

# Migración, invasividad y ciclo celular en NB por Casiopeínas®

Lizbeth Karina Avalos Velázquez<sup>1</sup>, Mayra Lizbeth Vitela-Ramos<sup>2</sup>, Lena Ruiz-Azuara<sup>3</sup>, Carmen Mejía<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>[liz.zy94@hotmail.com](mailto:liz.zy94@hotmail.com); <sup>2</sup>[mayralizbehvitela62@gmail.com](mailto:mayralizbehvitela62@gmail.com); [maria.c.mejia@uv.es](mailto:maria.c.mejia@uv.es)<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Querétaro; <sup>2</sup>Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro;

<sup>3</sup>Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México;

<sup>4</sup>Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro.  
Querétaro, México

## Resumen

El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido extracraneal más frecuente en la infancia (8-10 %), con alta capacidad de metástasis y resistencia a fármacos. Lo que ha conducido a la investigación de nuevos tratamientos con mayor efectividad como las Casiopeínas® (Cas). Son compuestos que han mostrado efectos citostáticos y citotóxicos en diversos tumores. En líneas de NB se comprobó su actividad apoptótica (2-4 h), autofágica (10 h) y de supervivencia (24 h), pero se desconocen sus efectos después de 24 h, tiempo en el cual las células podrían metastatizar. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue analizar la migración, invasividad y el ciclo celular, en la línea de neuroblastoma SK-N-SH, tratada con la CI50 de cisplatino o CasIIIia. La migración celular se evaluó con el ensayo de la herida; mientras que la invasividad celular se determinó empleando el ensayo de *transwell* y el análisis del ciclo celular por citometría de flujo. Los resultados mostraron que los tratamientos disminuyen la capacidad de migración y, a partir de las 48h, se observa la pérdida celular total. También se encontró que las células tratadas con CasIIIia no son capaces de atravesar la membrana del *transwell* y permanecen entre las fases G0/G1 y la fase S del ciclo celular. En conclusión, la administración de CasIIIia inhibe la capacidad de migración e invasividad en células de NB.

**Palabras clave:** SK-N-SH, Casiopeína IIIia, migración celular, invasividad celular, ciclo celular.

## Abstract

*Neuroblastoma (NB) is the most common extracranial solid tumor in childhood (8-10 %), with a high capacity for metastasis and drug resistance. It has led to the investigation of new treatments with greater effectiveness such as Casiopeína® (Cas). They are compounds that have shown cytostatic and cytotoxic effects in various tumors. In NB cell lines its apoptotic (2-4h), autophagic (10h) and survival (24h) activity were verified, but its effects are unknown after 24h, at which time the cells could metastasize. For this reason, the objective of this work was to analyze the migration, invasiveness and cell cycle, in the SK-N-SH neuroblastoma line, treated with the IC50 of cisplatin or CasIIIia. Cell migration was assessed with the "wound" test; while cell invasiveness was determined using the "transwell" assay and the analysis of the cell cycle by flow cytometry. The results showed that the treatments decrease the migration capacity and after 48h, the total cell loss is observed. It was also found that CasIIIia treated cells are not able to cross the transwell membrane and remain between the G0 / G1 phases and the S phase of the cell cycle. In conclusion, the administration of CasIIIia inhibits the ability of migration and invasiveness in NB cells.*

**Keywords:** SK-N-SH, Casiopeína IIIia, cell migration, cell invasiveness, cell cycle.

---

### Artículo arbitrado

---

Recibido:  
08 de septiembre de 2019

Aceptado:  
25 de septiembre de 2019

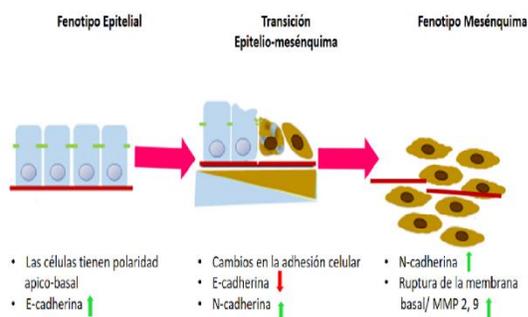
## Introducción

El Neuroblastoma (NB) es el tumor sólido extracraneal más frecuente en infantes, dicho tumor se origina de células que derivan de la cresta neural durante el desarrollo embrionario. El NB presenta una alta heterogeneidad genética, biológica, clínica y morfológica, lo cual dificulta alcanzar una terapia exitosa (Pinto, N. R., Applebaum, M. A., Volchenboun, S. L., Matthay, K. K., London, W. B., Ambros, 2015; Bosse & Maris, 2016).

Este tumor causa el 15 % de la mortalidad infantil; su tasa de supervivencia en tumores metastásicos es considerablemente baja (21 %) durante los primeros 5 años de vida, mientras que después de los 5 años es de 40 % (Fulda, 2018).

