presente antes del tratamiento. Los resultados obtenidos con el NGF fueron extremadamente complejos y particulares dependiendo de la línea celular. Se sabe que la interacción del NGF con su receptor de alta afinidad TrkA y con su receptor de baja afinidad, p75, provoca respuestas celulares diversas dependiendo del tipo celular, la concentración del ligando, la duración del estímulo y la cantidad y tipo de receptor que se exprese. La respuesta va desde la proliferación celular, hasta la diferenciación neuronal e inducción de apoptosis (Roux PP, Barker PA 2002). El efecto del NGF sobre la expresión de isoformas del Epo-R no resultó menos complejo. En base a lo que se observa en la figura 20, y al esquema al final de esta discusión, se puede suponer que cuando NGF se une a p75, se induce la expresión de la isoforma del Epo-R, y

que dicha expresión se abate si NGF se une a TrkA. Como TrkA es el receptor de alta afinidad, si se encuentran ambos receptores presentes, la respuesta de éste será más rápida y contundente que la obtenida por la activación de p75, por lo que la expresión de la isoforma se mantendrá inhibida. Se sabe que las células SK-N-AS expresan ambos receptores (Ingraham CA *et al.*, 2011), por lo que el estímulo con NGF no logra inducir la expresión de la isoforma. En las células SK-N-MC, se ha reportado únicamente la expresión de p75 (Niederhauser O *et al.*, 2000), lo que estaría a favor de la hipótesis de que la unión de NGF a este receptor de baja afinidad induce la expresión de la isoforma. Sin embargo, se sabe que el estímulo con ácido retinoico puede provocar la expresión de TrkA en células de cáncer de pulmón (Fiorentini C *et al.*, 2002) y también en células de neuroblastoma (Haskell BE *et al.*, 1987) lo que podría explicar porque al tratar a estas células con ambos factores, la isoforma se inhibe. Pero no únicamente el ácido retinoico puede provocar la expresión de receptores para NGF, sino que el propio NGF es capaz de inducir la expresión de TrkA (Kojima M *et al.*, 1994), lo que podría estar ocurriendo en las células HEK293, en donde los reportes señalan que no hay expresión basal de TrkA (Zaccaro MC *et al.*, 2001) o p75 (Coulson EJ *et al.*, 2008), pero por el comportamiento de la expresión de la isoforma, que se abate cuando se trata con NGF, podríamos suponer que se induce la expresión de TrkA. Por último, en las células MSN, parece que es el ácido retinoico quien aunque no es capaz de inducir la expresión de la isoforma, probablemente debido a la baja concentración de receptores, si es capaz de inducir la expresión del receptor p75, (lo que se ha reportado sucede en neuronas simpáticas de rata (Kobayashi M *et al.*, 1994) ya que en este caso, la isoforma se expresa pero únicamente cuando se utilizan los dos factores juntos. Las 4 líneas celulares estudiadas aquí respondieron diferente al tratamiento con ácido retinoico y NGF, por lo que sería difícil sugerir una estrategia clínica para la modificación de isoformas del Epo-R con el uso de estos factores. El siguiente objetivo fue estudiar que ocurría con el efecto de la rhEpo sobre la muerte inducida por etopósido y vincristina en células que eran previamente tratadas con ácido retinoico, NGF o ambos factores en conjunto y si existía alguna relación entre el efecto de la rhEpo y la expresión de la isoforma del Epo-R. La DL50 se calculó para cada línea

celular y para cada fármaco luego del tratamiento con ácido retinoico, NGF o ambos en conjunto (Tabla 2). En las células HEK293 y MSN el pre-tratamiento con ácido retinoico confirió a las células mayor resistencia al etopósido, mientras que a las células SK-N-AS las volvió significativamente más sensibles. Los retinoides al unirse a sus receptores pueden tener efectos celulares que van desde el crecimiento celular y la diferenciación hasta la apoptosis. En células de cáncer de mama dependiendo de la línea celular el ácido retinoico puede favorecer o inhibir la muerte inducida por etopósido. El destino celular depende de la activación del factor nuclear NFκB. En las células en las que el ácido retinoico induce la activación del NFκB, éste a su vez induce la activación de la proteína anti-apoptótica cIAP2 (proteína inhibidora de la apoptosis 2), lo que trae como consecuencia que las células sean más resistentes al etopósido. La inhibición de la muerte también puede ser independiente de cIAP2 (Jiménez-Lara AM *et al.*, 2010). Se piensa que la activación de NFκB se da por la activación de la vía PI3K/AKT. De hecho, en la línea SHSY-5Y derivada de un neuroblastoma humano el tratamiento con ácido retinoico activa esta vía (López-Carballo G *et al.*, 2002). Es probable que esto sea lo que ocurrió en HEK293 y MSN. En cambio, en otras células, el tratamiento con ácido retinoico no provoca la activación de NFκB pero si la expresión de proteínas pro-apoptóticas como TRAIL y Fas, lo que vuelve a las células más sensibles al etopósido (Jiménez-Lara AM *et al.*, 2010), lo que podría haber ocurrido en SK-N-AS. El mecanismo de porque en algunas células los retinoides activan a NFκB y en otras no todavía se desconoce pero esto puede explicar porque el pre-tratamiento con ácido retinoico tuvo efectos distintos sobre la muerte inducida por etopósido. Del mismo modo, el NGF hizo que las células HEK293 y MSN se volvieran más resistentes al etopósido mientras que a las células SN-N-AS las volvió más sensibles. Aunque no hay reportes sobre el efecto del NGF en la muerte inducida por etopósido en particular, se ha reportado que en células con alta expresión de TrkA (como es el caso de las células SK-N-AS) el NGF puede favorecer la apoptosis (Jung EJ, Kim DR. 2008). Además, también en células con TrkA el NGF puede provocar un muerte conocida como macropinocitosis, que es independiente de la activación de las caspasas y que depende de la activación de PI3K de clase III luego de la unión del NGF

a su receptor (Li C *et al.*, 2010). Estos dos mecanismos podrían potenciar la muerte por etopósido en las células SK-N-AS, por lo que luego del tratamiento con NGF la dosis de etopósido necesaria para matar al 50% del cultivo disminuye. En cambio, en las células HEK293 y MSN el NGF hizo que éstas fueran más resistentes al etopósido. Estos resultados coinciden con lo que se ha reportado en células PC12, derivadas de feocromocitoma (tumor que se desarrolla en la médula de las glándulas adrenales) de rata (Nakajima M *et al.*, 1994). Se ha reportado que el NGF puede activar vías que favorecen la supervivencia celular como la vía PI3K/AKT o NFκB, uniéndose ya sea a TrkA o a p75 respectivamente (Molloy NH *et al.*, 2011), receptores cuya expresión puede ser estimulada por el propio NGF (Kojima M *et al.*, 1994; Chakravarthy R *et al.*, 2016). Debido a que estas vías pueden inhibir la muerte celular, se puede sugerir que la disminución de la muerte inducida por etopósido en las células HEK293 y MSN se debe a la activación de alguna de estas vías. Incluso, en cáncer de mama por ejemplo, ni siquiera es necesaria la actividad de cinasa de tirosina del receptor TrkA para que NGF confiera resistencia a las células ante el tratamiento con lestaurtinib, un análogo de la estaurosporina (Aubert L *et al.*, 2015). La unión del NGF a su receptor puede inducir que CD44 se una a TrkA y se active RhoA, lo que se asocia con agresividad tumoral. Estos mismos mecanismos podrían explicar que en MSN el NGF volvió a las células más resistentes al tratamiento con vincristina (Tabla 2). Las células SK-N-AS resultaron ser resistentes al tratamiento con vincristina. En células de mieloma múltiple se ha descrito que esta resistencia puede deberse a una sobre-expresión de la proteína anti-apoptótica survivina, que es precedida por un incremento en la activación de ERK1/2, AKT y NFκB (Tsubaki M *et al.*, 2015). También la sobre expresión de la proteína MD1 (multi-drug resistance protein 1) puede participar en la resistencia a la vincristina como se había mencionado antes (Tsubaki M *et al.*, 2015). Por esto, las células SK-N-AS fueron estudiadas únicamente con el tratamiento con etopósido. No hubo cambios significativos en la DL50 de etopósido, ni en la de vincristina en las células SK-N-MC cuando se pre-trataban con ácido retinoico, NGF o ambos. Estas células fueron por lo menos 50 veces más sensibles al etopósido en comparación con las otras líneas celulares, por lo que podría ser que la activación de vías antiapoptóticas

mediada por NGF o ácido retinoico no fuera suficiente para inhibir la muerte por este quimiofármaco. Además, se ha reportado que estas células pueden no responder al tratamiento con NGF (Sonnenfeld KH, Ishii DN 1982), lo que podría explicar porque la DL50 de vincristina tampoco tuvo cambios significativos. Cuando se probó el efecto de la rhEpo sobre la muerte inducida por etopósido y vincristina en células HEK293 que habían sido tratadas con NGF o ácido retinoico en conjunto con NGF, la rhEpo tuvo efecto por primera vez, disminuyendo más de 15% el porcentaje de células muertas con ambos fármacos (Fig. 21). Las células MSN que siempre habían respondido al tratamiento con rhEpo proliferando o con un número menor de células muertas, cuando fueron tratadas con NGF y ácido retinoico dejaron de responder a la rhEpo, y el porcentaje de células muertas aún con 10U/ml de rhEpo fue igual al de los cultivos que únicamente recibían la DL50 del etopósido o la vincristina (Fig. 22). Cuando las células SK-N-MC se trataron con ácido retinoico o NGF, la rhEpo no tuvo efecto sobre la muerte inducida por etopósido y vincristina, pero si se trataban con ambos factores juntos, la muerte por etopósido disminuía hasta en un 50%, es decir, con 10 U/ml de rhEpo el 100% de las células estaban vivas. Con vincristina, si las células habían sido tratadas con NGF y ácido retinoico, el porcentaje de células viables con 10 U/ml de rhEpo era del 97% luego de recibir la DL50 del quimiofármaco (Fig. 23). Por último, las células SK-N-AS siempre respondieron al tratamiento con rhEpo, sin importar si eran pre-tratadas con ácido retinoico, NGF o ambos, el porcentaje de células viables luego de recibir la DL50 de etopósido siempre fue mayor que cuando las células no recibían Epo (Fig. 24). Estos datos son de suma importancia pues los efectos de la rhEpo en la inhibición de la muerte celular siempre se relacionan inversamente con la expresión de la isoforma del Epo-R. Encontrar algún mecanismo que pudiera inducir la expresión de la isoforma del Epo-R podría ayudar a inhibir los efectos de la rhEpo para que no afectaran el tratamiento sobre las células tumorales. Para tratar de indagar cuál podría ser el mecanismo involucrado en la regulación de la isoforma del Epo-R por la hipoxia y el tratamiento con ácido retinoico y NGF, se decidió estudiar la expresión de HIF-1 α . Lo anterior, debido a que durante la hipoxia, la subunidad α del factor HIF-1 se estabiliza, lo que es el principio de la activación de este factor pues esta

sub-unidad puede entonces viajar al núcleo y unirse a la sub-unidad β , con lo que el factor queda activo y puede entonces inducir la transcripción de sus genes blanco. Además, tanto el ácido retinoico como el NGF pueden inducir la expresión de HIF en condiciones de normoxia (Fernández-Martínez AB *et al.*, 2012; Nakamura K *et al.*, 2011) y el NGF además puede inhibirlo (Naranjo-Suárez S *et al.*, 2003). En la figura 25A se puede observar que en las células HEK293, el tratamiento con ácido retinoico no provocó la expresión de HIF-1 α lo que coincide con la hipótesis propuesta anteriormente de que en estas células la expresión de los receptores para retinoides es baja y no es suficiente para provocar cambios. El NGF provocó la expresión de HIF-1 α probablemente luego de estimular la expresión de su propio receptor TrkA. En las células MSN se encontró que HIF-1 α se expresa constitutivamente tal y como ocurre en otras células tumorales (Akakura N *et al.*, 2001) (Fig. 25B). El ácido retinoico no tuvo efecto otra vez debido posiblemente a la baja expresión de receptores para éste en estas células. El tratamiento con NGF tampoco modificó la expresión basal de HIF-1 α pero cuando se trató a las células con ácido retinoico en y NGF en conjunto, la expresión de HIF-1 α se abatió, lo que sugiere que el ácido retinoico estimuló la expresión de p75 y que este, al ser activado por NGF inhibió a HIF-1 α . Aunque no hay reportes que señalen la inhibición de HIF-1 α mediada por p75 como tal, en gliomas se encontró que la expresión de p75 y HIF-1 α son inversamente proporcionales y que si bloquean a p75, la expresión de genes blanco de HIF-1 α como VEGF aumenta (Wang TC *et al.*, 2015), lo que sugiere que en algunos casos p75 puede inhibir a HIF-1 α . En las células SK-N-AS también se encontró la expresión constitutiva de HIF-1 α (Fig. 25D), la cual no se modificó con los tratamientos. A pesar de que no es posible concluir el papel de cada factor sobre la expresión de HIF-1 α pues el ácido retinoico puede inducir, pero también inhibir a HIF-1 α , y del mismo modo NGF puede inducir pero también inhibir a HIF-1 α , una conclusión valiosa de esta parte del trabajo es que en 3 de 4 líneas celulares estudiadas, cuando HIF-1 α estaba expresado, las células no expresaron la isoforma para Epo-R, y que cuando HIF-1 α dejaba de expresarse, se encontró la expresión de la isoforma del Epo-R. Mención aparte merecen las células SK-N-MC, en las que la expresión de HIF-1 α coincide con la expresión de la isoforma del Epo-R, contrario a lo

observado en las demás líneas celulares. En estas células, en las que se ha venido manejando la hipótesis de que tienen alta expresión de receptores para retinoides, el tratamiento con ácido retinoico provocó la inducción de HIF-1 α , lo que ya se ha reportado (Fernández-Martínez AB *et al.*, 2012). El NGF también provocó expresión de HIF-1 α , pero al poner los dos estímulos juntos, HIF-1 α no se expresó. Luego de todo esto, es claro que el ácido retinoico puede inducir la expresión de HIF-1 α y que el NGF puede inducir o inhibir su expresión, probablemente según al tipo de receptor que se una. Con este trabajo no es posible determinar los mecanismos implicados, ni las razones por las que el mismo factor puede tener el efecto contrario en células similares. Sin embargo, es de suma importancia recalcar que la expresión de HIF-1 α puede regular la expresión de la isoforma del Epo-R y que a su vez, HIF-1 α puede ser regulado por factores como el ácido retinoico o el NGF, lo que es de suma importancia pues como se mencionó anteriormente, de la presencia o ausencia de esta isoforma depende si la rhEpo afecta la muerte celular o no. La expresión de HIF-1 en tumores se asocia con tumores más agresivos, resistentes al tratamiento y que progresan rápidamente (Semenza GL 2002). Lo anterior debido en parte a que HIF-1 permite a las células adaptarse a las condiciones adversas entre otras cosas, promoviendo la expresión de genes que favorecen la activación de vías anti-apoptóticas. Podría ser que la inhibición de la expresión de la isoforma del Epo-R también cooperara en dicho pronóstico desfavorable por lo observado en este trabajo. En las células MSN, la hipoxia provocó la expresión de la isoforma del Epo-R al igual que el tratamiento con ácido retinoico y NGF en conjunto. Aunque se podría pensar que durante la hipoxia se activa HIF-1 α y que quizá esto estuviera provocando la expresión de la isoforma, esto no parece ser así, ya que el tratamiento con ácido retinoico y NGF más bien suprimió la expresión de HIF-1 α , lo que de hecho concuerda con lo encontrado en las células HEK293, en las que como se recordará, la falta de expresión de HIF-1 α se asocia con la expresión de la isoforma del Epo-R. Aunque sería necesario estudiar la expresión de HIF luego de someter a las células a condiciones de hipoxia, se puede sugerir que en estas células la hipoxia está provocando la expresión de HIF-2 α , quien se ha encontrado puede expresarse en neuroblastomas (Hamidian A *et al.*, 2015) ya que

además se encontró que en estas células HIF-1 α se expresa de manera constitutiva. Por último, se debe resaltar que la presencia o ausencia de la isoforma del Epo-R podría tener una importancia clínica muy importante, pues se podría separar a los pacientes en dos grupos dependiendo de si los tumores expresan ésta isoforma o no, para así determinar si se les puede administrar Epo para corregir la anemia o no, ya que cuando la isoforma está presente, las células no se ven afectadas por la rhEpo.

