



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Medicina
Departamento de Estudios Avanzados
Maestría en Ciencias de la Salud

“Efecto de la suplementación con piridoxina y cobalamina en la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis en una línea celular de glioblastoma humano”

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias de la Salud

Presenta:

Q.F.B. Carolina Abigail Martínez Mendiola

Comité de Tutores

Directora:

Dra. Irazú Contreras García

Codirector:

Dr. José Antonio Estrada Guadarrama

Asesora:

Dra. Doris Atenea Cerecedo Mercado

Toluca, Estado de México

Noviembre, 2022

INDICE

		No. página
	Resumen	4
	Abstract	5
1.	Antecedentes	
	1.1. Cáncer	6
	1.2. Glioblastoma	6
	1.3. Heterogeneidad clonal en glioblastoma	9
	1.4. Modificaciones epigenéticas en glioblastoma	10
	1.5. Reprogramación metabólica en glioblastoma	11
	1.6. Apoptosis en glioblastoma	12
	1.7. Los micronutrientes y el cáncer	14
	1.8. Vitaminas	16
	1.9. Vitaminas del grupo B	16
	1.10 Piridoxina y cobalamina	18
2.	Planteamiento del problema	20
3.	Hipótesis	21
4.	Objetivos	22
5.	Justificación	23
6.	Materiales y métodos	
	6.1 Diseño de estudio	24
	6.2 Cultivo celular	24
	6.3 Suplementación	24
	6.4 Ensayo de viabilidad con cristal violeta	25
	6.5 Extracción de proteínas	26
	6.6 Cuantificación de proteínas	26
	6.7 Western blot	27
	6.8 Ciclo Celular	27
	6.9 Tinción intracelular	28
	6.10 Variables de estudio	28
	6.11 Implicaciones bioéticas	30
	6.12 Recolección de datos	30
	6.13 Análisis estadísticos	30
7.	Resultados	
	7.1 Carta de envío del artículo	31
	7.2 Abstract del artículo	32
8.	Discusión	33

9.	Conclusiones	35
10.	Referencias bibliográficas	36
11.	Anexos	42

Resumen

El glioblastoma es un tumor cerebral agresivo con una supervivencia media menor de dos años. Las terapias actuales no siempre logran mejorar el pronóstico y tienen diversos efectos adversos. En estudios recientes, se ha descrito el papel de los micronutrientes en cáncer; compuestos como ácidos grasos, vitaminas y elementos traza, poseen una actividad moduladora en diferentes procesos celulares y debido a que en los pacientes oncológicos es común el consumo de suplementos alimenticios, es importante conocer que efectos tienen sobre el desarrollo de cada tipo de cáncer.

Las vitaminas hidrosolubles del grupo B, como piridoxina y cobalamina, son esenciales en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso. Estudios previos describen que la piridoxina y la cobalamina tienen impacto sobre la proliferación celular y apoptosis en diversas líneas celulares neoplásicas.

En este estudio, se evaluó el efecto de la suplementación con piridoxina y cobalamina en la viabilidad de la línea celular de glioblastoma humano U87-MG, mediante el ensayo con cristal violeta. Complementario a esto, se realizó un ensayo de tinción de ADN con yoduro de propidio para evaluar el ciclo celular. Se evaluó la expresión de las proteínas Bcl-2 y caspasa 3 activa mediante western blot, posterior a la suplementación, y la expresión intracelular de caspasa 3 activa se comparó con células no tratadas mediante citometría de flujo.

Los resultados demuestran que la piridoxina disminuye la viabilidad celular de una manera dependiente de la concentración y del tiempo, mientras que este efecto no se observó para la cobalamina. No se observó arresto del ciclo celular y la expresión de Bcl-2 no fue significativamente modificada por la suplementación con estas vitaminas. La expresión de la caspasa 3 activa aumentó posterior a la suplementación con piridoxina, pero no con cobalamina. Por tanto, la suplementación con piridoxina podría potencialmente inducir la apoptosis en las células de glioblastoma.

Abstract

Glioblastoma is an aggressive brain tumor with a median survival rate of less than two years. Current therapies seldom manage to improve the prognosis and have various adverse effects. Recent studies have described the role of micronutrients in cancer, compounds such as fatty acids, vitamins, and trace elements, have modulated activity in different cellular processes and since consumption of food supplements is common in cancer patients, it is important to know their effects on cancer development.

Water-soluble vitamins from the B group, such as pyridoxine and cobalamin, are essential in the development and maintenance of the nervous system. Previous studies have described that pyridoxine and cobalamin have an impact on cell proliferation and apoptosis in various neoplastic cell lines.

In this study, the effect of pyridoxine and cobalamin supplementation on the viability of the human glioblastoma cell line U87-MG was evaluated by the crystal violet assay. In addition, DNA staining assay with propidium iodide was performed to evaluate the cell cycle. Expression of Bcl-2 and active caspase 3 was evaluated by western blot after supplementation, and intracellular expression of active caspase 3 was compared to untreated cells by flow cytometry.

The results demonstrated that pyridoxine decreases cell viability in a concentration- and time-dependent manner, whereas this effect was not observed for cobalamin. Cell cycle was evaluated, and cell arrest was discarded, and Bcl-2 expression was not significantly modified by supplementation with these vitamins. The expression of active caspase 3 increased after supplementation with pyridoxine, but not with cobalamin. Therefore, pyridoxine supplementation could potentially induce apoptosis in glioblastoma cells.

1. Antecedentes:

1.1. Cáncer

El cáncer es una enfermedad multifactorial con una amplia gama de manifestaciones clínicas. La causa de esta multiplicidad es que existen diversos cambios en los procesos celulares que originan el cáncer. Independientemente del tipo de cáncer y la causa de este, todos los tipos de cáncer comparten, a nivel celular, algunos rasgos generales que se han estudiado y se han denominado sellos característicos del cáncer o “*hallmarks*”. Estos sellos fueron postulados por Hanahan y Weinberg (1), quienes describieron seis características que le pueden otorgar a las células la capacidad de ser tumorigénicas, las cuales son: señalización proliferativa sostenida, evasión de los supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inducción de angiogénesis, inmortalidad replicativa y activación de invasión y metástasis (1). Más adelante, se añadieron la reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la respuesta inmunológica (2). Estos rasgos se adquieren cuando en el genoma celular surgen cambios epigenéticos y genéticos que alteran el funcionamiento normal; la inestabilidad genética también puede ser considerada un sello característico del cáncer, ya que tiene como consecuencia directa que el genoma se modifique, y que la célula adquiera un perfil proteómico que permita la proliferación acelerada y desregulada, que progresa a una alteración organizacional y pérdida de funcionalidad de los tejidos con consecuencias fisiológicas perjudiciales.

De acuerdo con la Organización Panamericana de Salud (OPS), el cáncer es la segunda causa de muerte en el continente americano. En el año 2019, tan solo en México se reportaron más de 190 mil casos de cáncer y 83 mil muertes debido a la misma patología. En la actualidad, gracias a los avances en los métodos diagnósticos y terapéuticos, existen tratamientos exitosos para algunos tipos de cáncer. Es común la combinación de radioterapia y quimioterapia y, en algunos casos, intervención quirúrgica. Los tratamientos actuales de quimioterapia presentan una gran cantidad de efectos secundarios por su poca especificidad hacia las células cancerígenas, lo que disminuye la calidad de vida de los pacientes (3).