La metástasis o formación de tumores en tejidos y órganos lejanos al sitio de origen (Botzer, L. E., Maman, S., Sagi-Assif, O., Meshel, T., Nevo, I., Yron, I., & Witz, 2016), se relaciona con el 90 % de las muertes por cáncer. Es un proceso que forma parte de la carcinogénesis y está asociado con la malignidad y mal pronóstico.

Para llevarse a cabo la metástasis existen tres puntos importantes: la transición epitelio-mesénquima (TEM), la invasividad y la migración. La TEM (ver Figura 1) es un proceso biológico de transformación fenotípica donde las células epiteliales se vuelven mesenquimales, lo cual favorece la progresión tumoral. Múltiples estudios han mostrado que el 90 % de los tumores muestran diferentes grados de TEM, lo que se asocia a una capacidad relativamente fuerte de metástasis (Wang et al., 2019).



**Figura 1.** Transición epitelio-mesénquima. El fenotipo epitelial se caracteriza por la polaridad apico-basal y la unión célula-célula asociada a la presencia de E-cadherina. Durante la TEM se pierden las características del fenotipo epitelial asociado a la regulación negativa de E-cadherina y al

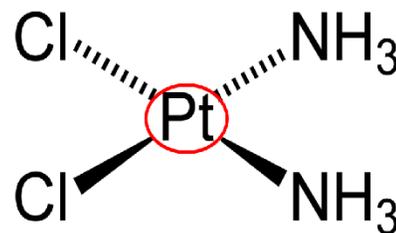
aumento de N-cadherina, lo cual, en el fenotipo mesenquimal, favorecerá la motilidad celular. A su vez, se presentará la ruptura de la membrana basal asociada al aumento de las metaloproteinasas (MMP) 2 y 9, las cuales favorecen el movimiento de las células tumorales. Fuente: elaboración propia.

Una vez que las células adquieren motilidad por medio de la TEM, son capaces de migrar. Este proceso consiste en la ruptura de la membrana celular y el desplazamiento a través del torrente sanguíneo hasta llegar a un lugar lejano del tumor primario (Fonseka et al., 2019).

Cuando las células se encuentran en el depósito metastásico, se activa la fase de invasividad, donde se lleva a cabo un proceso inverso a la TEM: las células mesenquimales regresan a su fenotipo epitelial, lo que favorece así la adhesión celular, la angiogénesis y, con ello, la proliferación celular descontrolada, así como la evasión de los mecanismos de muerte (Fabian et al., 2016).

Debido a la complejidad que implica el proceso de metástasis en la actualidad, el tratamiento administrado para el neuroblastoma de alto riesgo con metástasis consiste en terapias multimodales intensivas. Entre los quimioterapéuticos comúnmente administrados se encuentran agentes alquilantes como ciclofosfamida, melfalan, carboplatino o cisplatino (el más utilizado) (Vo, K. T. et al. 2014; Valter, K., 2018).

El cisplatino (ver Figura 2) inhibe la síntesis de DNA y proteínas produciendo enlaces cruzados dentro y entre las cadenas del DNA, al unirse con el nitrógeno 7 de la guanina (Geurten, Geurten, Hoyoux, & Lebrethon, 2019). Sin embargo, su administración se asocia a una deficiente calidad de vida, debido a sus efectos adversos como la nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, ototoxicidad e inmunosupresión (Casinelli et al., 2016; Amable, 2016).



**Figura 2.** Estructura del Cisplatino®. Modificada de Amable, 2016.

Debido a lo anterior, diversos grupos de investigación trabajan en nuevos anticancerígenos que resulten más efectivos y con menores efectos adversos. Entre ellos se encuentra la familia de las Casiopeínas®, compuestos de coordinación de cobre(II) cuya fórmula general es [Cu (N-N) (N-O)]NO<sub>3</sub> (Ruiz-Azuara 1994) (ver Figura 3).

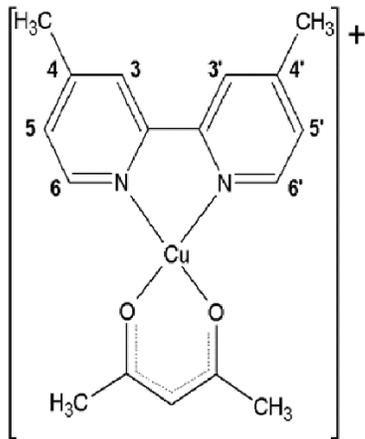


Figura 3. Casiopeína IIIa. Tomada de García-Ramos et al., 2017.

Estos compuestos han demostrado que a menores concentraciones que el cisplatino, producen efectos antiproliferativos, citotóxicos y genotóxicos (Marín-Hernández, Gracia-Mora, Ruiz-Ramírez, & Moreno-Sánchez, 2003) en modelos *in vivo* (De Vizcaya-Ruiz, Rivero-Müller, Ruiz-Ramirez, Howarth & Dobrota, 2003) e *in vitro* (Trejo C et al, 2005; Mejía C, et al, 2008; Gutiérrez AG et al., 2013; García-Ramos JC, et al 2017).