HIPÓTESIS DEL EFECTO DEL ÁCIDO RETINOICO Y NGF SOBRE LA EXPRESIÓN DE SUS RECEPTORES Y DE LA ISOFORMA DEL EPO-R.

Tratamiento	HEK 293	MSN	SK-N-MC	SK-N-AS	Línea celular
-	✓	X	X	X	Isoforma EPO-R
●	✓	X	✓	X	
★	X	X	✓	X	
●★	X	✓	X	X	

○ Baja expresión de receptores para retinoides.

El ácido retinoico no tiene efecto sobre la expresión de la isoforma del Epo-R, pero sí puede inducir la expresión de receptores para NGF.

● Alta expresión de receptores para retinoides.

El ácido retinoico es capaz de modificar la expresión de la isoforma del Epo-R.

● Ácido retinoico.

Induce la expresión de la isoforma del Epo-R si la expresión de sus receptores es suficiente.

↗ Inducción por ácido retinoico.

★ p75.

Si el NGF se une a este receptor, se induce la expresión de la isoforma del Epo-R, sin embargo, su afinidad por el NGF es baja.

★ TrkA.

Si el NGF se une a este receptor, se inhibe la expresión de la isoforma del Epo-R. Su afinidad por el NGF es alta, por lo que si también está p75, el efecto de TrkA tendrá prioridad.

● NGF.

Puede inducir o inhibir la expresión de la isoforma del Epo-R dependiendo del receptor al que se una.

↗ Inducción por NGF.

CONCLUSIONES

VIII.- CONCLUSIONES

- La Epo protege de la muerte inducida por etopósido y vincristina a células de neuroblastoma pero no a células de riñón. La protección en células de neuroblastoma es dependiente de la activación de las vías JAK/STAT, PI3K/AKT y MAPK.
- Las células de riñón embrionario humano y las células derivadas de neuroblastoma expresan al Epo-R pero no producen Epo.
- La Epo induce proliferación en células de neuroblastoma pero no tiene efecto en las células de riñón.
- La vincristina es más sensible al efecto protector de la Epo en comparación con el etopósido.
- Las células de riñón embrionario expresan además del Epo-R, una isoforma de éste.
- La hipoxia, el tratamiento con ácido retinoico y el estímulo con NGF pueden modificar la expresión de la isoforma del Epo-R.
- El tratamiento con ácido retinoico, así como el estímulo con NGF pueden modificar la expresión de HIF-1 α en células tanto de riñón como de neuroblastoma en condiciones de normoxia.
- La expresión de HIF-1 α regula negativamente la expresión de la isoforma del Epo-R.
- Cuando se expresa la isoforma del Epo-R, la Epo no tiene efecto sobre las células.

 PERSPECTIVAS 

IX.- PERSPECTIVAS

Los resultados encontrados en este trabajo señalan que la rhEpo puede modificar el comportamiento de células de neuroblastoma, induciendo su proliferación o inhibiendo la muerte por etopósido y vincristina, por lo que sería importante estudiar que ocurre en un modelo *in vivo*. También resultaría de interés estudiar si los efectos aquí encontrados son los mismos si se utilizan otros fármacos de los que se emplean para tratar el neuroblastoma, como el carboplatino, la doxorubicina y la ciclofosfamida. Aunque no se encontró efecto de la rhEpo en células de riñón embrionario (HEK293) sería necesario realizar los mismos ensayos en cultivos primarios de células renales para confirmar estos resultados. Además, es necesario secuenciar la isoforma del Epo-R encontrada aquí para determinar si es alguna isoforma ya reportada o una distinta. Debido a que la presencia de la isoforma resultó crucial en el comportamiento celular, sería necesario estudiar en biopsias de pacientes de neuroblastoma la expresión de isoformas del Epo-R, lo que podría resultar útil al momento de decidir si se utiliza rhEpo en ese paciente o no. Para tratar de comprender mejor como es que el ácido retinoico y el NGF modifican la expresión de la isoforma, es necesario determinar que receptores para estos factores se expresan en las células utilizadas de forma basal y cuales se inducen luego del propio estímulo con ácido retinoico o NGF. Por último, se podría estudiar la expresión de HIF-2 α , ya que los resultados sugieren que HIF está involucrado en la expresión de isoformas del Epo-R.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

X.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akakura N, Kobayashi M, Horiuchi I, Suzuki A, Wang J, Chen J, Niizeki H, Kawamura Ki, Hosokawa M, Asaka M. 2001. Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1 α renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation. *Cancer Res.* 61(17):6548-54.

Akan I, Akan S, Akca H, Savas B, Ozben T. 2005. Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) mediated vincristine resistance: effects of N-acetylcysteine and Buthionine sulfoximine. *Cancer Cell Int.* 24;5(1):22.

Allen NJ, Barres BA. 2009. Neuroscience: Glia — more than just brain glue. *Nature.* 457: 675-677

Alvarado CS, London WB, Look AT, Brodeur GM, Altmiller DH, Thorner PS, Joshi VV, Rowe ST, Nash MB, Smith EI, Castleberry RP, Cohn SL. 2000. Natural history and biology of stage A neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group Study. *J Pediatr Hematol Oncol.* 22(3):197-205.

Aoyama M, Asai K, Shishikura T, Kawamoto T, Miyachi T, Yokoi T, Togari H, Wada Y, Kato T, Nakagawara A. 2001. Human neuroblastomas with unfavorable biologies express high levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and a variety of its variants. *Cancer Lett.* 164(1):51-60.

Arcasoy MO, Jiang X, Haroon ZA. 2003. Expression of erythropoietin receptor splice variants in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 307(4):999-1007.

Arcasoy MO. 2008. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br J Haematol.* 141(1):14-31.

Aubert L, Guilbert M, Corbet C, Génot E, Adriaenssens E, Chassat T, Bertucci F, Daubon T, Magné N, Le Bourhis X, Toillon RA. 2015. NGF-induced TrkA/CD44 association is involved in tumor aggressiveness and resistance to lestaurtinib. *Oncotarget.* 6(12):9807-19.

Banati RB. 2003. Neuropathological imaging: in vivo detection of glial activation as a measure of disease and adaptive change in the brain. *Br Med Bull.* 65:121-31.

Batra S, Perelman N, Luck LR, Shimada H, Malik P. 2003. Pediatric tumor cells express erythropoietin and a functional erythropoietin receptor that promotes angiogenesis and tumor cell survival. *Lab Invest.* 83(10):1477–87.

Beck D, Gross N, Brognara CB, Perruisseau G. 1995. Expression of stem cell factor and its receptor by human neuroblastoma cells and tumors. *Blood.* 86(8):3132–8.

Birgegård G, Aapro MS, Bokemeyer C, Dicato M, Drings P, Hornedo J, Krzakowski M, Ludwig H, Pecorelli S, Schmoll H, Schneider M, Schrijvers D, Shasha D, Van Belle S. 2005. Cancer-related anemia: pathogenesis, prevalence and treatment. *Oncology.* 68 Suppl 1:3–11.

Biro A, Vaknine H, Cohen-Armon M, Matas Z, Fux A, Schreiber L, Berger E, Dan M, Boaz M, Gregoriev O, Katzir Z. 2016. The effect of poly (ADP-ribose) polymerase inhibition on aminoglycoside-induced acute tubular necrosis in rats. *Clin Nephrol.* 85(4):226–34.

Briggs WA, Gimenez LF. 1994. Clinical application of recombinant erythropoietin in predialysis renal failure. *Hematol Oncol Clin North Am.* 8(5):927–32.

Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A. 2000. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(19):10526–31.

Broudy VC, Lin N, Brice M, Nakamoto B, Papayannopoulou T. 1991. Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood.* 77:2583–2590

Brodeur GM, Bagatell R. 2014. Mechanisms of neuroblastoma regression. *Nat Rev Clin Oncol.* 11(12):704–13.

Buemi M, Allegra A, Corica F, Floccari F, D'Avella D, Aloisi C, Calapai G, Iacopino G, Frisina N. 2000. Intravenous recombinant erythropoietin does not lead to an increase in cerebrospinal fluid erythropoietin concentration. *Nephrol Dial Transplant.* 15(3):422–3.

Campana WM, Li X, Shubayev VI, Angert M, Cai K, Myers RR. 2006. Erythropoietin reduces Schwann cell TNF- α , Wallerian degeneration and pain-related behaviors after peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci.* 23(3):617–26.

Campana WM, Myers RR. 2001. Erythropoietin and erythropoietin receptors in the peripheral nervous system: changes after nerve injury. *FASEB J.* 15(10):1804–6.

Campana WM, Myers RR. 2003. Exogenous erythropoietin protects against dorsal root ganglion apoptosis and pain following peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci.* 18 (6):1497–506.

Campbell K, Götz M. 2002. Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci.* 25 (5) :235–8.

Copetti T, Bertoli C, Dalla E, Demarchi F, Schneider C. 2009. p65/RelA modulates BECN1 transcription and autophagy. *Mol Cell Biol.* 29(10):2594–608.

Coulson EJ, May LM, Osborne SL, Reid K, Underwood CK, Meunier FA, Bartlett PF, Sah P. 2008. p75 neurotrophin receptor mediates neuronal cell death by activating GIRK channels through phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci.* 28(1):315–24.
Cummings BS, Kinsey GR, Bolchoz LJ, Schnellmann RG. 2004. Identification of caspase-independent apoptosis in epithelial and cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 310(1):126–34.

Chakravarthy R, Mnich K, Gorman AM. 2016. Nerve growth factor (NGF)-mediated regulation of p75(NTR) expression contributes to chemotherapeutic resistance in triple negative breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 478(4):1541–7.

Cheung B, Hocker JE, Smith SA, Norris MD, Haber M, Marshall GM. 1998. Favorable prognostic significance of highlevel retinoic acid receptor beta expression in neuroblastoma mediated by effects on cell cycle regulation. *Oncogene.* 17:751–759

Chiba S, Takahashi T, Takeshita K, Minowada J, Yazaki Y, Ruddle FH, Hirai H. 1997. Selective expression of mRNA coding for the truncated form of erythropoietin receptor in hematopoietic cells and its decrease in patients with polycythemia vera. *Blood.* 90(1):97–104.

Chikuma M, Masuda S, Kobayashi T, Nagao M, Sasaki R. 2000. Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain, and uterus. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 279(6):E1242–8.

Da Motta LA, Galli P, Piva F, Maggi R. 1997. Effects of epidermal growth factor on the [3H]-thymidine uptake in the SK-N-SH and SH-SY5Y human neuroblastoma cell lines. *Arq Neuropsiquiatr.* 55(3A):444–51.

Damen JE, Wakao H, Miyajima A, Krosi J, Humphries RK, Cutler RL, Krystal G. 1995. Tyrosine 343 in the erythropoietin receptor positively regulates erythropoietin-induced cell proliferation and Stat5 activation. *EMBO J.* 14(22):5557–68.

Darnell JE Jr. 1997. STATs and gene regulation. *Science.* 277(5332):1630–5.

De Haan G, Engel C, Dontje B, Loeffler M, Nijhof W. 1995. Hemotoxicity by prolonged etoposide administration to mice can be prevented by simultaneous growth factor therapy. *Cancer Res.* 55(2):324–9.

Diem R, Sättler MB, Merkler D, Demmer I, Maier K, Stadelmann C, Ehrenreich H, Bähr M. 2005. Combined therapy with methylprednisolone and erythropoietin in a model of multiple sclerosis. *Brain.* 128(Pt 2):375–85.

Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Bauer C, Gassmann M. 1995. Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92(9):3717–20.

Digicaylioglu M, Lipton SA. 2001. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF- κ B signalling cascades. *Nature.* 412(6847):641–7.

Eggert A, Ikegaki N, Kwiatkowski J, Zhao H, Brodeur GM, Himelstein BP. 2000. High-level expression of angiogenic factors is associated with advanced tumor stage in human neuroblastomas. *Clin Cancer Res.* 6(5):1900–8.

Eggert A, Ikegaki N, Liu XG, Brodeur GM. 2000. Prognostic and biological role of neurotrophin-receptor TrkA and TrkB in neuroblastoma. *Klin Padiatr.* 212(4):200–5.

Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, Rüter E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Sirén AL. 2002. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med.* 8(8):495–505.