1.2. Glioblastoma

Uno de los tipos de cáncer que presenta un mayor reto para su tratamiento es el glioblastoma, el cual es un tipo de glioma caracterizado por un crecimiento tumoral agresivo en el cerebro, lo que complica la intervención quirúrgica y, debido a la baja permeabilidad de la barrera

hematoencefálica, hay una baja disponibilidad de la mayoría de los fármacos en el sitio de acción requerido.

Los gliomas se originan en las células gliales del cerebro y en médula espinal. Se pueden clasificar en grados acorde con las observaciones patológicas de atipia nuclear, comportamiento mitótico, microvasculatura y necrosis (4). En el primer grado se encuentran tumores usualmente pediátricos y de lento crecimiento; el glioma de segundo grado se caracteriza por ser benigno, de bajo crecimiento y comúnmente padecido por adultos; el de tercer grado es un tumor maligno; las células que lo componen son menos diferenciadas, agresivas y de rápido crecimiento, en tanto que el glioma de cuarto grado o glioblastoma multiforme, es un tumor difuso de células gliales que puede propagarse más rápidamente, es altamente agresivo y desafortunadamente es el tumor de sistema nervioso central con mayor incidencia en la población adulta, con una supervivencia media del 5.5% durante los 5 años posteriores al diagnóstico (5).

Las células gliales que se transforman a células cancerígenas son los astrocitos, oligodendrocitos y endotelios, por lo que acorde con esta histopatología, se denomina al glioma como astrocitoma, oligodendrocitoma, oligoastrocitoma, tumor endotelial o neuro-glial (6). Los glioblastomas presentan una histología diversa, por lo que es complicado clasificar algunos casos bajo esta categoría. Nuevos estudios han podido describir la biología molecular de los tumores gliales y se han encontrado ciertas mutaciones que se encuentran comúnmente en las células de glioblastoma, como la delección 1p/19q y la mutación en la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH). Las mutaciones en los genes IDH1 e IDH2 están asociadas con un mejor pronóstico de supervivencia en tumores malignos de glioblastoma, y son más comunes en tumores secundarios de bajo grado (7).

En 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) generó una nueva clasificación de 5 grupos de tumores por sus características de morfología y genética (Tabla 1.) (8).

<i>Tabla 1. Clasificación de glioblastoma.</i>			
<i>Morfología</i>	Mutación IDH	Delección genética	Incidencia del total de Glioblastomas
<i>Glioblastoma</i>	No mutada	-	90%
<i>Astrocitoma difuso/ Anaplásico</i>	No mutada	-	
<i>Astrocitoma difuso/ Anaplásico</i>	Mutante	-	10%
<i>Oligodendroglioma / Oligodendroglioma anaplásico</i>	Mutante	-	
<i>Oligodendroglioma / Oligodendroglioma anaplásico</i>	Mutante	Delección 1p19q	

Construceto del autor con información de la OMS (8).

Se han descrito mutaciones adicionales en diferentes genes que controlan procesos de proliferación, como el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR), el receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGRA), la neurofibromina 1 (NF1), la homólogo fosfatasa y tensina (PTEN), la fosfoinositol 3-cinasa (PI3K), la cinasa inhibidora dependiente de ciclina 2A/B (CDKN2A/B), el retinoblastoma 1 (RB1), la telomerasa transcriptasa inversa (TERT) y el factor de transcripción P53 (TP53) (7).

La multiplicidad de las mutaciones en glioblastoma contribuye en gran medida al poco éxito que presentan los diversos agentes quimioterapéuticos. El tratamiento de primera elección para glioblastoma es la resección quirúrgica, seguida de radioterapia y quimioterapia con temozolomida. Se han implementado diferentes esquemas de tratamiento e incluso terapias dirigidas contra la angiogénesis, cómo el anticuerpo monoclonal Bevacizumab®, que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Sin embargo, este tratamiento presenta una gran cantidad de efectos secundarios y no aumenta la supervivencia media de los pacientes (9), por lo que el tratamiento de elección sigue siendo el agente alquilante temozolomida. Este compuesto sufre una conversión química a tiazenoimidazol carboxamida activa (MTIC), que ejerce una actividad citotóxica al alquilar las moléculas de guanina en la posición N⁷ y O⁶ y también en la base púrica adenina en la posición N³, bloqueando la transcripción y replicación

celular. Adicionalmente, se activan los mecanismos de reparación de ADN, que incluyen la escisión de bases (BER), reparación de ruptura de hebra sencilla (SSBR) y reparación de mal-apareamiento (MMR) (10). En general, estos mecanismos confieren cierta resistencia ante el fármaco, por lo que pueden presentar un blanco terapéutico potencial y a su vez pueden contribuir a la inestabilidad genética, al no realizar una reparación fidedigna de la cadena de ADN.

Otros mecanismos de quimioresistencia presentes en glioblastoma son las bombas de eflujo, que disminuyen la cantidad de fármaco dentro de la célula; la activación de la vía JAK/STAT3, que mantiene las características de troncalidad y; la expresión de la enzima metilguanin-O⁶-metiltransferasa (MGMT), que cataliza la remoción de grupos alquilo de la base guanina. Se ha comprobado que la presencia de esta enzima contrarresta los efectos de los agentes alquilantes. De manera importante, también se han estudiado las modificaciones epigenéticas del promotor de MGMT, asociándose una metilación del promotor y por la pérdida de la expresión de MGMT, con una mejor respuesta al tratamiento con temozolomida (7).

1.3. Heterogeneidad clonal en glioblastoma

No existe un único fenotipo de glioblastoma; incluso en un mismo paciente existen diferencias intratumorales, lo que significa que no todas las células que componen un mismo tumor son idénticas. A esto se le conoce como heterogeneidad clonal. Existen factores como la inestabilidad genética, el microambiente tumoral e incluso la terapia farmacológica dirigida a mecanismos de replicación de material genético, que causan alteraciones en el genoma; cuando ocurre la división celular, estas mutaciones y cambios epigenéticos pueden ser conservados por las células hijas y estas células a su vez, pueden adquirir nuevas mutaciones, obteniendo un fenotipo carcinogénico. El modelo de evolución clonal postula que aquellas células con las mutaciones que confieran más ventajas de supervivencia y proliferación serán seleccionadas y resultarán siendo las clonas predominantes (11).

Para el glioblastoma y otros tipos de cáncer cerebral, la heterogeneidad clonal se ha descrito con un modelo no mutuamente exclusivo del descrito previamente, que se atribuye a la presencia de células con propiedades troncales. Para glioblastoma, éstas se han denominado células troncales de glioblastoma (GSCs), que son células poco diferenciadas que mantienen el reaprovisionamiento de células tumorales (7) y, si bien se pueden diferenciar a células sin potencial tumorigénico, siguen siendo las responsables de la progresión de la enfermedad. Los

tratamientos idealmente se deberían enfocar en la erradicación de las GSCs; sin embargo, estas células pueden presentar mecanismos de quimioresistencia y plasticidad sujetos a señales del microambiente (7).

Las modificaciones epigenéticas son un control adicional de la expresión genética, comúnmente referidas como una especie de etiqueta o marca, que cambia la accesibilidad de los genes para los factores de transcripción. Existen modificaciones directamente sobre el ADN o en las histonas. La metilación de la base citosina (5mC) es la modificación más común sobre el ADN; las secuencias genéticas susceptibles a esta metilación son las regiones promotoras. Corresponden asimismo a las regiones ricas en citosina (islas CpG); cuando se encuentran metiladas, la transcripción no es posible. Es importante remarcar que estas modificaciones son reversibles, pueden ser removidas mediante el mecanismo de BER y existen proteínas encargadas de transferir el grupo metilo, ADN-metiltransferasas, y otro grupo de enzimas denominadas TET por sus siglas en inglés “ten eleven translocation” (traslocación diez once) que remueven el grupo metilo (12).