Además, se ha observado una fuerte actividad antitumoral en líneas celulares de carcinomas humanos (Valencia-Cruz et al., 2013) y bajos efectos tóxicos en corazón de rata (Marín et al., 2012), linfocitos y macrófagos humanos, evitando así la presencia de leucopenias (Alemón-Medina, 2011; García-Ramos, 2016; García-Ramos et al., 2017).

En células de NB tratadas con Cas IIgly, IIIa y IIIEa se han analizado los procesos de apoptosis, autofagia y supervivencia a las 2, 10 y 24 h (Vázquez-Aguirre et al., 2019). Sin embargo, aún no se conocen los

efectos de estos compuestos en tiempos posteriores, donde se pueden hacer presentes los procesos de migración y la invasividad. Por todo lo anterior, el objetivo general de este trabajo fue analizar los procesos de migración e invasividad en células de neuroblastoma SK-N-SH tratadas con Casiopeína® IIIa, mediante la determinación de la capacidad de migración, invasividad y ciclo celular.

## Metodología

Empleamos la línea celular SK-N-SH que se caracteriza porque tiene una morfología epitelial, crece de forma adherente, duplica su número cada 43 h y tiene alta capacidad invasiva. Las células fueron tratadas con la CI<sub>50</sub> de CasIIIa o cisplatino (Cis) de acuerdo con lo previamente reportado por nuestro grupo (Mejía C et al., 2008; Gutiérrez AG et al., 2013).

### Cultivo celular

Las células fueron cultivadas en Medio de Eagle modificado por Dulbeco (DMEM), adicionado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), almacenadas en incubadora de CO<sub>2</sub> (5 %), a una temperatura de 37 °C. El medio se renovó tres veces por semana hasta alcanzar >80 % de confluencia. Bajo estas condiciones, se inició el periodo de expansión realizando transferencias cada tercer día.

### Evaluación de migración celular

Para evaluar este proceso se realizó el ensayo de la herida. Brevemente, las células de NB fueron sembradas en placas de 24 pozos con concentraciones bajas de SFB (5 %). Al alcanzar una confluencia >80 % se realizó la “herida” con una punta estéril de micropipeta amarilla P200. Se procedió a lavar las placas dos veces con *buffer* de fosfatos (PBS) y se aplicaron los tratamientos. Las células se fijaron con paraformaldehído al 0.4 % cada 24 h hasta las 120 h, se tiñeron con hematoxilina-eosina y se procedió al análisis de la herida mediante microscopía óptica.

### Evaluación de la invasividad celular.

El análisis de la invasividad se llevó a cabo por medio del ensayo de *transwell*. Brevemente,  $1 \times 10^5$  células previamente tratadas por 24 h, se sembraron en los insertos con 1.5 ml de medio DMEM sin SFB. En el compartimento inferior se añadieron 2.6 ml de DMEM suplementado con SFB al 10 % y se incubaron durante 48 h. Los insertos se retiraron cada 24 h hasta completar 120 h. Las células que migraron desde la cara apical a la cara basal del *transwell* se fijaron en paraformaldehído al 0.4 % y se procedió a su observación al microscopio óptico.

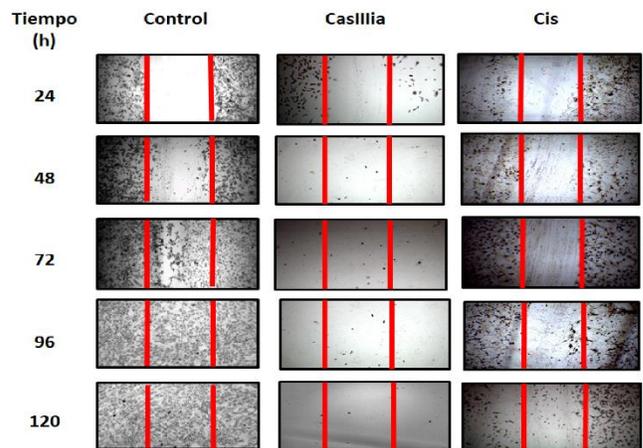
#### Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo

Se preparó la muestra partiendo de los cultivos previamente tratados. Las células fueron centrifugadas a 300 rpm y se tomaron  $1 \times 10^5$  células, se realizaron dos lavados con PBS 1x y se fijaron con etanol al 70 % durante 3 h a  $-20^\circ\text{C}$ . Una vez fijadas, se centrifugaron a 300 rpm, se retiró el etanol y se realizaron dos lavados más con PBS 1x. El pellet obtenido se resuspendió en 1ml de PBS 1x, se tomaron 200  $\mu\text{l}$  del mismo y, en oscuridad, se agregaron 200  $\mu\text{l}$  del reactivo Cell Cycle (Muse™), incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por último, se pasó a la lectura con el software correspondiente. Todos los pasos de metodología se realizaron por triplicado.