Ehrenreich H, Degner D, Meller J, Brines M, Béhé M, Hasselblatt M, Woldt H, Falkai P, Knerlich F, Jacob S, von Ahsen N, Maier W, Brück W, Rüter E, Cerami A, Becker W, Sirén AL. 2004. Erythropoietin: a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 9(1):42–54.

Engert A, Josting A, Haverkamp H, Villalobos M, Lohri A, Sökler M, Zijlstra J, Sturm I, Topp MS, Rank A, Zenz T, Vogelhuber M, Nogova L, Borchmann P, Fuchs M, Flechtner HH, Diehl V. 2010. Epoetin alfa in patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma: results of the randomized placebo-controlled GHSG HD15EPO trial. *J Clin Oncol.* 28(13):2239–45.

Fakhari M, Pullirsch D, Paya K, Abraham D, Hofbauer R, Aharinejad S. 2002. Upregulation of vascular endothelial growth factor receptors is associated with advanced neuroblastoma. *J Pediatr Surg.* 37(4):582–7.

Fernández-Martínez AB, Arenas Jiménez MI, Lucio Cazaña FJ. 2012. Retinoic acid increases hypoxia-inducible factor-1 α through intracrine prostaglandin E(2) signaling in human renal proximal tubular cells HK-2. *Biochim Biophys Acta.* 1821(4):672–83.

Fiorentini C, Facchetti M, Finardi A, Sigala S, Páez-Pereda M, Sher E, Spano P, Missale C. 2002. Nerve growth factor and retinoic acid interactions in the control of small cell lung cancer proliferation. *Eur J Endocrinol.* 147(3):371–9.

Fu P, Arcasoy MO. 2007. Erythropoietin protects cardiac myocytes against anthracycline-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 354(2):372–8.

Fu P, Jiang X, Arcasoy MO. 2009. Constitutively active erythropoietin receptor expression in breast cancer cells promotes cellular proliferation and migration through a MAPkinase dependent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379:696–701.

Gee JR, Keller JN. 2005. Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *Int J Biochem Cell Biol.* 37(6):1145–50.

Genc S, Kuralay F, Genc K, Akhisaroglu M, Fadiloglu S, Yorukoglu K, Fadiloğlu M, Gure A. 2001. Erythropoietin exerts neuroprotection in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated C57/BL mice via increasing nitric oxide production. *Neurosci Lett.* 298(2):139–41.

Glick D, Barth S, Macleod KF. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 221(1):3–12.

Hamidian A, von Stedingk K, Munksgaard Thorén M, Mohlin S, Pålman S. 2015. Differential regulation of HIF-1 α and HIF-2 α in neuroblastoma: Estrogen-related receptor alpha (ERR α) regulates HIF2A transcription and correlates to poor outcome. *Biochem Biophys Res Commun.* 461(3):560–7.

Hanani M. 2005. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res Brain Res Rev.* 48(3):457–76.

Hardee ME, Arcasoy MO, Blackwell KL, Kirkpatrick JP, Dewhirst MW. 2006. Erythropoietin biology in cancer. *Clin Cancer Res.* 12(2):332–9.

Hardee ME, Rabbani ZN, Arcasoy MO, Kirkpatrick JP, Vujaskovic Z, Dewhirst MW, Blackwell KL. 2006. Erythropoietin inhibits apoptosis in breast cancer cells via an Akt-dependent pathway without modulating in vivo chemosensitivity. *Mol Cancer Ther.* 5(2):356–61.

Harry GJ, Kraft AD. 2008. Neuroinflammation and microglia: considerations and approaches for neurotoxicity assessment. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 4(10):1265–77.

Haskell BE, Stach RW, Werrbach–Perez K, Perez–Polo JR. 1987. Effect of retinoic acid on nerve growth factor receptors. *Cell Tissue Res.* 247(1):67–73.

Hassouna I, Sperling S, Kim E, Schulz–Schaeffer W, Rave–Fränk M, Hasselblatt M, Jelkmann W, Giese A, Ehrenreich H. 2008. Erythropoietin augments survival of glioma cells after radiation and temozolomide. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 72(3):927–34.

Henke M, Laszig R, Rube C, Schäfer U, Haase KD, Schilcher B, Mose S, Beer KT, Burger U, Dougherty C, Frommhold H. 2003. Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 362(9392):1255–60.

Hoehner JC, Olsen L, Sandstedt B, Kaplan DR, Pahlman S. 1995. Association of neurotrophin receptor expression and differentiation in human neuroblastoma. *Am J Pathol.* 147(1):102–13.

Hoffman AD¹, Engelstein D, Bogenrieder T, Papandreou CN, Steckelman E, Dave A, Motzer RJ, Dmitrovsky E, Albino AP, Nanus DM. 1996. Expression of retinoic acid receptor beta in human renal cell carcinomas correlates with sensitivity to the antiproliferative effects of 13-cis-retinoic acid. *Clin Cancer Res.* 2(6):1077–82.

Huang X, Cao W, Iqbal J, Meng B, Ding B, Bi C, Jiang C, Ye H, Chan WC, Fu K. 2012. Constitutively activation of STAT3 is a prognostic factor in activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Research.* 72, vol 8, sup 1.

Ingraham CA, Wertalik L, Schor NF. 2011. Necdin and neurotrophin receptors: interactors of relevance for neuronal resistance to oxidant stress. *Pediatr Res.* 69(4):279–84.

Jamshidiha M, Habibollahi P, Ostad SN, Ghahremani MH. 2010. Primary WWOX phosphorylation and JNK activation during etoposide induces cytotoxicity in HEK293 cells. *Daru* 18:141-145.

Jelkmann W. 2004. Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med.* 43(8):649-59.

Jiménez-Lara AM, Aranda A, Gronemeyer H. 2010. Retinoic acid protects human breast cancer cells against etoposide-induced apoptosis by NF- κ B-dependent but cIAP2-independent mechanisms. *Mol Cancer.* 9:15.

Jung EJ, Kim DR. 2008. Apoptotic cell death in TrkA-overexpressing cells: kinetic regulation of ERK phosphorylation and caspase-7 activation. *Mol Cells.* 26(1):12-7.

Juul SE, Anderson DK, Li Y, Christensen RD. 1998. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res.* 43(1):40-9.

Juul SE, Ledbetter DJ, Joyce AE, Dame C, Christensen RD, Zhao Y, DeMarco V. 2001. Erythropoietin acts as a trophic factor in neonatal rat intestine. *Gut.* 49(2):182-9.

Kassem LA, Gamal El-Din MM, Yassin NA. 2011. Mechanisms of vincristine-induced neurotoxicity: Possible reversal by erythropoietin. *Drug Discov Ther.* 5(3):136-43.

Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, Kozaki S, Takahashi M. 2001. Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia. *J Biol Chem.* 276(42):39469-75.

Keswani SC, Leitz GJ, Hoke A. 2004. Erythropoietin is neuroprotective in models of HIV sensory neuropathy. *Neurosci Lett.* 371(2-3):102-5.

Kim YJ, Jung YW. 2010. Systemic injection of recombinant human erythropoietin after focal cerebral ischemia enhances oligodendroglial and endothelial progenitor cells in rat brain. *Anat Cell Biol.* 43(2):140-9.

Knoepfler PS, Cheng PF, Eisenman RN. 2002. N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes Dev.* 16(20):2699-712.

Kobayashi M, Kurihara K, Matsuoka I. 1994. Retinoic acid induces BDNF responsiveness of sympathetic neurons by alteration of Trk neurotrophin receptor expression. *FEBS Lett.* 356(1):60-5.

Kojima M, Ikeuchi T, Hatanaka H. 1994. Nerve growth factor induces TrkA mRNA expression in cultured basal forebrain cholinergic neurons from 17-day fetal rats. *Neurosci Lett.* 169(1-2):47-50.

Koshimura K, Murakami Y, Sohmiya M, Tanaka J, Kato Y. 1999. Effects of erythropoietin on neuronal activity. *J Neurochem.* 72(6):2565-72.

Koury MJ, Bondurant MC. 1992. The molecular mechanism of erythropoietin action. *Eur J Biochem.* 210(3):649-63.

Kumral A, Tugyan K, Gonenc S, Genc K, Genc S, Sonmez U, Yilmaz O, Duman N, Uysal N, Ozkan H. 2005. Protective effects of erythropoietin against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and oxidative stress in the developing C57BL/6 mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 160(2):146-56.

Larsson AM, Jirström K, Fredlund E, Nilsson S, Rydén L, Landberg G, Pålman S. 2009. Erythropoietin receptor expression and correlation to tamoxifen response and prognosis in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 15(17):5552-9.

Lasne F, de Ceaurriz J. 2000. Recombinant erythropoietin in urine. *Nature.* 405(6787):635.

Lehne RA. 2013. *Pharmacology for nursing care.* 8ª edición. Elsevier Saunders. St. Louis Missouri, EEUU.

Leyland-Jones B, BEST Investigators and Study Group. 2003. Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly. *Lancet Oncol.* 4(8):459-60.

Li C, Macdonald JI, Hryciw T, Meakin SO. 2010. Nerve growth factor activation of the TrkA receptor induces cell death, by macropinocytosis, in medulloblastoma Daoy cells. *J Neurochem.* 112(4):882-99.

Li J, Vesey DA, Johnson DW, Gobe G. 2007. Erythropoietin reduces cisplatin-induced apoptosis in renal carcinoma cells via a PKC dependent pathway. *Cancer Biol Ther.* 6(12):1944-50.

Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z. 1985. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82(22):7580-4.

Liu L, Liu C, Hou L, Lv J, Wu F, Yang X, Ren S, Ji W, Wang M, Chen L. 2015. Protection against ischemia/reperfusion induced renal injury by co treatment with erythropoietin and sodium selenite. *Mol Med Rep.* 12(6):7933–40.

Lopez TV, Lappin TR, Maxwell P, Shi Z, Lopez-Marure R, Aguilar C, Rocha-Zavaleta L. 2011. Autocrine/paracrine erythropoietin signalling promotes JAK/STAT-dependent proliferation of human cervical cancer cells. *Int J Cancer.* 129 (11), 2566–2576.

López-Aguilar E, Cerecedo-Díaz F, Rivera-Márquez H, Valdéz-Sánchez M, Sepúlveda-Vildósola AC, Delgado-Huerta S, Vera-Hermosillo H, Vázquez-Langle JR, Wanzke del Angel V. 2003. Neuroblastoma: factores pronósticos y sobrevida. Experiencia en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI y revisión de la literatura. *Gac Méd Mex.* 139: 209–214.

Lopez-Carballo G, Moreno L, Masia S, Perez P, Baretino D. 2002. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 277:25297–25304.

Magistretti PJ, Pellerin L. 1999. Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain. *News Physiol Sci.* 14:177–182.

Mansilla S, Priebe W, Portugal J. 2006. Mitotic catastrophe results in cell death by caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Cell Cycle.* 5(1):53–60.

Masuda S, Chikuma M, Sasaki R. 1997. Insulin-like growth factors and insulin stimulate erythropoietin production in primary cultured astrocytes. *Brain Res.* 746(1–2):63–70.

Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R. 1994. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem.* 269(30):19488–93.

Matsuoka I, Meyer M, Thoenen H. 1991. Cell-type-specific regulation of nerve growth factor (NGF) synthesis in non-neuronal cells: comparison of Schwann cells with other cell types. *J Neurosci.* 11(10):3165–77.

Matsushima H, Bogenmann E. 1994. NGF induces terminal differentiation in TrkA expressing neuroblastoma cells in vitro and in vivo. *Prog Clin Biol Res.* 385:177–83.

Meley D, Spiller DG, White MR, McDowell H, Pizer B, Sée V. 2010. p53-mediated delayed NF- κ B activity enhances etoposide-induced cell death in medulloblastoma. *Cell Death Dis.* 1:e41.

Mendelsohn C, Lohnes D, Décimo D, Lufkin T, LeMeur M, Chambon P, Mark M. 1994. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development.* 120(10):2749-71.

Mirmohammadsadegh A, Marini A, Gustrau A, Delia D, Nambiar S, Hassan M, Hengge UR. 2010. Role of erythropoietin receptor expression in malignant melanoma. *J Invest Dermatol.* 130(1):201-10.

Miu AC, Olteanu AI, Chiş I, Heilman RM. 2004. Have no fear, erythropoietin is here: erythropoietin protects fear conditioning performances after functional inactivation of the amygdala. *Behav Brain Res.* 155(2):223-9.

Miyake T, Kung CK, Goldwasser E. 1977. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem.* 252(15):5558-64.

Moeini M, Nematbakhsh M, Fazilati M, Talebi A, Pilehvarian AA, Azarkish F, Eshraghi-Jazi F, Pezeshki Z. 2013. Protective role of recombinant human erythropoietin in kidney and lung injury following renal bilateral ischemia-reperfusion in rat model. *Int J Prev Med.* 4(6):648-55.

Molloy NH, Read DE, Gorman AM. 2011. Nerve growth factor in cancer cell death and survival. *Cancers (Basel).* 3(1):510-30.

Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, Hatori K, Kobayashi S, Kim SU. 2001. Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60(4):386-92.

Nakajima M, Kashiwagi K, Ohta J, Furukawa S, Hayashi K, Kawashima T, Hayashi Y. 1994. Nerve growth factor and epidermal growth factor rescue PC12 cells from programmed cell death induced by etoposide: distinct modes of protection against cell death by growth factors and a protein-synthesis inhibitor. *Neurosci Lett.* 176(2):161-164.

Nakamura K, Tan F, Li Z, Thiele CJ. 2011. NGF activation of TrkA induces vascular endothelial growth factor expression via induction of hypoxia-inducible factor-1 α . *Mol Cell Neurosci.* 46(2):498-506.

Nakamura Y, Komatsu N, Nakauchi H. 1992. A truncated erythropoietin receptor that fails to prevent programmed cell death of erythroid cells. *Science*. 257, 1138–1141.

Naranjo-Suárez S, Castellanos MC, Álvarez-Tejado M, Vara A, Landázuri MO, del Peso L. 2003. Down-regulation of hypoxia-inducible factor-2 in PC12 cells by nerve growth factor stimulation. *J Biol Chem*. 278(34):31895–901.

Nguyen T, Hocker JE, Thomas W, Smith SA, Norris MD, Haber M, Cheung B, Marshall GM. 2003. Combined RAR alpha- and RXR-specific ligands overcome N-myc-associated retinoid resistance in neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 302(3):462–8.