1.4. Modificaciones epigenéticas en glioblastoma

El acceso a la información genética también se regula mediante la remodelación de la cromatina, que se lleva a cabo con la adición de grupos metilo o acetilo, principalmente en los aminoácidos básicos de las histonas. La metilación de histonas se asocia con la represión de la expresión genética; en cambio, si ocurre en residuos de arginina o lisina, puede activar la transcripción. La metilación en histonas es llevada a cabo por un grupo de enzimas denominadas histonas metiltransferasas (HMT), las cuales requieren de un grupo donador de metilo; esta marca es igualmente reversible, ya que existen diversas proteínas que remueven esta modificación, como la desmetilasa específica de lisina (LSD-1) (13).

La importancia de estas modificaciones es la regulación de la expresión y por tanto, el programa celular, por lo que son claves para el desarrollo, diferenciación y regulación de genes de pluripotencia (14). Varios patrones de metilación son heredados, especialmente aquellos involucrados en desarrollo embrionario, cuya principal finalidad es la transmisión de los fenotipos de los progenitores (15), pero los cambios epigenéticos son más frecuentes que los cambios en la secuencia de ADN (16). La reversibilidad de estas modificaciones permite que la célula se adapte a señales extracelulares, por lo que se considera que la epigenética es el intermediario entre el ambiente y el genoma (17).

En el estudio del cáncer, estas modificaciones son relevantes ya que existe una diferencia entre la presencia de patrones de metilación/acetilación de histonas y metilación de ADN en células tumorales y células con un fenotipo normal. En la mayoría de los casos predomina un estado de hipometilación (18). Estas diferencias pueden contribuir significativamente al fenotipo tumorigénico, ya que la modificación de la accesibilidad de los factores de transcripción controla el silenciamiento o la expresión al alza de proteínas, y si se consideran las diferentes señales del microambiente tumoral, puede explicarse la generación de heterogeneidad clonal (19). Los patrones epigenéticos en los subtipos de glioblastoma son diferentes entre sí (20). El estado de hipometilación en algunas regiones promotoras o en intrones en células de glioblastoma de origen mesenquimal es contrastante con el estado de hipometilación que presentan las células de glioblastoma con mutación IDH-1. (21).

Existe una interrelación entre las modificaciones epigenéticas y el metabolismo en el glioblastoma. Esto se hace evidente ya que las regiones promotoras de enzimas glucolíticas, como enolasa-2 (ENO2), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), hexocinasa-3 (HK3) y L-lactato deshidrogenasa A (LDHA), se encuentran hipermetiladas en las células de glioblastoma con IDH1 mutante. Estas células, a su vez, producen 2- hidroxiglutarato, que inhibe la acción de la demetilasa de ADN TET2 y de las desmetilasas de histonas JHDM1 y KDM4 (22).

1.5. Reprogramación metabólica en glioblastoma

La reprogramación del metabolismo es un sello característico del cáncer que permite suplir a las células con la energía y precursores para la síntesis de nucleótidos, lípidos y proteínas requeridos para mantener la tasa elevada de crecimiento y proliferación. Se modifica la asignación de metabolitos para favorecer ciertas rutas metabólicas sobre otras y adicionalmente, los metabolitos contribuyen al microambiente tumoral (2). En las células de glioblastoma existe una fosforilación oxidativa disfuncional y la vía de obtención de energía preferente es la glucólisis anaerobia, denominado efecto Warburg, produciendo lactato, en parte por la sobreexpresión de LDHA. Otra ruta que está relacionada con el fenotipo de cáncer es la glutaminólisis dirigida por el oncogén c-Myc, donde el aminoácido glutamina es metabolizado hacia glutamato y alfa-cetoglutarato; cabe mencionar que este último es estructuralmente similar a 2- hidroxiglutarato (23).

Los productos metabólicos de las vías energéticas y de metabolismo que se encuentran elevados en las células cancerígenas a comparación a una célula normal, se denominan oncometabolitos, compuestos como 2-hidroxioglutarato, glucosa, fumarato, succinato, sarcosina, glutamina, asparagina, colina y lactato. La sobreproducción de estos compuestos evidencia la alteración metabólica de las células tumorales y pueden ser utilizados como biomarcadores en el diagnóstico y caracterización de cáncer (24).

1.6. Apoptosis en glioblastoma

El proceso de apoptosis es requerido para la eliminación de células dañadas o que terminan su vida útil. La apoptosis es un proceso controlado en el que se forman fragmentos celulares, que posteriormente son fagocitados por macrófagos. El inicio de la apoptosis puede ocurrir mediante dos vías (Figura 1): la vía intrínseca, también denominada apoptosis mitocondrial, puede ser resultado de señales de estrés intracelular. Inicia cuando la membrana externa de la mitocondria pierde integridad, ya sea por una despolarización, ruptura o bien permeabilización por las proteínas proapoptóticas BAX y BAK, lo que libera al citoplasma el citocromo C, factor inductor de apoptosis (AIF), endonucleasa G, y Smac/diablo; a su vez, se detiene la producción de ATP de la fosforilación oxidativa. A continuación, hay una formación del complejo proteico denominado apoptosoma, que convierte la procaspasa-9 a su forma activa caspasa-9, que es la molécula que activa a la caspasa efectora caspasa-3, que activa endonucleasas que degradan el ADN. En la ruta caspasa independiente, AIF y la endonucleasa G actúan a nivel nuclear, fragmentando el ADN, lo que irremediamente conduce a muerte celular (25), por lo que la pérdida de la integridad del material genético es ampliamente usada como un marcador de apoptosis.

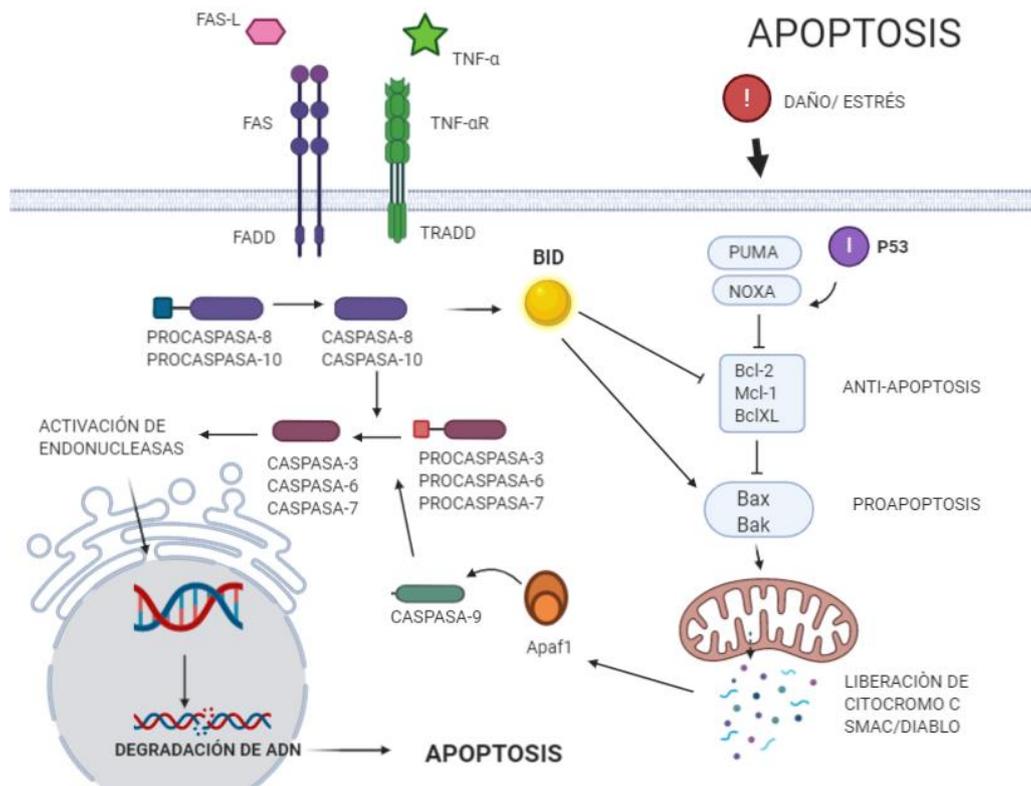


Figura 1. Vías de la apoptosis: Constructo del autor. Modificado de Ashkenazi A, et al. (25).