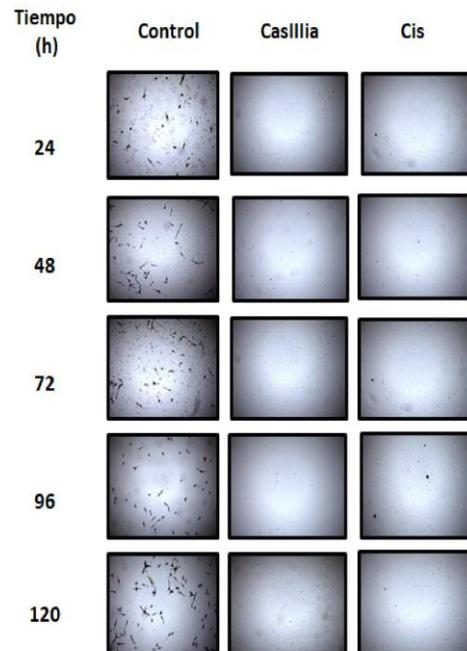
## Resultados

La Figura 4 muestra los resultados obtenidos en el ensayo de la herida, en los cuales se dio seguimiento a la herida cada 24 h hasta las 120 h y se identificó el patrón de cierre de la herida.

En el ensayo de *transwell* de la Figura 5, se observan las células que lograron atravesar la membrana del inserto y su seguimiento, a partir de las 24 h y hasta las 120 h, posteriores al retiro del inserto.



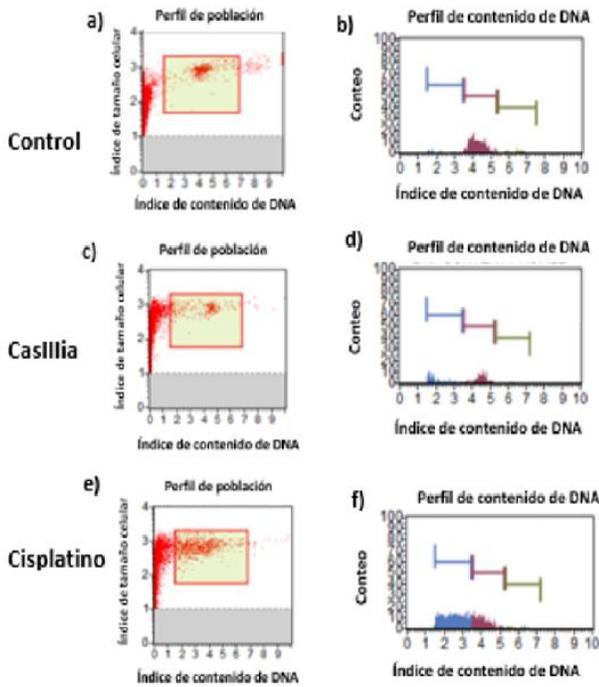
**Figura 4.** Cinética de cierre de la herida. En células control se observó un cierre total de la herida a las 96 h. Por su parte, el tratamiento con Casllia fue incompatible con la supervivencia celular y, por tanto, con la migración. Mientras que, con el Cisplatino, se identificó un menor número de células en comparación con el control y, aunque a las 96 h se observa una tendencia a cruzar la línea de cierre de la herida, ésta no logra completarse incluso a las 120 h. Fuente: elaboración propia.



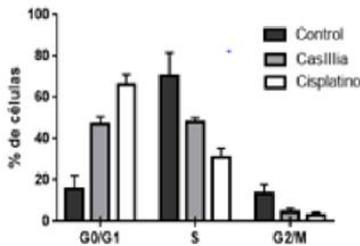
**Figura 5.** Dinámica de invasividad en células SK-N-SH. En las células control se puede observar un aumento en el número celular hacia las 72 h, el cual parece mantenerse hasta las 120 h. Mientras que las células tratadas con Casllia o Cisplatino no cruzaron la membrana del *transwell*. Todas las observaciones se hicieron en microscopio invertido (4x). Fuente: elaboración propia.

Por último, mediante citometría de flujo, evaluamos el ciclo celular, para medir la cantidad de células detectadas y la distribución de estas en el ciclo celular, mediante una cinética de tiempo de 48 h (ver Figura 6), 72 h (ver Figura 7), 96 h (ver Figura 8), 120 h (ver Figura 9) y 144 h (ver Figura 10) posteriores al tratamiento.