Niederhauser O, Mangold M, Schubeneil R, Kusznir EA, Schmidt D, Hertel C. 2000. NGF ligand alters NGF signaling via p75(NTR) and TrkA. *J Neurosci Res*. 61(3):263–72.

Nordsmark M, Høyer M, Keller J, Nielsen OS, Jensen OM, Overgaard J. 1996. The relationship between tumor oxygenation and cell proliferation in human soft tissue sarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 35(4):701–8.

Nordsmark M, Overgaard M, Overgaard J. 1996. Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol*. 41:31–9.

Nowak P, Nystrom J, Troseid M. 2012. High levels of HMGB1 in plasma may be due to ex vivo cell necrosis. *Anticancer Res*. 32(9):4067–9.

Peiris-Pagès M, Harper SJ, Bates DO, Ramani P. 2010. Balance of pro- versus anti-angiogenic splice isoforms of vascular endothelial growth factor as a regulator of neuroblastoma growth. *J Pathol*. 222(2):138–47.

Pérès EA, Valable S, Guillamo JS, Marteau L, Bernaudin JF, Roussel S, Lechapt-Zalcman E, Bernaudin M, Petit E. 2011. Targeting the erythropoietin receptor on glioma cells reduces tumour growth. *Exp Cell Res*. 317(16):2321–32.

Pitts KR, Toombs CF. 2004. Coverslip hypoxia: a novel method for studying cardiac myocyte hypoxia and ischemia in vitro. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 287, H1801–1812.

Poniewierska-Baran A, Suszynska M, Sun W, Abdelbaset-Ismail A, Schneider G, Barr FG, Ratajczak MZ. 2015. Human rhabdomyosarcoma cells express functional erythropoietin receptor: Potential therapeutic implications. *Int J Oncol.* 47(5):1989-97.

Quelle FW, Wang D, Nosaka T, Thierfelder WE, Stravopodis D, Weinstein Y, Ihle JN. 1996. Erythropoietin induces activation of Stat5 through association with specific tyrosines on the receptor that are not required for a mitogenic response. *Mol Cell Biol.* 16(4):1622-31.

Raabe EH, Laudenslager M, Winter C, Wasserman N, Cole K, LaQuaglia M, Maris DJ, Mosse YP, Maris JM. 2008. Prevalence and functional consequence of PHOX2B mutations in neuroblastoma. *Oncogene.* 27(4):469-76.

Rafiee P, Shi Y, Su J, Pritchard KA Jr, Tweddell JS, Baker JE. 2005. Erythropoietin protects the infant heart against ischemia-reperfusion injury by triggering multiple signaling pathways. *Basic Res Cardiol.* 100(3):187-97.

Rafieian-Kopaei M, Nasri H, Nematbakhsh M, Baradaran A, Gheissari A, Rouhi H, Soleimani SMA, Baradaran-Ghahfarokhi M, Ghaed-Amini F, Ardalan M. 2012. Erythropoietin ameliorates gentamicin-induced renal toxicity: a biochemical and histopathological study. *J Nephropathol.* 21(2):109-116.

Ransom BR, Sontheimer H. 1992. The neurophysiology of glial cells. *J Clin Neurophysiol.* 9(2):224-51.

Ratajczak J, Majka M, Kijowski J, Baj M, Pan ZK, Marquez LA, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. 2001. Biological significance of MAPK, AKT and JAK-STAT protein activation by various erythropoietic factors in normal human early erythroid cells. *Br J Haematol.* 115(1):195-204.

Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, Nico B, Roncali L, Dammacco F. 1999. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood.* 93(8):2627-36.

Ribatti D, Poliani PL, Longo V, Mangieri D, Nico B, Vacca A. 2007. Erythropoietin/erythropoietin receptor system is involved in angiogenesis in human neuroblastoma. *Histopathology.* 50(5):636-41.

Rjiba-Touati K, Ayed-Boussema I, Belarbia A, Mokni M, Achour A, Bacha H, Abid S. 2015. Role of recombinant human erythropoietin against mitomycin C-induced cardiac, hepatic and renal dysfunction in Wistar rats. *Hum Exp Toxicol.* 34(5):468-78.

Rössler J, Stolze I, Frede S, Freitag P, Schweigerer L, Havers W, Fandrey J. 2004. Hypoxia-induced erythropoietin expression in human neuroblastoma requires a methylation free HIF-1 binding site. *J Cell Biochem.* 93(1):153-61.

Roux PP, Barker PA. 2002. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol.* 67(3):203-33.

Ruscher K, Freyer D, Karsch M, Isaev N, Megow D, Sawitzki B, Priller J, Dirnagl U, Meisel A. 2002. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J Neurosci.* 22(23):10291-301.

Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki S, Masuda S, Sasaki R. 1998. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun.* 253(1):26-32.

Saintigny P, Besse B, Callard P, Vergnaud AC, Czernichow S, Colombat M, Girard P, Validire P, Breau JL, Bernaudin JF, Soria JC. 2007. Erythropoietin and erythropoietin receptor coexpression is associated with poor survival in stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 13(16):4825-31.

Sanchez PE, Fares RP, Risso JJ, Bonnet C, Bouvard S, Le-Cavorsin M, Georges B, Moulin C, Belmeguenai A, Bodennec J, Morales A, Pequignot JM, Baulieu EE, Levine RA, Bezin L. 2009. Optimal neuroprotection by erythropoietin requires elevated expression of its receptor in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(24):9848-53.

Santi SA, Lee H. 2010. The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298:C580-C591.

Sartelet H, Fabre M, Castaing M, Bosq J, Racu I, Lagonotte E, Scott V, Lecluse Y, Barette S, Michiels S, Vassal G. 2007. Expression of erythropoietin and its receptor in neuroblastomas. *Cancer.* 110(5):1096-106.

Scala S, Wosikowski K, Giannakakou P, Valle P, Biedler JL, Spengler BA, Lucarelli E, Bates SE, Thiele CJ. 1996. Brain-derived neurotrophic factor protects neuroblastoma cells from vinblastine toxicity. *Cancer Res.* 56(16):3737-42.

Schousboe A, Sarup A, Bak LK, Waagepetersen HS, Larsson OM. 2004. Role of astrocytic transport processes in glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochem Int.* 45(4):521-7.

Segal RA, Greenberg ME. 1996. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci.* 19:463–89.

Semeza GL. 2002. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol. Med.* 8:S62–S67.

Sena JA, Wang L, Heasley LE, Hu CJ. 2014. Hypoxia regulates alternative splicing of HIF and non-HIF target genes. *Mol Cancer Res.* 12(9):1233–43.

Sharp FR, Bernaudin M. 2004. HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nat Rev Neurosci.* 5(6):437–48.

Shen J, Wu Y, Xu JY, Zhang J, Sinclair SH, Yanoff M, Xu G, Li W, Xu GT. 2010. ERK- and Akt-dependent neuroprotection by erythropoietin (EPO) against glyoxal-AGEs via modulation of Bcl-xL, Bax, and BAD. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51(1):35–46.

Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S. 2001. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci.* 21(24):9733–43.

Shiou SR, Yu Y, Chen S, Ciancio MJ, Petrof EO, Sun J, Claud EC. 2011. Erythropoietin protects intestinal epithelial barrier function and lowers the incidence of experimental neonatal necrotizing enterocolitis. *J Biol Chem.* 286(14):12123–32.

Simon T, Hero B, Faldum A, Handgretinger R, Schrappe M, Niethammer D, Berthold F. 2004. Consolidation treatment with chimeric anti-GD2-antibody ch14.18 in children older than 1 year with metastatic neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 22(17):3549–57.

Simon T, Spitz R, Faldum A, Hero B, Berthold F. 2004. New definition of low-risk neuroblastoma using stage, age, and 1p and MYCN status. *J Pediatr Hematol Oncol.* 26(12):791–6.

Sirén AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P. 2001. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98(7):4044–9.

Sirén AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Brück W, Ehrenreich H. 2001. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol.* 101(3):271–6.

Solar P, Feldman L, Jeong JY, Busingye JR, Sytkowski AJ. 2008. Erythropoietin treatment of human ovarian cancer cells results in enhanced signaling and a paclitaxel-resistant phenotype. *Int J Cancer.* 122(2):281–8.

Soliz J, Gassmann M, Joseph V. 2007. Soluble erythropoietin receptor is present in the mouse brain and is required for the ventilatory acclimatization to hypoxia. *J Physiol.* 583(Pt. 1):329–336.

Sonnenfeld KH, Ishii DN. 1982. Nerve growth factor effects and receptors in cultured human neuroblastoma cell lines. *J Neurosci Res.* 8(2–3):375–91.

Stefanková Z, Barancík M, Breier A. 1996. Overcoming of P-glycoprotein mediated vincristine resistance of L1210/VCR mouse leukemic cells could be induced by pentoxifyline but not by theophylline and caffeine. *Neoplasma.* 43(1):11–5.

Studer L, Csete M, Lee SH, Kabbani N, Walikonis J, Wold B, McKay R. 2000. Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci.* 20(19):7377–83.

Sugawa M, Sakurai Y, Ishikawa-Ieda Y, Suzuki H, Asou H. 2002. Effects of erythropoietin on glial cell development; oligodendrocyte maturation and astrocyte proliferation. *Neurosci Res.* 44(4):391–403.

Tanaka N, Fukuzawa M. 2008. MYCN downregulates integrin alpha1 to promote invasion of human neuroblastomacells. *Int J Oncol.* 33(4):815–21.

Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ. 2000. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med.* 6(5):529–35.

Temkin SM, Hellmann M, Serur E, Lee YC, Abulafia O. 2006. Erythropoietin administration during primary treatment for locally advanced cervical carcinoma is associated with poor response to radiation. *Int J Gynecol Cancer.* 16(5):1855–61.

Thiele CJ, Reynolds CP, Israel MA. 1985. Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature.* 313(6001):404–6.

Tsubaki M, Takeda T, Ogawa N, Sakamoto K, Shimaoka H, Fujita A, Itoh T, Imano M, Ishizaka T, Satou T, Nishida S. 2015. Overexpression of survivin via activation of ERK1/2, Akt, and NF- κ B plays a central role in vincristine resistance in multiple myeloma cells. *Leuk Res.* 39(4):445–52.

Um M, Lodish HF. 2006. Antiapoptotic effects of erythropoietin in differentiated neuroblastoma SH-SY5Y cells require activation of both the STAT5 and AKT signaling pathways. *J Biol Chem.* 281:5648–5656.

Vairano M, Dello Russo C, Pozzoli G, Battaglia A, Scambia G, Tringali G, Aloe-Spiriti MA, Preziosi P, Navarra P. 2002. Erythropoietin exerts anti-apoptotic effects on rat microglial cells in vitro. *Eur J Neurosci.* 16(4):584–92.

Van Golen CM, Soules ME, Grauman AR, Feldman EL. 2003. N-Myc overexpression leads to decreased beta1 integrin expression and increased apoptosis in human neuroblastoma cells. *Oncogene.* 22(17):2664–73.

Vaupel P. 2008. Hypoxia and aggressive tumor phenotype: implications for therapy and prognosis. *Oncologist.* 13 Suppl 3:21–6.

Vesey DA, Cheung C, Pat B, Endre Z, Gobé G, Johnson DW. 2004. Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury. *Nephrol Dial Transplant.* 19(2):348–55.

Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, Viviani B, Marinovich M, Cerami A, Coleman TR, Brines M, Ghezzi P. 2003. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med.* 198(6):971–5.

Villafuerte FC, Macarlupú JL, Anza-Ramírez C, Corrales-Melgar D, Vizcardo-Galindo G, Corante N, León-Velarde F. 1985. Decreased plasma soluble erythropoietin receptor in high-altitude excessive erythrocytosis and Chronic Mountain Sickness. *J Appl Physiol.* 117(11):1356–62.

Wald MR, Borda ES, Sterin-Borda L. 1996. Mitogenic effect of erythropoietin on neonatal rat cardiomyocytes: signal transduction pathways. *J Cell Physiol.* 167(3):461–8.

Wang HQ, Altomare DA, Skele KL, Poulidakos PI, Kuhajda FP, Di Cristofano A, Testa JR. 2005. Positive feedback regulation between AKT activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells. *Oncogene* 24:3574–3582.

Wang TC, Luo SJ, Lin CL, Chang PJ, Chen MF. 2015. Modulation of p75 neurotrophin receptor under hypoxic conditions induces migration and invasion of C6 glioma cells. *Clin Exp Metastasis*. 32(1):73–81.

Weber A, Maier RF, Hoffmann U, Grips M, Hoppenz M, Aktas AG, Heinemann U, Obladen M, Schuchmann S. 2002. Erythropoietin improves synaptic transmission during and following ischemia in rat hippocampal slice cultures. *Brain Res*. 2002. 958(2):305–11.

Weigand JE, Boeckel JN, Gellert P, Dimmeler S. 2012. Hypoxia-induced alternative splicing in endothelial cells. *PLoS One*. 7(8):e42697.

Wenker SD, Chamorro ME, Vota DM, Callero MA, Vittori DC, Nesse AB. 2010. Differential antiapoptotic effect of erythropoietin on undifferentiated and retinoic acid-differentiated SH-SY5Y cells. *J Cell Biochem*. 110(1):151–61.

Westenfelder C, Biddle DL, Baranowski RL. 1999. Human, rat, and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors. *Kidney Int*. 55(3):808–20.

Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Hörstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei UA, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Bachmann S, Maxwell PH, Eckardt KU. 2003. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *FASEB J*. 17(2):271–3.

Wu H, Klimgmuller U, Besmer P, Lodish HF. 1995. Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature*. 377:242–246.

Yadav N, Kumar S, Marlowe T, Chaudhary AK, Kumar R, Wang J, O'Malley J, Boland PM, Jayanthi S, Kumar TK, Yadava N, Chandra D. 2015. Oxidative phosphorylation-dependent regulation of cancer cell apoptosis in response to anticancer agents. *Cell Death Dis*. 6:e1969.

Yamaji R, Okada T, Moriya M, Naito M, Tsuruo T, Miyatake K, Nakano Y. 1996. Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA. *Eur J Biochem*. 239(2):494–500.

Yang Z, Wang H, Jiang Y, Hartnett E. 2014. VEGFA activates erythropoietin receptor and enhances VEGFR2-mediated pathological angiogenesis. *Am. J. Pathol*. 184:1230–1239.