El proceso de apoptosis extrínseca está mediada por la señalización transmembranal de receptores, como el receptor del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y receptor de FAS, que se asocian a dominios intracelulares TRADD y FADD, respectivamente. Activan la procaspasa-8 a su forma activa caspasa-8, siendo la caspasa activadora de la vía extrínseca; esta activa a las caspasa-7, caspasa-6 y caspasa-3. Después, ambas vías convergen en el mismo mecanismo de activación de endonucleasas (25).

El proceso de apoptosis está regulado por proteínas de la familia Bcl-2. Todos los miembros de esta familia contienen al menos un dominio BH. Dentro de esta familia hay factores proapoptóticos que contienen solo el dominio BH3, como BAD, BID, BIK, BMF, HRK, NOXA y PUMA, y factores anti apoptóticos, como BCL-2, BCL-X, BCL-W, MCL-1 y BFL-1/A1, además de otros factores que forman poros en la mitocondria, por lo que su función es a favor de la apoptosis, como BAK, BAX y BOK (26).

La apoptosis es una respuesta normal a diversas situaciones celulares, como daño en el material genético, falta de nutrientes e hipoxia, pero las células cancerígenas tienen mecanismos que les permiten evadir la muerte celular, por lo que los tratamientos farmacológicos se diseñan con el objetivo de interrumpir el funcionamiento de los procesos celulares esenciales y conducir a la

célula a apoptosis; o bien, están dirigidos contra los procesos celulares desregulados que les confieren ventajas de proliferación, pero no hay un nivel de especificidad que permita discriminar una célula cancerígena de una célula normal, por lo que hasta el momento los tratamientos quimioterapéuticos están acompañados de una plétora de efectos adversos, como vómito, anorexia, úlceras bucales, síndrome de mano-pie, pérdida del cabello, etc. (27).

Entender el proceso de apoptosis nos brinda información de los cambios en la señalización celular o de estrés a los que son susceptibles las células carcinogénicas, con el objetivo de diseñar terapias más efectivas contra el cáncer. Un ejemplo es la inducción del proceso de apoptosis en células de glioblastoma, que puede ser iniciada por el ácido dicloro acético (DCA), que es un inhibidor de la piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK). La sobreexpresión de PDK en las células tumorales restringe el ciclo de los ácidos tricarboxílicos que ocurre en mitocondria, porque fosforila e inactiva la piruvato deshidrogenasa (PDH). El tratamiento con DCA permite restituir la actividad mitocondrial, lo que provoca acumulación de especies reactivas de oxígeno y conduce a la célula a apoptosis por vía intrínseca y como consecuencia, reduce el tamaño tumoral (28). Asimismo, el proceso de apoptosis por la vía extrínseca y la inhibición de la proliferación celular, que es causado por un inhibidor del canal iónico de calcio TRPC3, resulta en un decremento de la capacidad de crecimiento tumoral en células de glioma en un modelo de xenotrasplante (29).

1.7. Los micronutrientes y el cáncer

Los micronutrientes son compuestos requeridos en diversos procesos celulares, por lo que deficiencias de estos compuestos tienen manifestaciones clínicas y alteran la función inmunológica (30). Una dieta balanceada puede proveer los requerimientos nutricionales mínimos; sin embargo, adicional a los eventos adversos del tratamiento, el curso de la patología en cáncer por sí sola implica un estado de salud precario. Los tumores pueden contribuir de manera sistémica, secretando hormonas, proteínas catabólicas y citocinas inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina 1 beta (IL-1 β), y la IL-6, provocando un desbalance energético y catabólico que puede llevar a un estado de malnutrición, comprometiendo el estado inmunitario y la tolerancia al tratamiento (27).

Ya que los micronutrientes son requeridos para el correcto funcionamiento de diversos procesos celulares, fungen como cofactores y precursores en la síntesis de biomoléculas. Poseen la ventaja de tener un índice terapéutico elevado, lo que implica que difícilmente presentan efectos

secundarios. incluso a dosis altas. Adicionalmente, existen estudios referentes a la interferencia de la quimioterapia sobre la acción de micronutrientes como L-carnitina, vitaminas del grupo B, ácido fólico y elementos traza, como selenio y magnesio, que tiene como resultado complicaciones adicionales durante el tratamiento del cáncer (31).

A esta serie de evidencias se suman diversos estudios sobre el efecto antitumoral de los micronutrientes en células neoplásicas. Si bien estos estudios brindan evidencia sobre los roles de los micronutrientes en la modulación procesos celulares, hasta el momento, el uso de suplementos alimenticios, complejos multivitamínicos y compuestos antioxidantes en los pacientes oncológicos es una práctica empírica, ya que no hay estudios específicos para cada micronutriente y cada tipo de cáncer, por lo que es imposible adecuar la suplementación de manera personalizada.

Entre los micronutrientes más estudiados por su capacidad antioxidante se encuentra la familia de compuestos comúnmente referidos como vitamina E. Los tocotrienoles son una subclase perteneciente a este grupo, pueden inducir muerte celular en células neoplásicas epiteliales mamarias. El compuesto gamma-tocotrienol eleva la cantidad de caspasa-8 y caspasa-3, lo que desencadena la fragmentación del ADN como paso final del proceso de apoptosis. Uno de los posibles mecanismos es la disminución de la proteína antiapoptótica FLIP, como consecuencia de la activación de la vía PI3K/PDK/Akt (32). En contraste, un estudio clínico de cáncer de próstata demostró que el alfa tocoferol, también perteneciente al grupo de la vitamina E, carece de un efecto protector (33).

El grupo de los ácidos grasos poliinsaturados, micronutrientes requeridos para la formación de fosfolípidos, tienen actividad antitumoral en células de carcinosarcoma de rata, específicamente el ácido gamma linoleico y el ácido eicosapentanoico. Ambos micronutrientes promueven la liberación de citocromo C y la fragmentación del ADN, por la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (34).

Los elementos traza, como el selenio y magnesio, entre otros, también son considerados micronutrientes. Un estudio realizado sobre cáncer de mama aporta que el selenio en exceso perjudica a las células tumorales, pero no a las células normales, debido al metabolismo anormal de la cisteína presente en células tumorales (35). Es relevante considerar que el efecto que tiene la suplementación va de la mano con los factores de concentración y tiempo de exposición.