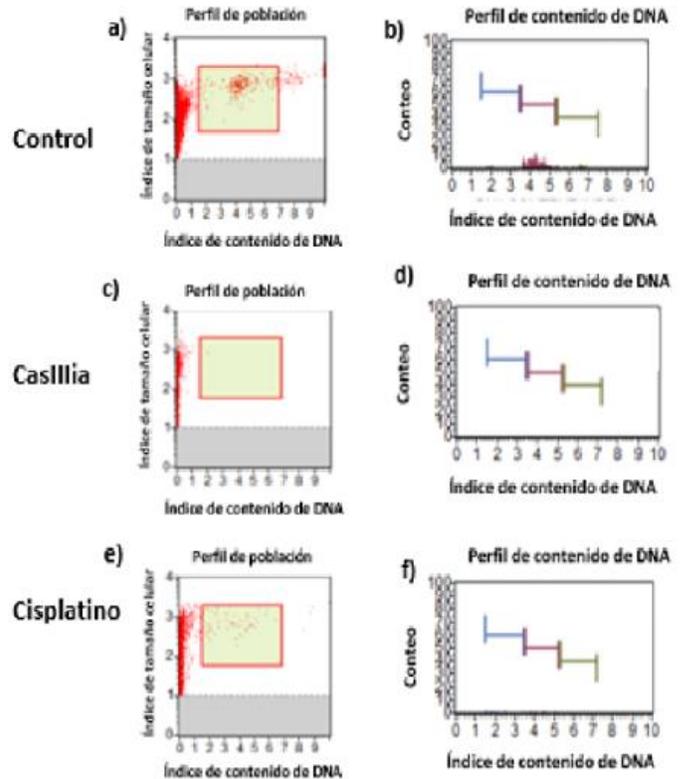
tratamiento (los resultados se representan como Media  $\pm$  SD).  
Fuente: elaboración propia.



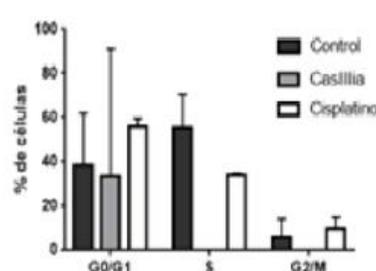
g) Distribución del ciclo celular 48h



**Figura 6.** Evaluación del ciclo celular 48h postratamiento. En las figuras a, c y e se puede observar la población celular evaluada que corresponde a la ubicada dentro del rectángulo rojo. En las figuras b, d y f se observa la distribución de acuerdo con los parámetros registrados por el equipo, en los cuales el color azul corresponde a las fases G0/G1, el color morado a la Síntesis (S) y el color verde a las fases G2/M del ciclo celular. Por último, en la figura g se observa la distribución celular de acuerdo con la fase del ciclo celular y al

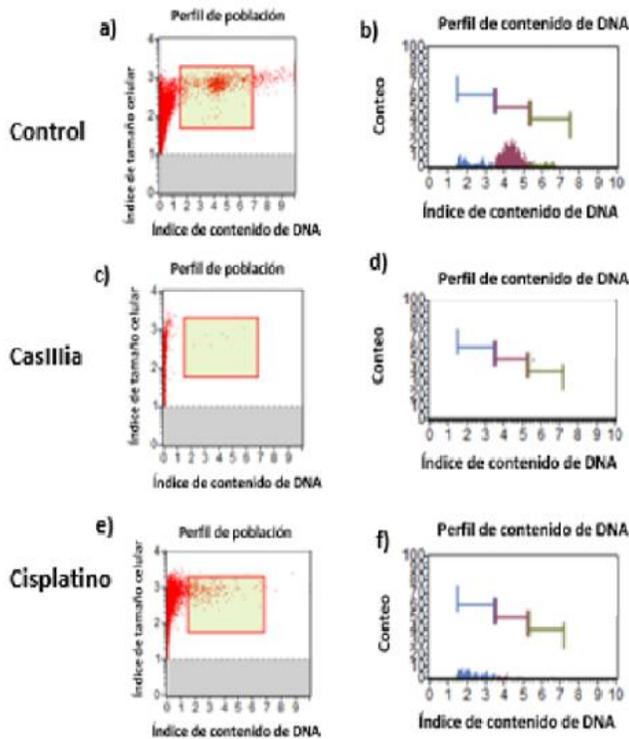


g) Distribución del ciclo celular 72h

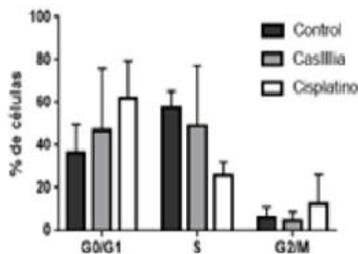


**Figura 7.** Evaluación del ciclo celular 72 h postratamiento. En las figuras a, c y e se puede observar la población celular evaluada que corresponde a la ubicada dentro del rectángulo rojo. En las figuras b, d y f se observa la distribución de acuerdo con los parámetros registrados por el equipo, en los cuales el color azul corresponde a las