Yoo SH, Yoon YG, Lee JS, Song YS, Oh JS, Park BS, Kwon TK, Park C, Choi YH, Yoo YH. 2012. Etoposide induces a mixed type of programmed cell death and overcomes the resistance conferred by Bcl-2 in Hep3B hepatoma cells. *Int J Oncol.* 41(4):1443-54.

Yousoufian H, Longmore G, Neumann D, Yoshimura A, Lodish HF. 1993. Structure, function, and activation of the erythropoietin receptor. *Blood.* 81(9):2223-36.

Zaccaro MC, Ivanisevic L, Perez P, Meakin SO, Saragovi HU. 2001. p75 Co-receptors regulate ligand-dependent and ligand-independent Trk receptor activation, in part by altering Trk docking subdomains. *J Biol Chem.* 276(33):31023-9.

Zhang F, Signore AP, Zhou Z, Wang S, Cao G, Chen J. 2006. Erythropoietin protects CA1 neurons against global cerebral ischemia in rat: potential signaling mechanisms. *J Neurosci Res.* 83:1241-1251.

Zhou H, Li XM, Meinkoth J, Pittman RN. 2000. Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J Cell Biol.* 151(3):483-94.

Zou YR, Zhang J, Wang J, Peng L, Li GS, Wang L. 2016. Erythropoietin Receptor Activation Protects the Kidney From Ischemia/Reperfusion-Induced Apoptosis by Activating ERK/p53 Signal Pathway. *Transplant Proc.* 48(1):217-2.

APÉNDICE

XI.- APÉNDICE

11.1 Buffer de corrida

28.8 g glicina

6 g Tris base

20 ml SDS al 10%

Aforar a 2 litros. El pH debe ser de 8.3.

11.2 Buffer RIPA

790 mg Tris base, pH 7.4

900 mg NaCl

10 ml de NP-40 al 10%

2.5 ml de deoxicolato de sodio al 10%

1 ml de EDTA 100 mM

Llevar a 100 ml con agua destilada y adicionar los siguientes inhibidores:

1 ml/100ml cocktail de inhibidores de fosfatasas (Sigma)

40 ml/ml cocktail de inhibidores de proteasas (Roche)

Almacenar a 4°C protegido de la luz.

11.3 Buffer de transferencia

25 ml Tris-HCl 1M

14.4 g glicina

200 ml metanol

Aforar a 1 litro.

11.4 Inactivación del suero fetal bovino (SFB)

El suero se incubó a 57 °C por 30 minutos en agitación constante.

11.5 PBS (Phosphate buffered saline)

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

Los componentes se disolvieron en 800 ml de agua destilada. Se ajustó el pH a 7.4 con ácido clorhídrico 0.1 M y se aforó a un litro. Se esterilizó 20 minutos en autoclave a 15 lb/sq.in. Se mantuvo a 4 °C.

11.6 Solución Hank's

0.4 g KCl

0.06 g KH₂PO₄

8 g NaCl

0.35 g NaHCO₃

0.09 Na₂HPO₄ · 7H₂O

1 g glucosa

Los componentes se disolvieron en 800 ml de agua destilada. Se ajustó el pH a 7.5 y se aforó a un litro. Se esterilizó 20 minutos en autoclave a 15 lb/sq.in. Se mantuvo a 4 °C.

11.7 Solución de MTT

El 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-bromuro de tetrazolio (MTT) (Sigma) se disolvió en PBS (1mg/ml, equivalente a 2.4 mM). La solución se filtró para su esterilización y fue almacenada a 4 °C protegida de la luz.

11.8 TBS

50 mM Tris-Cl

150 mM NaCl

Los componentes se disolvieron en 800 ml de agua destilada. Se ajustó el pH a 7.6 con ácido clorhídrico 0.1 M y se aforó a un litro. Se esterilizó 20 minutos en autoclave a 15 lb/sq.in. Se mantuvo a 4 °C.

 PUBLICACIONES 



Erythropoietin protects neuroblastoma cells against etoposide and vincristine by activating ERK and AKT pathways but has no effect in kidney cells

Maria Jose Vazquez-Mellado^{a,b}, Cecilia Aguilar^a, Leticia Rocha-Zavaleta^{a,*}

^a Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. CP 04510, Mexico

^b Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad de Posgrado, Edificio B Primer Piso, Ciudad Universitaria, México, D.F. CP 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 February 2015

Received in revised form 15 June 2015

Accepted 25 July 2015

Available online 30 July 2015

Keywords:

Erythropoietin
Neuroblastoma
Neuroprotection
Etoposide
Vincristine

ABSTRACT

Aims: Chemotherapy induces anaemia in neuroblastoma patients. Cancer-associated anaemia may be treated with recombinant erythropoietin. However, the potential effects of erythropoietin on neuroblastoma and kidney cells have not been extensively evaluated. The present study was designed to investigate the effect of erythropoietin on the proliferation, and protection against vincristine- and etoposide-induced cell death in neuroblastoma (MSN), and embryonic kidney (HEK 293) cells.

Main methods: The expression of erythropoietin and its receptor in MSN and HEK 293 was analysed by RT-PCR, immunocytochemistry, and Western blotting. The effect of erythropoietin on cell viability and proliferation was evaluated by the MTT assay, and by the Click-iT EdU Alexa Fluor 647 kit, respectively. For the cytoprotective assays, cells were incubated with erythropoietin before etoposide and vincristine treatment. Activation of signalling pathways was studied by Western blotting.

Key findings: MSN and HEK 293 cells expressed the erythropoietin receptor, but not erythropoietin. Erythropoietin induced proliferation and protection against vincristine and etoposide in MSN cells. HEK 293 cells were not affected by erythropoietin. Erythropoietin showed an anti-apoptotic effect which was dependent on the activation of ERK1/2 and AKT. HEK 293 cells presented constitutively phosphorylated AKT, and showed no activation of ERK1/2 upon erythropoietin stimulation.

Significance: These results indicate that erythropoietin induces proliferation of MSN cells, and that it can ameliorate vincristine- and etoposide-induced apoptosis of these cells. Erythropoietin-mediated neuroprotection was regulated by the combined effect of the ERK1/2 and AKT signalling pathways. Our findings provide further insights into the potential effect of erythropoietin on neuroblastoma cells.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Erythropoietin (Epo) was first described as a core element for erythropoiesis. Binding of Epo to its receptor (EpoR) on the surface of erythroid progenitors, promotes cell proliferation and differentiation and protects cells from apoptosis [16] by activating three leading signalling pathways: JAK/STAT, PI3K–AKT, and Ras–ERK [23]. Subsequent observations have demonstrated that the Epo/EpoR system is also active during development of the central and peripheral nervous system (NS) [15]. EpoR expression has also been documented in paediatric tumours of the brain and the sympathetic NS [2]. Moreover, it has been suggested that administration of Epo provides neuroprotection in infants with

hypoxic–ischemic encephalopathy [6]. However, the effect of exogenous Epo on cells from sympathetic NS tumours is less known.

Neuroblastoma is an embryonal tumour affecting the sympathetic NS [21]. It is the most frequently diagnosed cancer in infants under 1 year of age [13]. The neuroblastoma treatment depends on the age of the patient, the stage of the disease according to the International Neuroblastoma Staging System (INSS), and its level of risk. Low-risk, localised tumours (INSS stage 1 and stage 2) are normally treated with surgery. Intermediate-risk tumours with locoregional lymph-node extension (INSS stage 3) receive moderate-intensity chemotherapy. In contrast, high-risk metastatic tumours (INSS stage 4) are treated with a sequence of treatment modalities including dose-intensive chemotherapy [21], radiation, surgery and immunotherapy. Conventional chemotherapeutic treatment for neuroblastoma includes the use of cisplatin, etoposide, vincristine, doxorubicin, and cyclophosphamide. Children with high-risk neuroblastoma frequently develop anaemia as a result of nephrotoxic and myelotoxic chemotherapy, bone marrow

* Corresponding author at: Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Escolar s/n, Del. Coyoacán, México, D.F. CP 04510, Mexico.

E-mail address: lrochaz@biomedicas.unam.mx (L. Rocha-Zavaleta).

metastasis, malnutrition, and haemorrhage. Most of them require red blood cell transfusions [37].

Cancer-associated anaemia is a prevalent comorbidity of malignant tumours. For more than 20 years cancer-associated anaemia has been treated with recombinant Epo, and it improves the levels of haemoglobin and the quality of life and reduces the need for blood transfusions [33]. In addition, Epo has been documented to protect the kidney from the nephrotoxic effect of chemotherapeutic agents [25]. However, the use of Epo on neuroblastoma patients has not been extensively evaluated [37]. In addition, there is evidence showing that administration of Epo to tumour cells expressing EpoR induces cell proliferation [19] and tumour cell survival [2]. Since the expression of EpoR has been documented in neuroblastoma tumours and cell lines [2,27] a careful assessment of the potential impact of exogenous Epo would be valuable. Here, we explored the effect of Epo on the proliferation of the neuroblastoma-derived MSN cell line, and the human embryonic kidney HEK 293 cells. We also analysed the effect of exogenous Epo on cell death mediated by two conventional chemotherapeutic agents, etoposide and vincristine.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

Neuroblastoma-derived MSN cells [22] were cultured in RPMI:F12 medium (1:1) (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 15% foetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA). The cervical cancer-derived HeLa, human hepatoma HepG2, and human embryonic kidney HEK 293 cells were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA), and they were maintained in DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% heat-inactivated FBS. The K562 human chronic myelogenous leukaemia cell line (kindly donated by Dr. Juan J. Montesinos, Centro Medico Nacional Siglo XXI, Mexico City, Mexico) was maintained in 75 cm² flasks containing RPMI medium supplemented with 10% FBS. All cell lines were cultured in the presence of 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA), and were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere consisting 5% CO₂ and 95% air.

2.2. RNA isolation and RT-PCR

Total RNA was isolated from cells using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia CA) according to the protocol of the manufacturer. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using the SuperScript One-Step RT-PCR system (Qiagen, Valencia CA). Oligonucleotide sequences used were: EpoR forward 5'-GGC AGT GTG GAC ATA GTG GC-3', and EpoR reverse 5'-AGC AGG ATG GAT TGG GCA GA-3' for EpoR amplification; Epo forward 5'-ACT CTG CTT CGG GCT CTG GGA GCC CAG AAG-3', and Epo reverse 5'-AAG CAA TGT TGG TGA GGG AGG TGG TGG AT-3' for Epo amplification; and β-actin forward 5'-GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG-3', and β-actin reverse 5'-GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG-3' for β-actin amplification as an internal control. As a negative control a reaction containing water instead of RNA was included. Reverse transcription was performed at 50 °C for 30 min, using 50 ng total RNA and oligonucleotides at a final concentration of 0.6 µM. The PCR protocol was: 95 °C for 15 min, followed by 40 cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, followed by a final extension at 72 °C for 10 min. RNA from K562 cells was used as a positive control. The PCR products were analysed on 1% agarose gel, stained with ethidium bromide, and photographed with a Kodak Gel logic 200 image system (Rochester NY).

2.3. Immunoprecipitation and Western blot analysis

The cells were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% NP40; 0.25% sodium deoxycholate),

containing 100 µL/mL complete protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany) and 10 µL/mL phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Protein concentration was determined using the DC protein assay kit (BioRad Laboratories, Hercules, CA). For the immunoprecipitation, 500 µg of protein was incubated with protein A-agarose beads (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) previously coupled to a goat anti-human EpoR antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Proteins were resolved by 10% SDS-PAGE and transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Millipore, Billerica, MA). Membranes were incubated at 4 °C, overnight with specific antibodies diluted 1:1000 and then washed and incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies diluted 1:2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Proteins were detected by chemiluminescence using the Amersham ECL plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ). For the detection of human EpoR, a goat anti-human EpoR antibody was used, which was produced using a purified recombinant human erythropoietin soluble receptor as an immunogen (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). For the study of signalling cascades, rabbit anti-STAT5, rabbit anti-STAT5 (phospho-Tyr694), rabbit anti-AKT1 + 2 + 3, rabbit anti-AKT1 (phospho-Ser473), rabbit anti-ERK1 and ERK2 (ERK1/2) and rabbit anti-ERK (phospho-Thr185 + Thr202 + Tyr204 + Tyr187) antibodies (GeneTex Inc., Irvine, CA) were used. Apoptosis was studied by using a rabbit anti-caspase 3 (active) antibody (GeneTex Inc., Irvine, CA). Phosphorylation of EpoR was detected by using a mouse monoclonal anti-phosphotyrosine (clone 4G10) antibody from Upstate (Lake Placid, NY, USA). As an internal control, a rabbit anti-GAPDH antibody was included (GeneTex Inc., Irvine, CA).

2.4. Immunocytochemistry

Cells were fixed for 10 min in ice-cold acetone. After washing with phosphate-buffered saline (PBS) twice, the cells were incubated 30 min with 1% bovine serum albumin (BSA) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) in PBS-Tween (BioRad, Hercules, CA). The cells were then incubated overnight at 4 °C with the rabbit polyclonal anti-human Epo antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluted 1:100 in PBS-Tween. After washing with PBS, the slides were incubated with a secondary horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA) diluted 1:500 for 2 h at 37 °C. The slides were finally incubated with the DAB chromogen (Biocare Medical, Concord, CA), rinsed with water, counterstained with haematoxylin (Biocare Medical, Concord, CA) and mounted. Human hepatoma HepG2 cells were included as a positive control.