1.8. Vitaminas

Las vitaminas son micronutrientes orgánicos requeridos para el correcto desarrollo y funcionamiento celular. Se adquieren a través de la dieta y principalmente son cofactores de enzimas en reacciones metabólicas; sin embargo, estudios recientes han brindado evidencia de que las vitaminas tienen diversas actividades a nivel celular que pueden ser beneficiosas o perjudiciales en procesos patológicos, como el cáncer. Tal es el caso de la vitamina C, que incrementa los niveles de 5-hidroximetil-citosina (5hmC), ya que tiene un papel como cofactor de dioxigenasas TET. La 5hmC es una modificación epigenética de metilación sobre el ADN, por lo que modifica la expresión de genes y se asocia con la inhibición del crecimiento tumoral en cáncer de vejiga (36). En contraste, el exceso de tiamina (vitamina B1) promueve la síntesis de la enzima que cataliza la reacción bidireccional de fructosa 6-fosfato a pentosa 5-fosfato en la vía energética de las pentosas, por lo que favorece el crecimiento tumoral y debería de limitarse la ingesta en pacientes oncológicos (37).

Estos estudios ponen en evidencia la necesidad de realizar estudios de los efectos que tienen los micronutrientes bajo el contexto específico de cada tipo de cáncer, ya que alrededor del 48% de los pacientes consumen suplementos alimenticios y vitamínicos, en algunos casos sin conocimiento del médico tratante (27), lo que podría resultar ser una suplementación inadecuada.

1.9. Vitaminas del grupo B

Para los tumores originados en tejido nervioso como el glioblastoma, las vitaminas del grupo B, en particular, resultan relevantes, ya que estas vitaminas son requeridas para el correcto desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso. La deficiencia de estas vitaminas tiene como consecuencia disrupción de la mielinización en las células nerviosas y favorece procesos inflamatorios (38).

El grupo de vitaminas B está compuesto de 7 vitaminas: tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), niacina (vitamina B3), ácido pantoténico (vitamina B5), piridoxina (vitamina B6), ácido fólico o folato (vitamina B9) y cobalamina (vitamina B12) (39). Se ha descrito el rol de este grupo de vitaminas en el mantenimiento del correcto funcionamiento mitocondrial, ya que intervienen en diversas reacciones enzimáticas que ocurren en la mitocondria (40). A

continuación, se mencionan los principales procesos en los que participan cada una de las vitaminas del complejo B (Tabla 2).

Tabla 2. Funciones principales de las vitaminas del complejo B. (Modificado de Shayne, 2000) (39).

Vitamina	Nombre químico	Principales funciones
B1	Tiamina	La forma activa es tiamina pirofosfato. Está involucrada en el catabolismo de carbohidratos, síntesis de ácidos grasos, ácidos nucleicos y acetil colina. Tiene un papel en el transporte de sodio para la transmisión de impulsos neuronales.
B2	Riboflavina	Cofactor en reacciones oxido reducción, oxidación de grasas y carbohidratos, y reabastecimiento de glutatión,
B3	Niacina	Forma parte las coenzimas nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP), involucradas en la oxidación de carbohidratos, síntesis de proteínas y grasas.
B5	Ácido Pantenóico	Forma coenzima A, factor de síntesis de esteroides, compuestos acetilado y prostaglandinas.
B6	Piridoxina	La forma activa es el piridoxal fosfato. Está involucrado en el metabolismo de aminoácidos, neurotransmisores y en el catabolismo del glicógeno.
B9	Folato	Formación de glóbulos rojos y leucocitos, cofactor para la producción de colina y metionina y síntesis de ADN.
B12	Cobalamina	Cofactor del metabolismo del folato y metabolismo de carbono para la síntesis de ácidos nucleicos

Existe un diálogo de señalización molecular entre la mitocondria y el núcleo. Se ha descrito la señalización retrógrada, donde la mitocondria señala hacia el núcleo. Así, lo que sucede a nivel mitocondrial produce cambios a nivel nuclear, como activación de las vías de señalización de NF- κ B, que subsecuentemente tiene efectos en los factores de transcripción AP-1 y SP1 (41, 42). Estos dos últimos factores de transcripción se relacionan con el proceso de apoptosis. Dado que las vitaminas B participan en la producción de diferentes metabolitos mitocondriales, que posteriormente señalizan en la comunicación mitocondrial-nuclear, se infiere la intervención

de estas vitaminas en procesos como la señalización del factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1), un factor clave para la supervivencia de células en condiciones de hipoxia y un promotor de la angiogénesis y en cambios epigenéticos de metilación, tanto de ADN como de histonas (40).

1.10. Piridoxina y cobalamina

Este estudio se enfoca en las vitaminas piridoxina y cobalamina, ya que están implicadas en procesos celulares claves de metabolismo y síntesis de biomoléculas en el sistema nervioso. La piridoxina está involucrada en la síntesis de NAD^+ y del grupo heme, y es cofactor en reacciones del metabolismo energético (43). Esta vitamina, junto con otros compuestos derivados, como piridoxal y piridoxina-5-fosfato, han probado ser capaces de inducir citotoxicidad en líneas celulares neoplásicas derivadas de tejido nervioso (SHSY5Y). A mayor concentración, mayor es la expresión de BAX y caspasa 8, ambas proteínas pro-apoptóticas (44); estudios realizados sobre distintas líneas celulares, como melanoma murino (B16 y B16F10), melanoma humano (M21-HPB), hepatoma (HepG2), linfoma promonocítico y cáncer gástrico, brindan evidencia de la disminución de la proliferación celular y el crecimiento celular debido a la suplementación con piridoxina en un rango de concentración de 0.5 mM a 5 mM (45,46). Recientemente se describió que la piridoxina es capaz de activar la vía de señalización de PKM2-Nrf2 (47), cuya activación no solo se limita a la expresión de genes a favor de la protección contra estrés oxidante; también está relacionada con procesos como proteólisis, autofagia, respuesta a proteínas no plegadas y biogénesis mitocondrial (48).

Por su parte, la cobalamina es la vitamina más grande y compleja de este grupo. Es cofactor en procesos de degradación de ácidos grasos y de aminoácidos, síntesis de glutatión y de manera importante, participa en la conversión de metilmalonil-CoA a succinil-coA, como cofactor requerido de la enzima metilmalonil-coenzima A mutasa (MUT). Adicionalmente, en citoplasma, la cobalamina es cofactor en la transformación de homocisteína a metionina y producción de tetrahidrofolato (THF) por transmetilación mediada por metiltetrahidrofolato (MTHF), que lleva a cabo la enzima metionisintasa (MS) (49). A nivel celular, la acumulación de homocisteína causa estrés en el retículo endoplásmico y disfunción lisosomal (50).

Las líneas de cáncer de mama humano T47D y MCF-7 presentan inhibición de crecimiento y un aumento de células apoptóticas de hasta el 44% al ser suplementadas con compuestos como cobalamina, folato, colina y metionina, que contienen un grupo metilo y son denominados lipotropos. Un resultado prometedor es que, en la línea celular T47D, la proteína antiapoptótica

Bcl-2 se encuentra disminuida posterior a la suplementación con cobalamina a una concentración de 1400 nM (51).

2. Planteamiento del problema

El cáncer se define como una serie de alteraciones a nivel celular que afectan la proliferación, crecimiento, muerte y diferenciación de las células, pudiendo afectar a diferentes órganos y originar una gran variedad de manifestaciones clínicas. Debido a la multiplicidad de la desregulación celular, existe un verdadero reto en el desarrollo de tratamientos farmacológicos.

Dentro de los tipos de cáncer con un menor pronóstico de supervivencia está el glioblastoma, que es un cáncer cerebral originado por las células gliales. En adultos, se presentan con mayor incidencia, representando el 27% de los tumores cerebrales primarios. Debido a la localización y a la heterogeneidad genética, la mayoría de los pacientes con glioblastoma, aún con la ayuda de terapia farmacológica, tienen una esperanza de vida menor a 2 años.