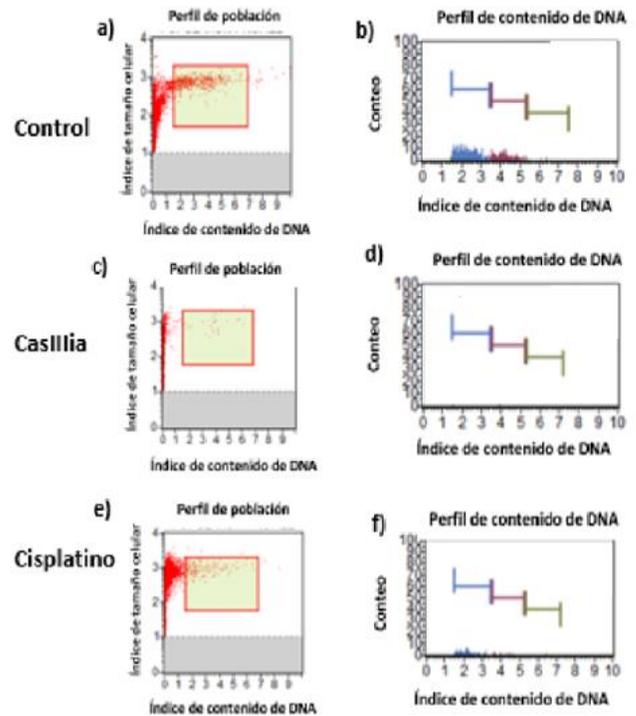
fases G0/G1, el color morado a la Síntesis (S) y el color verde a las fases G2/M del ciclo celular. Por último, en la figura g se observa la distribución celular de acuerdo con la fase del ciclo celular y al tratamiento (los resultados se representan como Media  $\pm$  SD). Fuente: elaboración propia.



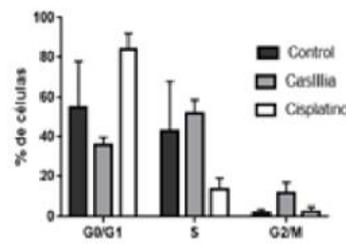
**g) Distribución del ciclo celular 96h**



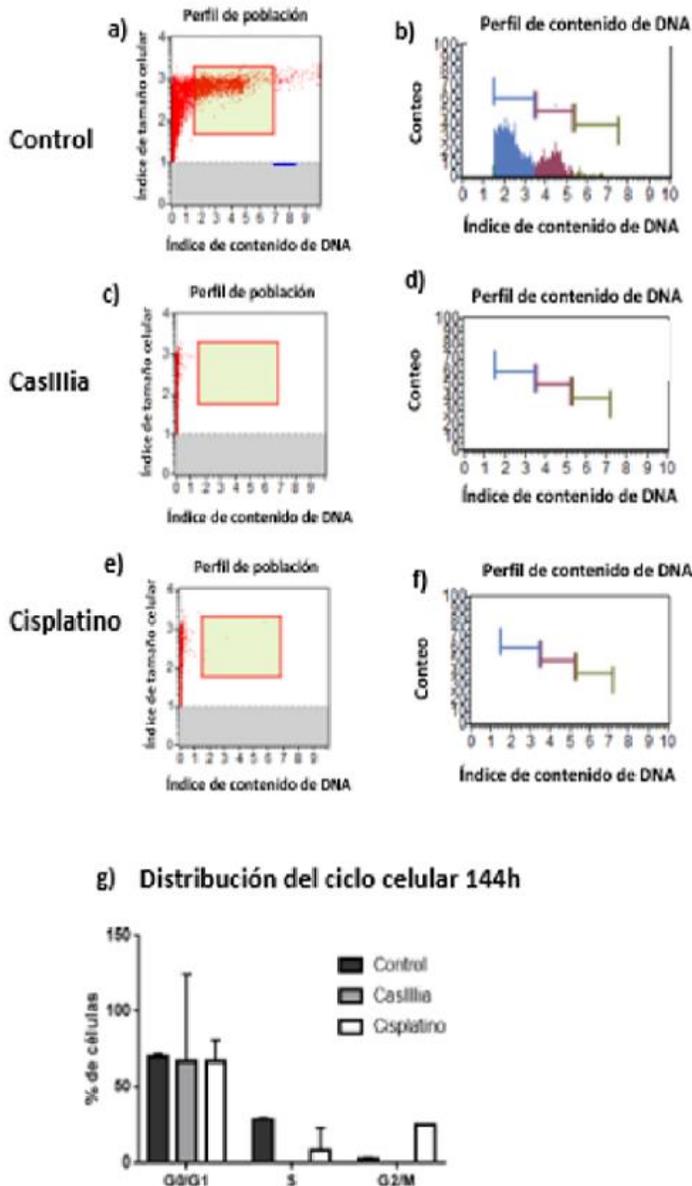
**Figura 8.** Evaluación del ciclo celular 96 h postratamiento. En las figuras a, c y e se puede observar la población celular evaluada que corresponde a la ubicada dentro del rectángulo rojo. En las figuras b, d y f se observa la distribución de acuerdo con los parámetros registrados por el equipo, en los cuales el color azul corresponde a las fases G0/G1, el color morado a la Síntesis (S) y el color verde a las fases G2/M del ciclo celular. Por último, en la figura g se observa la distribución celular de acuerdo con la fase del ciclo celular y al tratamiento (los resultados se representan como Media  $\pm$  SD). Fuente: elaboración propia.