2.5. Cell viability and proliferation assays

Cells were stimulated with different concentrations of Epo (Laboratorios PiSA, Mexico City, Mexico) (0.01, 0.05, 0.5, 1, 10, and 50 U/mL) or left untreated. Cell viability was measured at 48 h using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) assay. The cells were incubated with 0.5 mg/mL MTT for 2 h at 37 °C. After dissolving formazan with isopropanol, the absorbance values (OD) at 570 nm were measured in an ELx800 plate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT). To evaluate the effect of Epo on cell proliferation, the cells were plated on coverslips and stimulated with 10 U/mL Epo 2 h and 24 h later. Cell proliferation was determined using the Click-iT EdU Alexa Fluor 647 imaging kit (Life Technologies/Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the protocol of the manufacturer. Briefly, the cells were treated with 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) for 6 h, and then fixed with 3.7% formaldehyde (J.T. Baker, Center Valley, PA) in PBS for 15 min at room temperature. After washing with PBS the cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in PBS for 20 min at room temperature. EdU was then detected by incubating the cells with the Click-iT reaction cocktail, and cell nuclei were stained with 5 µg/mL Hoechst

33342. The coverslips were mounted and the cells were analysed using an Olympus IX-71 fluorescence microscope.

2.6. Cytotoxicity and inhibition assays

The Lethal Dose, 50% (LD₅₀) of etoposide (Teva Pharmaceuticals, Mexico City, Mexico) and vincristine (Laboratorios PiSA, Mexico City, Mexico) was calculated for each cell line. To determine the effect of Epo on cell death the cells were plated in 96-well plates and incubated for 2 h. The cells were incubated with increasing concentrations of Epo (0.01–100 U/mL) for 2 h. Afterwards the cells were exposed to the LD₅₀ of etoposide or vincristine for 24 h. Cell viability was determined using the colorimetric MTT assay. The potential role of the different cell signalling cascades in Epo-mediated cell survival was analysed using specific inhibitors. To inhibit JAK2 phosphorylation, the cells were pre-incubated with 50 μ M Tyrphostin AG490 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluted in ethanol for 2 h. PI3K was inhibited by pre-incubating the cells with 100 nM Wortmannin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluted in DMSO for 30 min. To inhibit MEK1/2 kinases, the cells were pre-incubated with 20 μ M U0126 ethanolate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluted in DMSO for 1 h. Kinase inhibition was determined by Western blot analysis.

2.7. Statistical analysis

Results are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Differences between treatment groups were analysed using the ANOVA test, and Tukey–Kramer post-test. Confidence intervals (CI, 95%) and *p* values were calculated. The tests considered a basic significance level of *p* < 0.05 (Statistica, Dell, Aliso Viejo, CA).

3. Results

3.1. Expression of Epo and EpoR in neuroblastoma and kidney cells

Expression of EpoR was investigated in MSN and HEK 293 cells. RT-PCR analysis demonstrated the presence of the EpoR mRNA in both cell lines. The amplified fragments were of identical size to that detected in the control K562 cells (Fig. 1A). It is known that in order to be functional EpoR must be expressed as a cell surface receptor. Thus, we next analysed the presence of EpoR in membrane protein extracts by Western blot. As shown in Fig. 1B, a band of the expected molecular weight for EpoR (65 kD) was detected in MSN, HEK 293, positive control K562, and HeLa cells, that we previously reported to express membrane-associated EpoR [19]. After binding to its ligand, EpoR is phosphorylated by receptor-associated JAK2 molecules. To verify that the EpoR detected on the membrane of MSN and HEK 293 cells can be

activated by exogenous Epo we incubated the cells with 10 U/mL of Epo and analysed the time-course of EpoR phosphorylation by Western blotting. As seen in Fig. 1C, a clear phosphorylation of HEK 293 EpoR occurs after 60 s of exposure to the ligand. In contrast, a constitutively activated EpoR was detected in MSN cells, and the phosphorylation level was increased after 30 s incubation with Epo.

In a former report, the simultaneous expression of Epo and EpoR was demonstrated in primary neuroblastoma biopsies [2]. Thus, we next analysed the expression of Epo by RT-PCR, using HepG2 cells as the positive control. Results presented in Fig. 2A showed an amplified fragment of the predicted molecular weight for Epo mRNA in HepG2 cells. In contrast, neither MSN nor HEK 293 cells showed evidence of expression of the Epo gene. These observations were corroborated by immunocytochemistry. A clear cytoplasmic Epo immunostaining was observed in HepG2 cells, but it was absent in both MSN and HEK 293 cells (Fig. 2B).

3.2. Epo induces proliferation of MSN but not HEK 293 cells

Our results show that neuroblastoma- and kidney-derived cells express a functional, membrane-associated EpoR. Thus, to evaluate whether stimulation with exogenous Epo induces proliferation, MSN and HEK 293 cells were incubated with increasing concentrations of Epo for 48 h. As seen in Fig. 3A, the number of HEK 293 viable cells was not modified by the presence of Epo. In sharp contrast, Epo induced a significant increment of viable MSN cells from doses over 0.01 U/mL of Epo. The highest increment on the cell number was induced by 10 U/mL of Epo; thus this concentration was used in subsequent experiments. In order to demonstrate that Epo promotes cell proliferation, the cells were stimulated with 10 U/mL Epo for 48 h. The proportion of proliferating cells was determined by measuring the incorporation of EdU into DNA, and the results are shown in Fig. 3B. The proportion of proliferating HEK 293 cells was similar in cultures with (3.0%) and without (2.2%) Epo. However, the proportion of MSN cells undergoing active DNA synthesis was significantly higher in the presence of 10 U/mL Epo (68%) than that observed in the absence of Epo (3%). These observations show that Epo induces proliferation in the MSN but not HEK 293 cells.

3.3. Epo protects MSN but not HEK 293 cells from vincristine- and etoposide-induced cytotoxicity

It has been suggested that Epo induces protection from chemotherapy by activating specific survival pathways in cancer cells [32]. Thus, to address the question of whether incubation with Epo confers protection against the effect of chemotherapeutic drugs used for the treatment of neuroblastoma, the cell lines were pre-incubated with increasing concentrations of Epo before the administration of the calculated LD₅₀ of etoposide (67.9 μ M for HEK 293, and 230 μ M for MSN), and vincristine

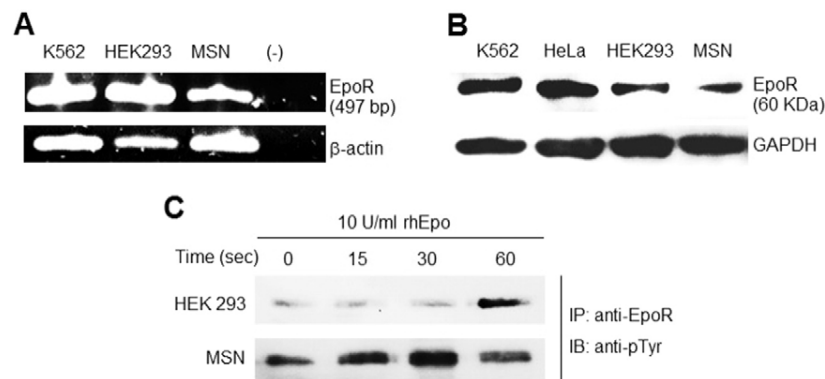


Fig. 1. Expression and activation of EpoR. Expression of EpoR was evaluated in HEK 293 and MSN cells by RT-PCR (A), and by Western blotting of cell membrane proteins (B). K562 and HeLa cell lines were included as positive controls. Expression of β -actin and expression of GAPDH were included as internal controls, respectively. (C) Activation of EpoR was evaluated by measuring the phosphorylation induced by 10 U/mL Epo at the indicated time points. EpoR was immunoprecipitated using a specific antibody (anti-EpoR), and proteins were visualised using an anti-phospho-tyrosine antibody (anti-pTyr).

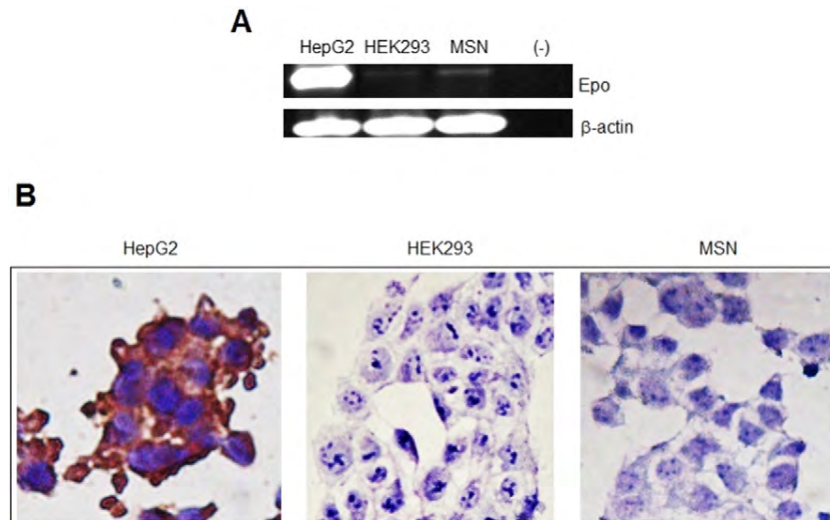


Fig. 2. Expression of endogenous Epo. Expression of endogenous Epo was evaluated in HEK 293 and MSN cells by RT-PCR (A), and immunocytochemistry (B). In both cases HepG2 cells were included as a positive control for the expression of Epo. For the immunocytochemistry assay Epo immunoreactivity is shown in red and all cells were counterstained with haematoxylin (blue). Expression of the constitutive β -actin gene was included as an internal control for the RT-PCR. As a negative control a reaction containing purified water instead of RNA was set (-).

(9.69 μ M for HEK 293, and 18 μ M for MSN). Upon treatment of HEK 293 with Epo and with etoposide we observed that only pre-incubation with 100 U/mL Epo induced a marginally significant increment of cell viability (Fig. 4A). However, no effect was detected when the cells were treated with Epo and with vincristine (Fig. 4B). Western blot analysis showed that Epo was not able to modify the activation of caspase 3 in cells treated with both, etoposide and vincristine (Fig. 4C). By contrast, treatment of MSN cells with doses over 1 U/mL Epo resulted in increased cell survival in the presence of etoposide (Fig. 4D). Likewise, pre-incubation of cells with Epo caused an increment on cell survival from doses over 0.5 U/mL in the presence of vincristine (Fig. 4E). Moreover, Western blot analysis demonstrated a reduction of cleaved caspase 3 in cells pre-treated with Epo compared with that observed in cell treated with either etoposide or vincristine alone (Fig. 4F). These

observations indicate that Epo protects MSN but not HEK 293 cells from apoptosis mediated by cytotoxic drugs.

3.4. Epo induces a differential activation of signalling pathways

Our observations showed that Epo has a different effect on HEK 293 and MSN cells. Thus to address the question of whether Epo activates different signalling pathways in these cell lines, we incubated the cells with Epo and then we analysed the activation of three signalling cascades at different time points by Western blot. The results are shown in Fig. 5. It is known that Epo induces the activation of the EpoR-associated JAK2 kinase. STAT5 is a canonical downstream target for JAK2; thus we investigated the phosphorylation of STAT5 after incubation with Epo. An increment in phosphorylation of STAT5 was evident

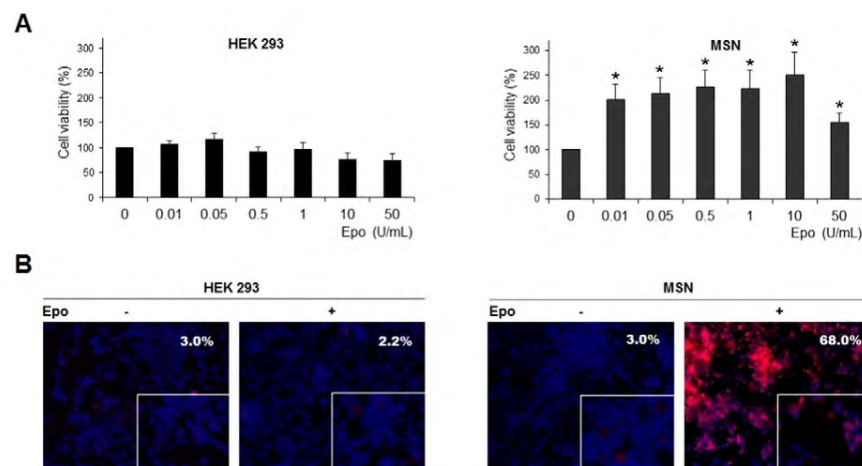


Fig. 3. Effect of exogenous Epo on cell viability. (A) HEK 293 and MSN cells were treated with the indicated concentrations of Epo for 48 h. Cell viability was evaluated using the MTT assay. Results represent the average of three independent tests. Error bars indicate the standard error of the mean. * $p < 0.05$ vs. untreated control values (Tukey–Kramer test). (B) Cell proliferation was evaluated by using the Click-iT EdU Alexa Fluor 647 (red fluorescence) imaging kit. Nuclei were stained with Hoechst 33342. A total of 1000 cells were counted on each experiment to determine the percentage of cells showing a positive staining. The image presented is representative of three independent experiments.

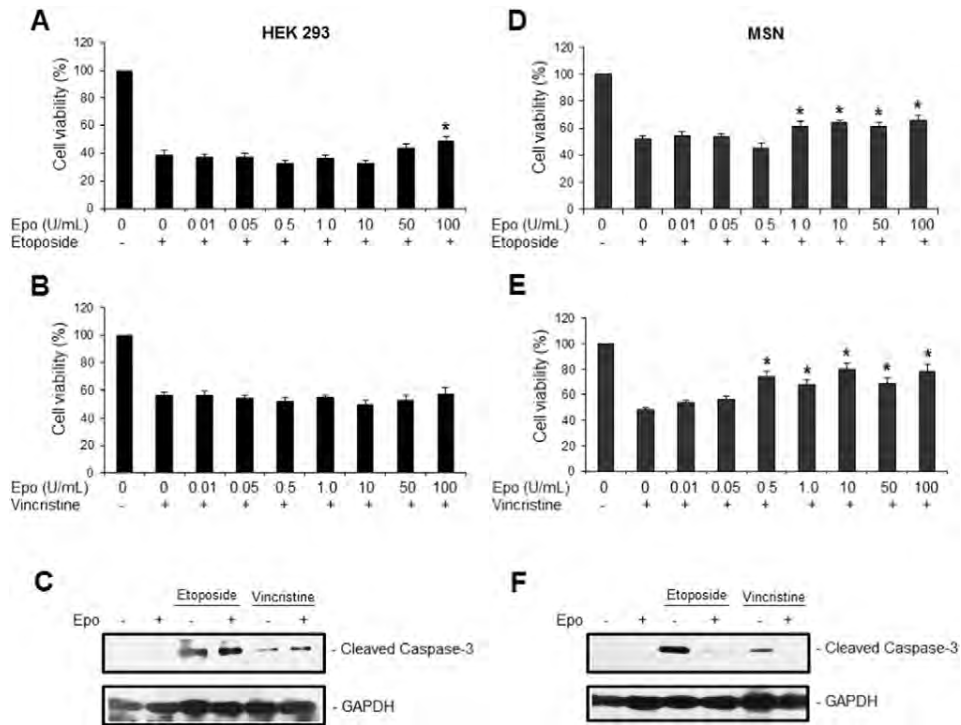


Fig. 4. Effect of Epo on etoposide- and vincristine-induced cell death. HEK 293 and MSN cells were pre-incubated with the indicated concentrations of Epo for 2 h. Then, the LD₅₀ of etoposide (A and D) or vincristine (B and E) was added. Cell viability was evaluated at 24 h using the MTT assay. Results represent the average of three independent assays. Error bars indicate the standard error of the mean. **p* < 0.05 vs. untreated control values (Tukey–Kramer test). Total protein extracts from treated and untreated HEK 293 (C) and MSN (F) cells were analysed for the activation of caspase-3 by Western blotting. GAPDH expression was included as internal control.

from 30 s to 2 h in both cell lines, with a maximum of activation at 15 and 5 min for HEK 293 and MSN cells, respectively. In contrast, AKT phosphorylation was observed after 5 min incubation of MSN cells with Epo, whereas in HEK 293 cells AKT was constitutively phosphorylated, even in the absence of Epo. The ERK1/2 kinases were activated in MSN cells after 15 min incubation with Epo. Interestingly, in HEK 293

cells a rather weak activation of ERK1/2 was observed only at 2 h incubation.