En estudios recientes, se ha descrito la actividad anticancerígena de algunos nutrimentos como ácidos grasos y vitaminas, relacionándola con la modulación de procesos celulares como el ciclo celular y apoptosis. Específicamente, la piridoxina y la cobalamina actúan como coenzimas y cofactores para llevar a cabo la biosíntesis de ácidos nucleicos y el metabolismo energético, donde los productos derivados de estas rutas metabólicas pueden señalar para promover o inhibir la muerte celular. Estudiar *in vitro* la suplementación con piridoxina y cobalamina a diferentes concentraciones y su efecto sobre la apoptosis en una línea celular de glioblastoma, puede brindar evidencia del uso de estas vitaminas como un tratamiento alternativo coadyuvante a la terapéutica actual.

Pregunta de investigación:

1.- ¿Qué efecto tiene la suplementación *in vitro* con piridoxina y cobalamina a diferentes concentraciones sobre la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis en una línea celular de glioblastoma humano?

3. Hipótesis

Hipótesis alternas:

- La suplementación *in vitro* con piridoxina modifica la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis en la línea celular de glioblastoma humano U-87 MG.
- La suplementación *in vitro* con cobalamina modifica la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis en la línea celular de glioblastoma humano U-87 MG.

Hipótesis nulas:

- La suplementación *in vitro* con piridoxina no modifica la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis en la línea celular de glioblastoma humano U-87 MG.
- La suplementación *in vitro* con cobalamina no modifica la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis en la línea celular de glioblastoma humano U-87 MG.

4. Objetivos

General:

- Analizar los cambios en la expresión de proteínas relacionadas con apoptosis en la línea celular de glioblastoma humano U-87 MG suplementada con diferentes concentraciones de piridoxina y cobalamina.

Específicos:

- Determinar la expresión basal de las proteínas caspasa 3 activa y Bcl-2 en la línea celular de glioblastoma humano U-87 MG por medio de la técnica de western blot.
- Determinar la expresión de las proteínas caspasa 3 activa y Bcl-2 en la línea celular de glioblastoma humana U-87 MG posterior a la suplementación con piridoxina y/o cobalamina, por medio de western blot.
- Evaluar los cambios en la viabilidad de la línea celular U-87 MG posterior a la suplementación con piridoxina y/o cobalamina, a diferentes tiempos y diferentes concentraciones, mediante el ensayo de cristal violeta.
- Determinar si la expresión intracelular de caspasa 3 activa aumenta posterior a la suplementación con piridoxina, mediante citometría de flujo.
- Evaluar el ciclo celular posterior a la suplementación con piridoxina y/o cobalamina, mediante una tinción con yoduro de propidio, por citometría de flujo.

5. Justificación

De acuerdo con la OMS, en 2018 hubo 18 millones de casos nuevos de cáncer. Dependiendo del tipo de cáncer, la tasa de supervivencia es muy variable. Alrededor del 28% de los pacientes inicia un tratamiento con quimioterapia, donde se presentan diversos efectos adversos que, aunados al curso patológico del cáncer, pueden inducir en el paciente un síndrome de anorexia-caquexia y una deficiencia nutricional, lo que aumenta el riesgo de complicaciones e incluso puede impactar la adherencia al tratamiento.

El glioblastoma multiforme es el tumor cerebral primario con mayor incidencia en adultos y debido a su agresividad, el pronóstico de supervivencia es bajo. En promedio, el tratamiento con temozolomida aumenta la supervivencia de los pacientes un par de meses y actualmente no existe una alternativa más efectiva. La calidad de vida de los pacientes disminuye considerablemente debido a la propia sintomatología de los tumores cerebrales y los efectos adversos del tratamiento, lo que demanda la investigación de opciones más efectivas y seguras para el tratamiento de este padecimiento.

Se ha reportado que la suplementación con micronutrientes se presenta en 48% de los pacientes oncológicos, tomando en cuenta el consumo de vitaminas, elementos traza y ácidos grasos; sin embargo, es necesario estudiar el efecto de la suplementación en el contexto específico del tipo de cáncer. La piridoxina y la cobalamina son vitaminas del complejo B, requeridas para el funcionamiento adecuado del sistema nervioso. Se ha demostrado que la piridoxina disminuye la viabilidad de células de glioblastoma. Ya que ambas vitaminas son importantes en diversos procesos celulares y actúan como cofactores en rutas metabólicas, la suplementación con estas podría modificar la proliferación celular e incluso inducir apoptosis en diversos tipos celulares.

Sin embargo, aún no hay estudios que describan si estas vitaminas favorecen la proliferación de las células tumorales de glioblastoma y su efecto específicamente sobre el proceso de apoptosis, por lo que estudiar la expresión de proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas, determinará si la presencia de piridoxina y cobalamina induce muerte celular en células de glioblastoma humano y por tanto, permitirá tener un precedente sobre el uso de estos micronutrientes durante el curso y tratamiento de esta patología.

6. Materiales y métodos:

6.1. Diseño de Estudio

- Tipo de estudio.

Prospectivo, Experimental

- Universo

Células de la línea celular de glioblastoma humano U-87 MG.

- Método de muestreo

Cultivos por triplicado para cada grupo.

- Tamaño de muestra.

Cultivos de 5×10^5 de células por muestra.

6.2. Cultivo celular

Se realizaron cultivos de la línea celular humana U-87 MG, derivada de glioblastoma, la cual es adherente y crece en medio de cultivo modificado de Dulbecco (DMEM), adicionado con suero fetal bovino (FBS) al 10% y 1% de antibióticos. Los cultivos se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura a 37°C y con atmosfera de 5% de CO₂.

6.3. Suplementación

Se realizó la suplementación de acuerdo con los siguientes 4 grupos:

- Grupo control, sin suplementación.
- Grupo con suplementación con piridoxina a concentraciones de 0, 10, 100, 1000, 2000, 3000 y 4000 nmol/mL.
- Grupo con suplementación con cobalamina a concentraciones de 0, 0.5, 1.5, 2.0, 10 y 100 nmol/mL.
- Grupo suplementado con ambas vitaminas: 100 nmol/mL de piridoxina con 100 nmol/mL de cobalamina, 4000 nmol/mL de piridoxina con 100 nmol/mL de cobalamina, 100 nmol/mL de piridoxina con 0.5 nmol/mL de cobalamina y 4000 nmol/mL de piridoxina con 0.5 nmol/mL de cobalamina.

Cada grupo tuvo una incubación de 24, 48 y 72 h y se realizó por triplicado, ya que el tiempo de duplicación en esta línea celular es de 39 h (65), al término de la incubación las células fueron observadas al microscopio para observar su morfología y se verificó si hay cambios en

la confluencia del cultivo celular. La tabla 2 muestra la distribución de los grupos experimentales.

Tabla 3. Distribución de los grupos de acuerdo con la suplementación.

	Tiempo (horas)	Suplementación nmol/mL
Grupo piridoxina	24	<ul style="list-style-type: none"> • 0 • 10
	48	<ul style="list-style-type: none"> • 100 • 1000 • 2000 • 3000
	72	<ul style="list-style-type: none"> • 4000
Grupo cobalamina	24	<ul style="list-style-type: none"> • 0 • 0.5
	48	<ul style="list-style-type: none"> • 1.5 • 2.0 • 10
	72	<ul style="list-style-type: none"> • 100
Grupo piridoxina y cobalamina	24	<ul style="list-style-type: none"> • 0
	48	<ul style="list-style-type: none"> • 100 nmol/mL de piridoxina con 100 nmol/mL de cobalamina • 4000 nmol/mL de piridoxina con 100 nmol/mL de cobalamina
	72	<ul style="list-style-type: none"> • 100 nmol/mL de piridoxina con 0.5 nmol/mL de cobalamina • 4000 nmol/mL de piridoxina con 0.5 nmol/mL de cobalamina.