**g) Distribución del ciclo celular 120h**



**Figura 9.** Evaluación del ciclo celular 120 h postratamiento. En las figuras a, c y e se puede observar la población celular evaluada que corresponde a la ubicada dentro del rectángulo rojo. En las figuras b, d y f se observa la distribución de acuerdo con los parámetros registrados por el equipo, en los cuales el color azul corresponde a las fases G0/G1, el color morado a la Síntesis (S) y el color verde a las fases G2/M del ciclo celular. Por último, en la figura g se observa la distribución celular de acuerdo con la fase del ciclo celular y al tratamiento (los resultados se representan como Media  $\pm$  SD). Fuente: elaboración propia.



**Figura 10.** Evaluación del ciclo celular 144 h postratamiento. En las figuras a, c y e se puede observar la población celular evaluada que corresponde a la ubicada dentro del rectángulo rojo. En las figuras b, d y f se observa la distribución de acuerdo con los parámetros registrados por el equipo, en los cuales el color azul corresponde a las fases G0/G1, el color morado a la Síntesis (S) y el color verde a las fases G2/M del ciclo celular. Por último, en la figura g se observa la distribución celular de acuerdo con la fase del ciclo celular y al tratamiento (los resultados se representan como Media  $\pm$  SD). Fuente: elaboración propia.

## Discusión y conclusiones

El tratamiento para el Neuroblastoma de alto riesgo ha tenido grandes avances; sin embargo, estos no son suficientes ya que los pacientes que se encuentran dentro de esta clasificación continúan teniendo un pronóstico pobre con una supervivencia a largo plazo menor al 50 % (Pinto et al., 2015).

Por este motivo, los resultados obtenidos en nuestro grupo de investigación cobran gran relevancia. En el ensayo de la herida (Figura 4) se identificó que las células tratadas con CasIIIa pierden por completo la capacidad de migración después de 48 h, en las cuales ya no se encuentra ninguna célula, lo cual se asocia a que las células podrían reactivar nuevos procesos de muerte sin necesidad de una segunda dosis. Gracias a ello, se retoma lo reportado previamente por nuestro grupo en las células CHP-212 y SK-N-SH (Mejía C, et al, 2008; Gutiérrez AG, et al., 2013) y pareciera que es un proceso que se repite. En contraparte, las células tratadas con cisplatino, si bien no logran cerrar la herida, pareciera que, a partir de las 96 h, logran detoxificar el compuesto y adquieren la motilidad necesaria para poder migrar, lo cual concuerda con los estudios realizados sobre la resistencia al Cisplatino, pues reportan que en los casos donde el tumor presenta regresión, este quimioterapéutico pierde efectividad, ya que su resistencia se asocia con el aumento de mecanismos de reparación del DNA, acumulación celular alterada y aumento de la inactivación del fármaco (Amable, 2016).

Por otra parte, en el ensayo del *transwell* (ver Figura 5) se observó que ninguno de los tratamientos permite la acción invasiva, lo cual se asocia a que ambos tratamientos tienen efectos citostáticos. Sin embargo, sería importante conocer la cinética de las células tratadas con cisplatino a largo plazo, ya que posteriormente a las horas reportadas en este trabajo, podría haber recuperación celular, tal y como se observó en el ensayo de la herida. Para el caso de las células tratadas con Casiopeínas, mediante microarreglos de RNA en células HeLa tratadas con CasIIIy, identificamos la expresión de los genes asociados a la inhibición del proceso de migración e invasividad como N-cadherina (Mejía C., et al.,

2013). En otro trabajo se identificó la disminución en la expresión del gen TGF $\beta$ R1, cuyo papel es fundamental en la evasión del sistema inmune, la angiogénesis, la motilidad celular, la invasividad y consecuentemente la metástasis (Yunsheng Xu et al., 2019).

Por último, en la evaluación del ciclo celular se puede identificar que, durante toda la cinética de tiempo, la densidad celular se comporta de la siguiente manera: células control > células tratadas con cisplatino > células tratadas con CasIIIa. Aunado a esta información, se puede observar que las células tratadas mantienen activo el ciclo celular llegando hasta la fase de división con un bajo índice en las primeras horas y un aumento hacia las últimas mediciones. Mientras que las células tratadas con CasIIIa mantienen la mayoría de la población celular en las fases G0/G1 y S, lo cual indica que son muy pocas las células que logran dividirse. Se suma a esta información que, a las 72 y 144 h, se encontró que la totalidad de las células se mantienen en la Fase G0/G1. Esto puede estar asociado con la actividad de los genes p53 y p21, los cuales previamente reportamos mediante el análisis de microarreglos (Mejía C. et al., 2013).