Our results indicate that Epo stimulates the activation of STAT5, AKT and ERK1/2 in MSN cells. Thus, to define the participation of these particular signalling cascades in the Epo-mediated protection against chemotherapy we pre-incubated the cells with specific inhibitors. STAT5

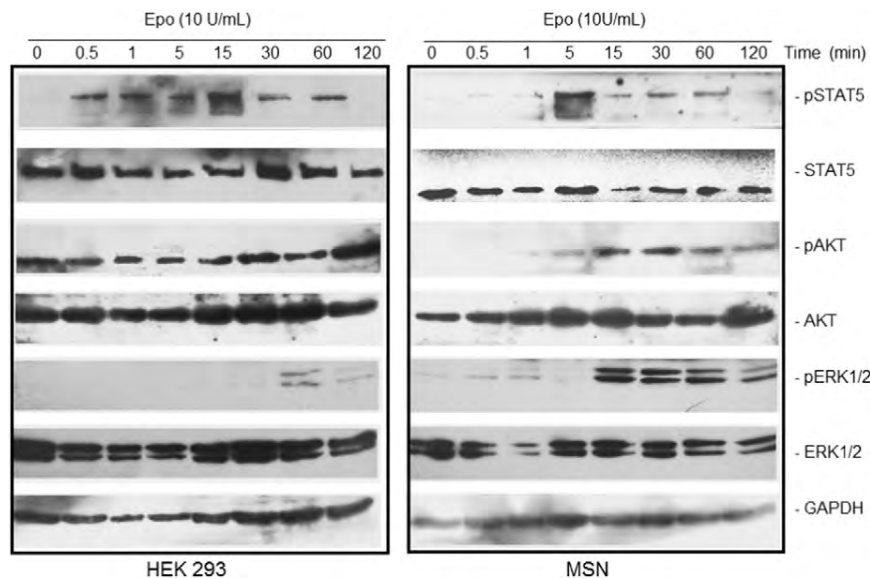


Fig. 5. Activation of cell signalling pathways by Epo. HEK 293 and MSN cells were incubated with Epo (10 U/mL). Total protein extracts were obtained at the indicated time points, and analysed by Western blotting using specific antibodies to STAT5, phospho-STAT5 (Tyr694) (pSTAT5), AKT, phospho-AKT (Ser473) (pAKT), ERK1/2, and ERK1/2 (Thr185 + Thr202 + Tyr204 + Tyr187) (pERK1/2). Expression of GAPDH was included as internal control.

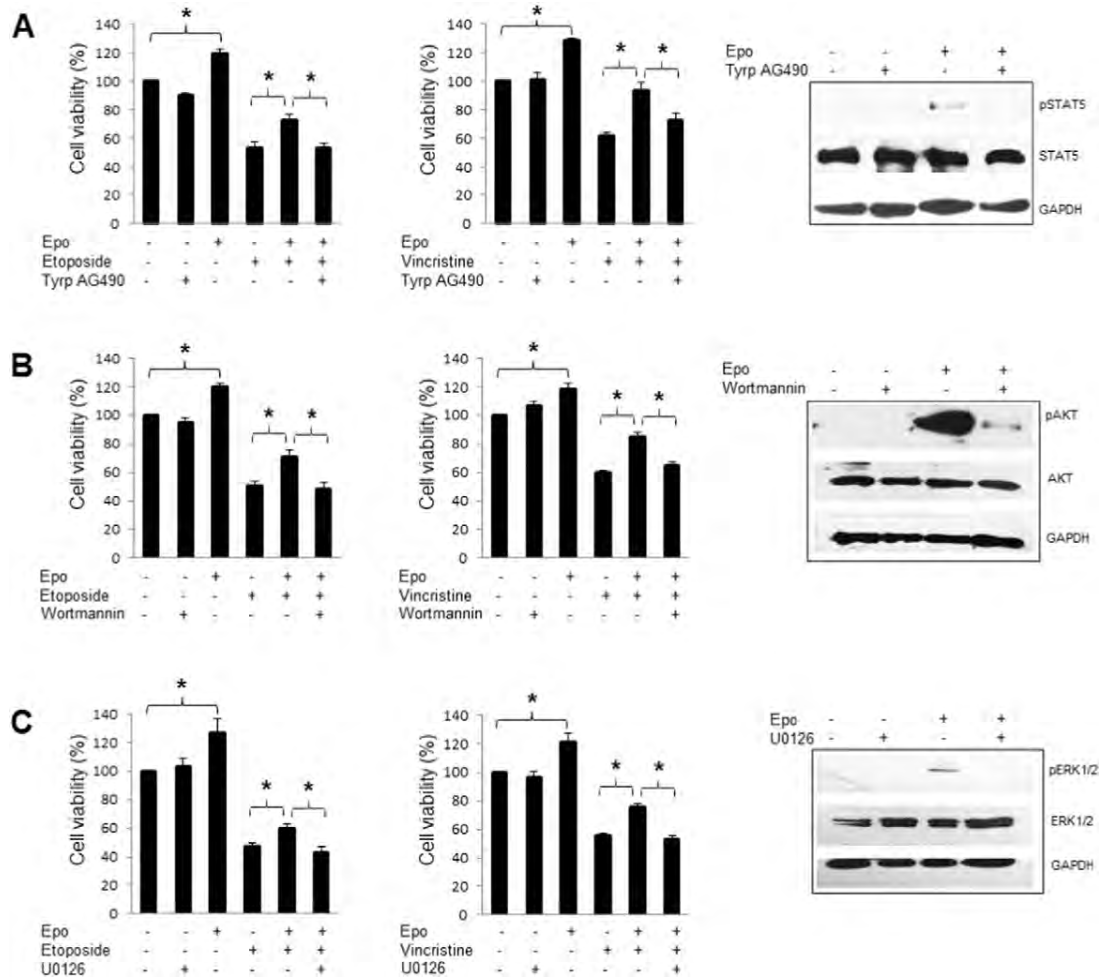


Fig. 6. Effect of the inhibition of cell signalling pathways. (A) To inhibit STAT5 phosphorylation, MSN cells were pre-incubated with 50 μ M Tyrphostin AG490 (Tyrp AG490) for 2 h. (B) To inhibit AKT activation, the cells were pre-incubated with 100 nM Wortmannin for 30 min. (C) To inhibit phosphorylation of ERK1/2, the cells were pre-incubated with 20 μ M U0126 ethanolate (U0126) for 1 h. Inhibition was determined by Western blot analysis of the phosphorylation of STAT5, AKT, and ERK1/2. Inhibited cells were incubated with Epo, and then treated with either etoposide or vincristine. Cell viability was evaluated at 24 h using the MTT assay. Results represent the average of three independent assays. Error bars indicate the standard error of the mean. * $p < 0.05$ vs. untreated control values (Tukey–Kramer test).

phosphorylation was blocked using Tyrphostin AG490, which inhibits the kinase activity of JAK2. As shown in Fig. 6A, pre-incubation with Tyrphostin AG490 inhibited STAT5 phosphorylation, and abolished the protective effect of Epo against both, etoposide-induced cytotoxicity and vincristine-induced cytotoxicity. Treatment of MSN cells with the PI3K kinase activity inhibitor Wortmannin, hindered the phosphorylation of AKT, and at the same time it abrogated the protective effect of Epo against cell death mediated by etoposide and vincristine (Fig. 6B). Treatment of cells with U0126 ethanolate, which obstructs the kinase activity of MEK1/2, thus preventing ERK1/2 from being phosphorylated, subverted the protective effect of Epo (Fig. 6C). These observations strongly suggest a concurrent participation of the three signalling pathways that might converge in the activation of common target genes with an anti-apoptotic activity.

4. Discussion

The major causal factor for neuroblastoma-associated anaemia in children is defective erythropoiesis, caused by infiltration of malignant cells into the bone marrow, and by the myelotoxic effect of chemotherapy [29]. Although erythropoietic agents, such as Epo, have been long used to treat cancer-associated anaemia in adults, their therapeutic value in infants has not been widely studied. Epo exerts its physiological effects by binding to its receptor. Here we found that both neuroblastoma MSN,

and kidney-derived HEK 293 cells express a functional, membrane-associated EpoR. The expression of EpoR has been documented in various neuroblastoma-derived cell lines [2]. Besides, immunohistochemical analysis of neuroblastoma samples has demonstrated that EpoR is expressed in neuroblastic cells [2], and that EpoR expression is significantly higher in lymph node metastasis compared with primary tumours [27]. Interestingly, although ectopic production of Epo by a neuroblastoma tumour was conclusively demonstrated in a 2-year-old patient [38], Epo expression in cell lines has not been proved significant [27]. This is in line with our finding that MSN cells do not express Epo. In addition, we observed that HEK 293 cells are also positive for the presence of EpoR, but do not express Epo. Expression of the EpoR mRNA in HEK 293 cells was previously detected in a microarray analysis [28]. In addition, we demonstrated that the receptor is expressed at the cell membrane compartment, and that incubation with Epo induces its phosphorylation. It is known that Epo is produced by the human adult kidney. However, we were not able to detect Epo expression in HEK 293 cells. This is in agreement with a former report showing that Epo is undetectable in HEK 293 cultures, unless the cells are transfected with specific transcriptional regulators [4].

Although expression of endogenous Epo was not detected in MSN cells, we observed that membrane-associated EpoR was activated even in the absence of its natural ligand. In this regard, EpoR is known to establish physical interactions with other cytokine receptors, in

particular, with members of the Receptor Tyrosine Kinase (RTK) family, such as c-Kit [40] and VEGFR [41]. It has been reported that activation of these RTKs by their cognate ligands, stem cell factor and VEGF, respectively, brings EpoR in physical proximity, thereby inducing its trans-phosphorylation. Interestingly, independent groups have shown that neuroblastoma cells are able to produce soluble VEGF [20], and that they also express VEGFR [7]. Furthermore, expression of the c-Kit receptor has been reported in particular subsets of neuroblastomas [17,36]. Additionally, co-expression of c-Kit and its ligand has also been described in neuroblastoma cells and tumours [3]. Thus, to determine whether the constitutive activation of EpoR observed herein is due to trans-phosphorylation, a study of the expression of RTKs will be needed.

The effect of Epo on neuroblastoma proliferation has been studied in a limited number of cell lines. Here we found that Epo induced the proliferation of MSN cells. In contrast, it has been shown that the addition of Epo to SH-SY5Y and Kelly cells has no effect on cell proliferation [24]. Likewise, incubation of six neuroblastoma-derived cell lines with different concentrations of Epo did not increase cell numbers [27]. However, it is worth noting that the expression of EpoR was absent in three of the aforementioned cell lines, it was low in two of them, and only moderate in one cell line [27]. Furthermore, a prior report showed that Epo stimulated proliferation in only one of four EpoR-expressing glioblastoma cell lines [10]. These observations suggest that the effects of Epo on a particular kind of tumour may not be consistent between cell lines. Unlike MSN, proliferation of HEK 293 cells was not stimulated by Epo. As far as we are aware, the effect of Epo on HEK 293 cells has not been previously evaluated. However, there are data suggesting that exposure of primary cultures of human renal proximal tubule cells to Epo stimulated proliferation [35]. However, these observations are not comparable with our results, since the former were obtained in cells subjected to hypoxia followed by reoxygenation, whereas our cells were maintained in normoxic conditions.

Dose-intensive cycles of cisplatin and etoposide alternating with vincristine are the core chemotherapeutic regimen for neuroblastoma [18]. These drugs are associated with significant acute and chronic myelotoxicity, nephrotoxicity, and neurotoxicity. Interestingly, there is evidence showing that Epo is able to confer protection to non-erythroid cells and tissues against injury through its anti-apoptotic, pro-regenerative, and cell differentiation effects [12]. Here we found that stimulation of MSN cells with Epo before treatment with etoposide or vincristine significantly increased cell survival. This is in agreement with former reports showing that Epo protects haematopoietic cells from etoposide-induced hemotoxicity *in vivo* [5] and *in vitro* [1]. Similarly, Kassem and colleagues reported that administration of vincristine to healthy rats caused a state of glutamate excitotoxicity both centrally and peripherally, and that concomitant application of Epo reversed vincristine-induced neurotoxicity [14]. Unlike MSN, cytotoxicity of etoposide and vincristine on HEK 293 cells was not modified by Epo.

Activation of the EpoR-associated JAK2 kinase occurs immediately after Epo binding, and further phosphorylation of STAT5 by JAK2 has been documented in various types of cancer [19,31]. Here we observed the activation of STAT5 in both HEK 293 and MSN cell lines. Inhibition of JAK2 phosphorylation by Tyrphostin AG490, produced a lack of STAT5 activation, and as a consequence the cyto-protective effect of Epo on MSN cells decreased significantly. However, although STAT5 was activated by Epo in HEK 293, we did not detect an effect on either proliferation or cyto-protection. It is well known that Epo stimulates three main signal transduction pathways: JAK/STAT, PI3K/AKT, and Ras/ERK. It has been shown that proliferation of breast cancer cells is promoted by Epo via activation of ERK [9]. Here, we observed that incubation with Epo induced an extremely weak activation of ERK1/2 in HEK 293, and this may explain the lack of a proliferative effect. On the other side, as others previously observed [26,39] we found that AKT was constitutively activated in HEK 293. Interestingly, it has been postulated that AKT is able to regulate JNK activity [8], and that JNK inhibition enhances etoposide induced cytotoxicity in HEK 293 [11]. Thus, it would be

possible that constitutive activation of AKT may be hampering the potential cyto-protective effect of Epo.