6.4. Ensayo de viabilidad con cristal violeta

Un método simple para cuantificar la viabilidad es mediante el uso de colorante cristal violeta en células adherentes. El cristal violeta se une a proteínas y ADN. Ya que la capacidad de adherencia se presenta en las células viables, cuando las células sufren muerte celular pierden

su adherencia y se reduce la cantidad de colorante que puede ser retenido en la superficie de la placa, siendo una medición indirecta de viabilidad.

En una placa de 96 pozos se sembraron 1.5×10^4 células. Se permitió que se adhirieran a la placa mediante una incubación de 4 horas. Posteriormente, se suplementaron las células con las diferentes concentraciones de vitamina. Al finalizar el tiempo de estimulación, se retiró el medio y se realizaron dos lavados con agua destilada, evitando que el agua pueda despegar la capa de células adheridas. Se invirtió la placa para retirar la mayor cantidad de agua posible.

A cada pozo se le colocó 50 μ L de cristal violeta al 0.5% preparado en 1:5 metanol-agua y se incubó con agitación por 20 minutos. Transcurrido el tiempo, se realizó nuevamente lavados con agua, por duplicado, y se dejó secar sin colocar la tapa, por mínimo 2 horas a temperatura ambiente.

Se colocó 200 μ L de metanol y se incubó en agitación durante 20 min. Transcurrido el tiempo, se realizó la lectura de absorbancia a 580 nm de la placa.

6.5. Extracción de proteínas

Aproximadamente 2×10^6 células fueron sembradas. Se realizó la suplementación de acuerdo con cada grupo experimental. Se retiró el medio. Las células se lavaron con PBS 1X. Se incubaron las placas con 1 -2 mL de Tripsina-EDTA, dando golpes a la caja para despegar las células. Se colocó 1 mL de medio y se recolectó todo el contenido, asegurándose que no queden células adheridas en la caja. Se centrifugaron los tubos durante 5 min a 3,000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se retiró todo el medio. Consecuentemente, se resuspendieron las células y se añadieron 200 -300 μ L de solución de lisis (Anexo 1). Se recuperaron las células en un tubo de 1.5 mL y se incubaron en hielo 45 min, haciendo vortex cada 15 min. Transcurridos los 45 min en hielo, se centrifugaron a 13,000 rpm por 25 min. Se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio y etiquetado. Se cuantificó las proteínas por el método de Bradford y se procedió inmediatamente a dosificar las muestras.

6.6. Cuantificación y dosificación de proteínas

Se realizaron disoluciones seriadas de BSA (albúmina sérica bovina) a 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 y 1.2 mg/mL, colocando 5 μ L de cada concentración por duplicado, así como 1 μ L de la solución de lisis y de cada muestra obtenida, en pozos separados. Se añadió 200 μ L del reactivo de Bradford. Se colocó en un agitador de placa por 30 s y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Se realizó la lectura con un lector de placa a 595 nm y se determinó la concentración de las muestras acorde a la curva de calibración de BSA. Se ajustaron las muestras para una

concentración de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, usando buffer de carga 4X (SLB, *sample loading buffer*). Las muestras fueron calentadas a 95°C por 5 min y se incubaron en hielo 5 min, antes de proceder con la electroforesis.

6.7. Western Blot

Se utilizó la técnica de western blot para determinar de manera semicuantitativa la expresión de las proteínas caspasa-3 activa y Bcl-2. Se realizó primero una electroforesis desnaturizante SDS-PAGE, usando un gel concentrador de 15% y un gel separador del 4%, (Anexo 3) y buffer de corrida (Anexo 4). Se cargaron 60 μg de proteína de las muestras de lisado celular, así como un marcador de peso de peso molecular. Se corrió el gel a voltaje constante de 100 V durante 1-2 horas, hasta que el frente de corrimiento llegara al final del gel.

Al terminar el proceso de electroforesis, se realizó la transferencia horizontal semiseca, donde se empleó una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) previamente hidratada con metanol absoluto y enjugada con buffer de transferencia (Anexo 4). Se colocó el gel sobre la membrana en la cámara de transferencia y se llevó a cabo la transferencia durante 1 h, a un voltaje de 25 V. Finalizada la transferencia, se enjuagó la membrana con una solución de TRIS con 0.1% de Tween-20 (TBST) y se bloqueó la membrana con una solución de TBST y BSA al 1% durante 1 h, a temperatura ambiente, en agitación suave.

Los anticuerpos anti-beta-actina, anti-caspasa 3 activa y anti-Bcl-2 se usaron a una concentración de 1:1,000 en BSA 1%. Se incubaron con la membrana durante toda la noche, en agitación suave a 4°C. Posteriormente, las membranas fueron lavadas 3 veces con TBST durante 5 min. Posteriormente, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), diluido en BSA al 1%, a una concentración de 1:10,000. La incubación se realizó durante 2 horas en agitación suave. Al término de la incubación, las membranas se lavaron 3 veces durante 5 min con TBST. Finalmente, la membrana fue revelada por el método de diaminobencidina (DAB), utilizando 150 μL de DAB y 30 μL de H_2O_2 en 10 mL de PBS. Como control de carga, se utilizó la expresión de beta-actina en todas las muestras y los resultados obtenidos de la determinación de densidad óptica de las bandas de proteína fueron normalizados en base al valor de densidad óptica del control para cada muestra. Los resultados fueron analizados con el programa ImageJ (NIH).

6.8.Ciclo celular

Para la determinación del ciclo celular, se usó una tinción con ioduro de propidio, que se une al DNA y cuya fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN en las células, por lo que es posible hacer una estimación de la fase del ciclo celular en las que las células se encuentran, empleando citometría de flujo. Se fijaron 1×10^6 células con etanol al 70 % a 4 °C durante 30 minutos; luego, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en PBS. Se añadió 0.1 mg/mL de ARNasa y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se tiñeron con 13 μ L de PI, a una concentración de 0.05 mg/mL. Luego, se incubó en la oscuridad durante 30 min a 37°C. Se adquirieron 30.000 eventos en un citómetro de flujo Accuri (BD Biosciences) a una longitud de onda 490 nm.

6.9.Tinción intracelular

Se colocaron 1×10^6 células en tubos redondos de citometría de flujo; luego, se fijaron con formaldehído al 4 % y se permeabilizaron con tampón BD Perm/Wash™ durante 5 min, en hielo. Se lavaron con 1 ml de FBS al 10 % en PBS y luego se resuspendieron en 200 μ l de la misma solución. Se agregó el anticuerpo primario (anti-caspasa 3 activa y anti-Bcl2) y se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de PBS 10% FBS y se agregó el anticuerpo secundario (anti-mouse Alexa 488). Se incubó en la oscuridad durante 25 min a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS con 10% FBS. Las células teñidas se suspendieron en 300 μ l de formaldehído al 4 % y se adquirieron 100,000 eventos en un citómetro de flujo Accuri (BD Biosciences).

6.10. Variables de Estudio

- Dependientes: Expresión de proteínas relacionadas a la apoptosis, viabilidad celular, ciclo celular.
- Independientes: Suplementación con piridoxina y cobalamina, Tiempo de exposición.