En conclusión, la administración de CasIIIa en dosis única, tiene como resultado a tiempos prolongados (144 h) la inhibición de la capacidad de migración e invasividad, así como la reducción de la cantidad de células que logran completar el ciclo celular. Sin embargo, es necesaria la evaluación de la expresión de proteínas relacionadas con la adhesión celular, así como la evaluación de la viabilidad celular para obtener un panorama completo sobre todo el proceso.

## Referencias

- Alejandra Idan Valencia-Cruz, Laura I. Uribe-Figueroa, Rodrigo Galindo-Murillo, Karol Baca-López, Anllely G. Gutiérrez, Adriana Vázquez-Aguirre, Lena Ruiz-Azuara, Enrique Hernández-Lemus, C. M. (2013). Whole Genome Gene Expression Analysis Reveals Casiopeína-Induced Apoptosis Pathways. *PLoS ONE*. Doi: <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054664>
- Amable, L. (2016). Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacological Research*, 106, pp. 27–36. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.001>
- Bosse, K. R., & Maris, J. M. (2016). Advances in the translational genomics of neuroblastoma: From improving risk stratification and revealing novel biology to identifying actionable genomic alterations. *Cancer*, 122(1), pp. 20–33. Doi: <https://doi.org/10.1002/cncr.29706>
- Botzer, L. E., Maman, S., Sagi-Assif, O., Meshel, T., Nevo, I., Yron, I., & Witz, I. P. (2016). Hexokinase 2 is a determinant of neuroblastoma metastasis. *British Journal of Cancer*, 114(7), pp. 759–766. Doi: <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.26>
- Casinelli, G., LaRosa, J., Sharma, M., Cherek, E., Banerjee, S., Branca, M., ... Graves, J. A. (2016). N-Myc overexpression increases cisplatin resistance in neuroblastoma via deregulation of mitochondrial dynamics. *Cell Death Discovery*, 2(1), pp. 1–11. Doi: <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.82>
- De Vizcaya-Ruiz, A., Rivero-Müller, A., Ruiz-Ramírez, L., Howarth, J. A., & Dobrota, M. (2003). Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: Casiopeina II. *Toxicology*, 194(1–2), pp. 103–113. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2003.08.009>
- Fabian, J., Opitz, D., Althoff, K., Lodrini, M., Hero, B., Volland, R., ... Deubzer, H. E. (2016). MYCN and HDAC5 transcriptionally repress CD9; to trigger invasion and metastasis in neuroblastoma. *Oncotarget*, 7(41). Doi: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11662>
- Fonseka, P., Liem, M., Ozcitti, C., Adda, C. G., Ang, C. S., & Mathivanan, S. (2019). Exosomes from N-Myc amplified neuroblastoma cells induce migration and confer chemoresistance to non-N-Myc amplified cells: implications of intra-tumour heterogeneity. *Journal of Extracellular Vesicles*, 8(1). Doi: <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1597614>
- Fulda, S. (2018). Cell death-based treatment of glioblastoma review-Article. *Cell Death and Disease*, 9(2), pp. 1–15. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0021-8>
- Marín-Hernández, A., Gracia-Mora, I., Ruiz-Ramírez, L., & Moreno-Sánchez, R. (2003). Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas®) on mitochondrial functions. *Biochemical Pharmacology*, 65(12), pp. 1979–1989. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00212-0](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00212-0)

- Pinto, N. R., Applebaum, M. A., Volchenbom, S. L., Matthay, K. K., London, W. B., Ambros, P. F., ... Cohn, S. L. (2015). Advances in risk classification and treatment strategies for neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 33(27), pp. 3008–3017. Doi: <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.4648>
- Valencia-Cruz, A. I., Uribe-Figueroa, L. I., Galindo-Murillo, R., Baca-López, K., Gutiérrez, A. G., Vázquez-Aguirre, A., ... Mejía, C. (2013). Whole Genome Gene Expression Analysis Reveals Casiopeína-Induced Apoptosis Pathways. *PLoS ONE*, 8(1). Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054664>
- Wang, X.-H., Wu, H.-Y., Gao, J., Wang, X.-H., Gao, T.-H., & Zhang, S.-F. (2019). GF1R facilitates epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in neuroblastoma via the STAT3/AKT axis. *Cancer Management and Research*, 11, pp. 5459–5472. Doi: <https://doi.org/10.2147/cmar.s196862>
- Yunsheng Xu, 1, 2 Qianwen Zhang, 3 Fan Lin, 3 Li Zhu, 4 Fangfang Huang, 4 Liang Zhao, 5 and Rongying Ou4. (2019). Casiopeína II-gly acts on lncRNA MALAT1 by miR-17-5p to inhibit FZD2 expression via the Wnt signaling pathway during the treatment of cervical carcinoma. *Oncol Rep.*, pp. 1365–1379. Doi: <https://doi.org/10.3892/or.2019.7268>