Epo-mediated neuroprotection has been attributed to the activation of the ERK and/or AKT signalling cascades [34,42]. In our model, both AKT and ERK1/2 were activated by Epo in MSN cells. In fact, inhibition of either molecule resulted in complete abrogation of Epo neuroprotection. Recently, a dynamic model of feedback and crosstalk between signal transduction circuits involving different members of the MAPK network (ERK, p38, and JNK) and AKT was developed [8], and demonstrated the activation of positive and negative feedbacks depending on the cellular and microenvironment context. We observed that Epo neuroprotection was due to an anti-apoptotic effect, as demonstrated by the inhibition of caspase-3 activation. BAD is a key regulator of apoptosis, and by binding to the anti-apoptotic Bcl-2/Bcl-xL proteins it neutralises their effect. However, phosphorylation at Ser¹¹² and Ser¹³⁶ triggers dissociation of BAD from Bcl-2/Bcl-xL, promoting cell survival. Interestingly, it has been demonstrated that Epo-activated AKT signalling induces BAD phosphorylation at Ser¹³⁶, whereas Epo-stimulated ERK signalling is essential for Ser¹¹² phosphorylation in a model of retinal neuronal cells [30]. Further research is in progress to determine whether a similar positive interaction between AKT and ERK is induced by Epo in neuroblastoma cells, resulting in the observed cytoprotective effect.

5. Conclusions

Taken together our results indicate that Epo induces proliferation and cytoprotection against etoposide and vincristine in MSN but not HEK 293 cells. The cytoprotective effect is mediated by the establishment of a positive interaction between the ERK1/2 and AKT transduction cascades promoting anti-apoptotic signals. Further research will be needed to better characterise such interaction, and to determine the potential implication for neuroblastoma treatment.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, grant: 152492) and PAPIIT (grant: IN209613). The present work was performed in partial fulfilment of the requirements for the PhD degree in Biomedical Sciences of M.J.V.-M. at the Universidad Nacional Autónoma de México, with doctoral scholarships from CONACyT (reg. number: 239704), and PAPIIT (grant: IN209613). The authors thank Patricia Ferrara for technical assistance.

References

- [1] M. Ahmed, I. Dusanter-Fourt, M. Bernard, P. Mayeux, R.G. Hawley, T. Bennardo, S. Novault, M.L. Bonnet, S. Gisselbrecht, B. Varet, A.G. Turhan, BCR-ABL and constitutively active erythropoietin receptor (cEpoR) activate distinct mechanisms for growth factor-independence and inhibition of apoptosis in Ba/F3 cell line, *Oncogene* (1998) 489–496.
- [2] S. Batra, N. Perelman, L.R. Luck, H. Shimada, P. Malik, Pediatric tumor cells express erythropoietin and a functional erythropoietin receptor that promotes angiogenesis and tumor cell survival, *Lab. Invest.* 83 (2003) 1477–1487.
- [3] D. Beck, N. Gross, C.B. Brognara, G. Perruisseau, Expression of stem cell factor and its receptor by human neuroblastoma cells and tumors, *Blood* 86 (1995) 3132–3138.
- [4] C. Dame, K.M. Kirschner, K.V. Bartz, T. Wallach, C.S. Hussels, H. Scholz, Wilms tumor suppressor, Wt1, is a transcriptional activator of the erythropoietin gene, *Blood* 107 (2006) 4282–4290.
- [5] G. De Haan, C. Engel, B. Dontje, M. Loeffler, W. Nijhof, Hemotoxicity by prolonged etoposide administration to mice can be prevented by simultaneously growth factor therapy, *Cancer Res.* 55 (1995) 324–329.
- [6] H. Elmahdy, A.-R. El-Mashad, H. El-Bahrawy, T. El-Gohary, A. El-Barbary, H. Aly, Human recombinant erythropoietin in asphyxia neonatorum: pilot trial, *Pediatrics* 125 (2010) e1135–e1142.
- [7] M. Fakhari, D. Pullirsch, K. Paya, D. Abraham, R. Hofbauer, S. Aharinejad, Upregulation of vascular endothelial growth factor receptors is associated with advanced neuroblastoma, *J. Pediatr. Surg.* 37 (2002) 582–587.

- [8] D. Fey, D.R. Croucher, W. Kolch, B.N. Kholodenko, Crosstalk and signalling switches in mitogen-activated protein kinase cascades, *Front. Physiol.* 18 (2012) 355.
- [9] P. Fu, X. Jiang, M.O. Arcasoy, Constitutively active erythropoietin receptor expression in breast cancer cells promotes cellular proliferation and migration through a MAP-kinase dependent pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379 (2009) 696–701.
- [10] I. Hassouna, S. Sperling, E. Kim, W. Schulz-Schaeffer, M. Rave-Frank, M. Hasselblatt, W. Jelkmann, A. Giese, H. Ehrenreich, Erythropoietin augments survival of glioma cells after radiation and temozolomide, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 72 (2008) 927–934.
- [11] M. Jamshidiha, P. Habibollahi, S.N. Ostad, M.H. Ghahremani, Primary WWOX phosphorylation and JNK activation during etoposide induces cytotoxicity in HEK293 cells, *Daru* 18 (2010) 141–145.
- [12] D.W. Johnson, C. Forman, D.A. Vesey, Novel renoprotective actions of erythropoietin: new uses for an old hormone, *Nephrology (Carlton)* 11 (2006) 306–312.
- [13] P. Kaatsch, Epidemiology of childhood cancer, *Cancer Treat. Rev.* 36 (2010) 277–285.
- [14] L.A. Kassem, M.M. Gamal El-Din, N.A. Yassin, Mechanisms of vincristine-induced neurotoxicity: possible reversal by erythropoietin, *Drug Discov. Ther.* 5 (2011) 136–143.
- [15] W. Knabe, A.-L. Siren, H. Ehrenreich, H.-J. Khun, Expression patterns of erythropoietin and its receptor in the developing spinal cord and dorsal root ganglia, *Anat. Embryol.* 210 (2005) 209–219.
- [16] M.J. Koury, M.C. Bondurant, Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells, *Science* 248 (1990) 378–381.
- [17] M. Krams, R. Parwaresch, B. Sipos, K. Heidorn, D. Harms, P. Rudolph, Expression of the c-kit receptor characterizes a subset of neuroblastomas with favourable prognosis, *Oncogene* 23 (2004) 588–595.
- [18] B.H. Kushner, M.P. LaQuaglia, M.A. Bonilla, K. Lindsley, N. Rosenfield, S. Yeh, J. Eddy, W.L. Gerald, G. Heller, N.K. Cheung, Highly effective induction therapy for stage 4 neuroblastoma in children over 1 year of age, *J. Clin. Oncol.* 12 (1994) 2607–2613.
- [19] T.V. Lopez, T.R.J. Lappin, P. Maxwell, S. Zhanzhong, R. Lopez-Marure, C. Aguilar, L. Rocha-Zavaleta, Autocrine/paracrine erythropoietin signalling promotes JAK/STAT-dependent proliferation of human cervical cancer cells, *Int. J. Cancer* 129 (2011) 2566–2576.
- [20] M. Peiris-Pages, S.J. Harper, D.O. Bates, P. Ramani, Balance of pro- versus anti-angiogenic splice isoforms of vascular endothelial growth factor as a regulator of neuroblastoma growth, *J. Pathol.* 222 (2010) 138–147.
- [21] J.M. Maris, Recent advances in neuroblastoma, *N. Engl. J. Med.* 362 (2010) 2202–2211.
- [22] C.P. Reynolds, J.L. Biedler, B.A. Spengler, D.A. Reynolds, R.A. Ross, E.P. Frenkel, R.G. Smith, Characterization of human neuroblastoma cell lines established before and after therapy, *J. Natl. Cancer Inst.* 76 (1986) 375–387.
- [23] T.D. Richmond, M. Chohan, D.L. Barber, Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin, *Trends Cell Biol.* 15 (2005) 146–155.
- [24] J. Rossler, I. Stolze, S. Frede, P. Freitag, L. Schweigerer, W. Havers, J. Fandrey, Hypoxia-induced erythropoietin expression in human neuroblastoma requires a methylation free HIF-1 binding site, *J. Cell. Biochem.* 93 (2004) 153–161.
- [25] A.K. Salahudeen, N. Haider, J. Jenkins, M. Joshi, H. Patel, H. Huang, M. Yang, H. Zhe, Antiapoptotic properties of erythropoiesis-stimulating proteins in models of cisplatin-induced acute kidney injury, *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 294 (2008) 1354–1365.
- [26] S.A. Santi, H. Lee, The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298 (2010) C580–C591.
- [27] H. Sartelet, M. Fabre, M. Castaing, J. Bosq, I. Racu, E. Lagonotte, V. Scott, Y. Lecluse, S. Barette, S. Michiels, G. Vassal, Expression of erythropoietin and its receptor in neuroblastomas, *Cancer* 110 (2007) 1096–1105.
- [28] G. Shaw, S. Morse, M. Ararat, F.L. Graham, Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells, *FASEB J.* 16 (2002) 869–871.
- [29] A.G. Shankar, The role of recombinant erythropoietin in childhood cancer, *Oncologist* 13 (2008) 157–166.
- [30] J. Shen, Y. Wu, J.-Y. Xu, J. Zhang, S.H. Sinclair, M. Yanoff, G. Xu, W. Li, G.-T. Xu, ERK- and Akt-dependent neuroprotection by erythropoietin (EPO) against glyoxal-AGEs via modulation of Bcl-xL, Bak, and BAD, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51 (2010) 35–46.
- [31] Z. Shi, V.M. Hodges, E.A. Dunlop, M.J. Percy, A.P. Maxwell, M. El-Tanani, T.R. Lappin, Erythropoietin-induced activation of the JAK2/STAT5, PI3K/Akt, and Ras/ERK pathways promotes malignant cell behaviour in a modified breast cancer cell line, *Mol. Cancer Res.* 8 (2010) 615–626.
- [32] M. Todaro, A. Turdo, M. Bartucci, F. Iovino, R. Dattilo, M. Biffoni, G. Stassi, G. Federici, R. De Maria, A. Zeuner, Erythropoietin activates cell survival pathways in breast cancer stem-like cells to protect them from chemotherapy, *Cancer Res.* 73 (2013) 6393–6400.
- [33] T. Tonia, A. Mettler, N. Robert, G. Schwarzer, J. Seidenfeld, O. Weingart, C. Hyde, A. Engert, J. Bohlius, Erythropoietin or darbepoetin for patients with cancer, *Cochrane Database Syst. Rev.* 12 (2012) CD003407.
- [34] M. Um, H.F. Lodish, Antiapoptotic effects of erythropoietin in differentiated neuroblastoma SH-SY5Y cells require activation of both the STAT5 and AKT signaling pathways, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 5648–5656.
- [35] D.A. Vesey, C. Cheung, B. Pat, Z. Endre, G. Gobe, D.W. Johnson, Erythropoietin protects against ischaemia acute renal injury, *Nephrol. Dial. Transplant.* 19 (2004) 348–355.
- [36] R. Vitali, V. Cesi, M.R. Nicotra, H.P. McDowell, A. Donfrancesco, O. Mannarino, P.G. Natali, G. Raschella, C. Dominici, c-Kit is preferentially expressed in MYCN-amplified neuroblastoma and its effect on cell proliferation is inhibited in vitro by STI-571, *Int. J. Cancer* 106 (2003) 147–152.
- [37] L.M. Wagner, C.A. Billups, W.L. Furman, B.N. Rao, V.M. Santana, Combined use of erythropoietin and granulocyte colony-stimulating factor does not decrease blood transfusion requirements during induction therapy for high-risk neuroblastoma: a randomized controlled trial, *J. Clin. Oncol.* 22 (2004) 1886–1893.
- [38] L.-Y. Wang, L.-Y. Shih, S.-H. Chen, H.-C. Liu, I.-J. Chai, D.-C. Liang, Neuroblastoma with expression of erythropoietin resulting in erythrocytosis, *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 25 (2003) 649–650.
- [39] H.Q. Wang, D.A. Altomare, K.L. Skele, P.I. Poulikakos, F.P. Kuhajda, A. Di Cristofano, J.R. Testa, Positive feedback regulation between AKT activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells, *Oncogene* 24 (2005) 3574–3582.
- [40] H. Wu, U. Klingmuller, P. Besmer, H.F. Lodish, Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors, *Nature* 377 (1995) 242–246.
- [41] Z. Yang, H. Wang, Y. Jiang, E. Hartnett, VEGFA activates erythropoietin receptor and enhances VEGFR2-mediated pathological angiogenesis, *Am. J. Pathol.* 184 (2014) 1230–1239.
- [42] F. Zhang, A.P. Signore, Z. Zhou, S. Wang, G. Cao, J. Chen, Erythropoietin protects CA1 neurons against global cerebral ischemia in rat: potential signaling mechanisms, *J. Neurosci. Res.* 83 (2006) 1241–1251.



Erratum

Erratum to “Erythropoietin protects neuroblastoma cells against etoposide and vincristine by activating ERK and AKT pathways but has no effect in kidney cells”

[Life Sci. 137(2015) 142–149]



Maria Jose Vazquez-Mellado ^{a,b}, Cecilia Aguilar ^a, Leticia Rocha-Zavaleta ^{a,*}

^a Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. CP 04510, Mexico

^b Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad de Posgrado, Edificio B Primer Piso, Ciudad Universitaria, México D.F. CP 04510, Mexico

The author regrets that the Acknowledgement section was incorrect in the abovementioned paper. The correct Acknowledgement is below:

This study was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, grant: 152492) and PAPIIT (grant: IN209613). The present work was performed by M.J. V.-M in partial fulfilment of

the requirements of the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, with doctoral scholarships from CONACyT (reg. number: 239704), and PAPIIT (grant: IN209613). The authors thank Patricia Ferrara for technical assistance.

DOI of original article: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2015.07.022>.

* Corresponding author.

E-mail address: lrochaz@biomedicas.unam.mx (L. Rocha-Zavaleta).

“Aprendí que el coraje no es la ausencia de miedo, sino el triunfo sobre él. El hombre valiente no es aquel que no siente miedo, sino el que conquista ese miedo”

-Nelson Mandela