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis Estadísticos
DEPENDIENTES					
Expresión de proteínas relacionadas a la apoptosis	Cantidad de la proteína que produce la célula.	Determinación de densidad óptica de las bandas proteínas Bad, Bid y Bcl-2 expresada por las células.	Semicuantitativa discreta	Densidad óptica	ANOVA
Inducción de apoptosis	Número de células que presentan ADN fragmentado	Cuantificación de células que presentan ADN fragmentado por medio de técnica de citometría de flujo	Cuantitativa discreta	Número de células	ANOVA
INDEPENDIENTES					
Suplementación con piridoxina y cobalamina. Grupo 1 Grupo 2 Grupo 3	Suplementación con cobalamina y/o piridoxina en el medio de cultivo.	Concentración de piridoxina y/o cobalamina adicionada al medio de cultivo. Piridoxina 0, 10, 100, 1000, 2000, 3000 y 4000 nmol/mL . Cobalamina a concentraciones de 0, 0.5, 1.5, 2.0, 10, 100 nmol/mL	Cuantitativa	μmol/L.	ANOVA
Tiempo de exposición. Grupo de 24 h Grupo de 48 h Grupo de 72 h	Período entre el momento que se tiene interacción con algún agente hasta que cesa la interacción.	Cantidad de tiempo que se mantendrán las células en el medio cultivo suplementado. Grupos de 24, 48 y 72 horas	Cuantitativa	Grupos de 24, 48 y 72 horas	ANOVA

6.11. Implicaciones Bioéticas

El estudio se desarrolló conforme a lo establecido en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y en cumplimiento con los aspectos mencionados en el Título Décimo Cuarto de la Ley, los estudios realizados con órganos, tejidos y sus derivados humanos, al ser una línea celular ya establecida y ampliamente descrita no es considerada como material relevante.

6.12. Recolección de Datos

La recolección de datos se llevó a cabo en una base electrónica, así como en físico, y las imágenes de los resultados obtenidos tanto un medio electrónico como físico.

6.13. Análisis Estadísticos

Se utilizaron pruebas de medidas repetidas para la comparación entre grupos (mínimo tres) y ANOVA de 2 vías para la comparación de los efectos de la concentración y tiempo de exposición sobre las variables dependientes. Se consideraron valores de $p < 0.05$ como estadísticamente significativos. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism versión 7.0.

7. Resultados

7.1. Carta de envío del artículo

Submission received for International Journal of Neuroscience (Submission ID: 221842158)

rpsupport@tandf.co.uk <rpsupport@tandf.co.uk>

Wed 7/27/2022 12:05 PM

To: Irazú Contreras García <icontrerasg@uaemex.mx>



Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Dear IRAZU CONTRERAS,

Thank you for your submission.

Submission ID	221842158
Manuscript Title	Effect of pyridoxine or cobalamin supplementation on apoptosis and cell cycle progression in a human glioblastoma cell line
Journal	International Journal of Neuroscience

You can check the progress of your submission, and make any requested revisions, on the [Author Portal](#).

Thank you for submitting your work to our journal.
If you have any queries, please get in touch with INES-peerreview@tandf.co.uk.

Kind Regards,
International Journal of Neuroscience Editorial Office

7.2. Abstract del artículo

Glioblastoma is the most aggressive type of brain tumor, with current therapies failing to significantly improve survival of patients. Vitamins have important effects on cellular processes that are relevant for tumor development and progression. Pyridoxine and cobalamin are considered key vitamins to the nervous system and play a role in the regulation of cell metabolism, proliferation, and apoptosis. The present study explored the effect of pyridoxine or cobalamin supplementation on cell viability and cell cycle progression of human glioblastoma cell line U87MG.

Cell cultures were treated with increasing concentrations of pyridoxine or cobalamin for 24-72 hours. After supplementation, cell viability was assessed by a colorimetric assay using crystal violet, as well as by analysis of Bcl-2 and active caspase 3 expression by western blot. In addition, cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry with propidium iodide and active caspase 3.

Our results show that supplementation with pyridoxine decreases cell viability in a dose and time dependent manner. Loss of viability in vitamin-supplemented cells was probably not due to cell cycle arrest since no significant differences were observed in cell proliferation assays. In addition, Bcl-2 expression was not altered by vitamin supplementation, but active caspase 3 expression was significantly increased in pyridoxine, but not cobalamin-supplemented cells. Hence, our results suggest that pyridoxine supplementation enhances apoptosis induction in glioblastoma cells.

8. Discusión

La vitamina B6 se puede encontrar en diferentes moléculas denominadas vitámeros, como piridoxina, piridoxamina, piridoxal, piridoxamina-5-fosfato y piridoxal-5-fosfato; esta última es la forma bioactiva. La célula es capaz de transformar la molécula de piridoxina y otros vitámeros hasta piridoxal-5-fosfato, que actúa como cofactor de enzimas esenciales para la síntesis de neurotransmisores y en otros procesos celulares, (66).

El efecto de pérdida de viabilidad con la suplementación con piridoxina se ha descrito en líneas celulares de linfoma y de neuroblastoma (46,67). Para la línea celular de glioblastoma U87 MG, concentraciones superiores a 1000 μ M afectan la viabilidad. Esto es probablemente debido a que concentraciones elevadas de piridoxina inhiben competitivamente la actividad de piridoxal-5-fosfato, con la consecuencia inmediata de que los procesos celulares que requieren piridoxal-5-fosfato, como la síntesis de ADN, son obstaculizados (67, 68). En cultivos de 72 h, se observó que no se aumenta la frecuencia relativa de células en fase G0/G1, y disminuye de manera significativa la población de las células en fase S y por consecuencia la población en fase G2/M, lo que indica que posiblemente la suplementación impide a la célula pasar el punto de control G1/S y no ocurre la duplicación de ADN, promoviendo así el proceso de apoptosis. La suplementación con cobalamina no induce cambios en las frecuencias relativas en las distintas fases del ciclo celular, a 24 h y 48 h las proporciones se mantienen constantes en todos los grupos suplementados, a 72 h se tiene un incremento no significativo de aproximadamente 5% de la frecuencia de células en fase G0/G1 tras la suplementación con 0.5 nmol/mL de cobalamina en comparación al grupo no suplementado.

El proceso de apoptosis, tanto de manera intrínseca como extrínseca, convergen en la activación de las caspasas 9 y 3. La caspasa 8, que es activada únicamente mediante la vía extrínseca, es capaz de activar a las caspasas 3 y 9 (69). A dosis bajas de piridoxina, la expresión de caspasa 8 esta incrementada en la línea de neuroblastoma SH-SY5Y (67), lo que podría causar el incremento de caspasa 3 intracelular que observamos, pero no se puede excluir que también haya activación de esta caspasa mediante la vía intrínseca, ya que también hay evidencia de que la suplementación con piridoxina puede inducir piroptosis en una línea celular de leucemia monocítica (70), es posible otros procesos de muerte celular como piroptosis o necroptosis puedan ocurrir.

En la práctica clínica los niveles altos de cobalamina en suero se definen como superiores a 950 pg/mL (701 pmol/L), que pueden ser consecuencia de una absorción deficiente o por una administración exógena excesiva, los niveles altos de cobalamina causan hiperhomocisteinemia

y niveles elevados de ácido metilmalónico, sin embargo, lo mismo ocurre en casos de deficiencia de cobalamina (71). Las fisiopatologías más comunes asociadas con niveles altos de cobalamina son tumores sólidos, cánceres hematológicos y patologías hepáticas (72).

La suplementación realizada con cobalamina no presenta resultados significativos en cambio de viabilidad ni en la expresión intracelular de caspasa 3 activa, esto puede deberse en parte a que la solubilidad de la cobalamina es menor, no se pueden utilizar concentraciones en el mismo rango que la piridoxina, por lo que quizá no es posible alcanzar una concentración lo suficientemente alta para modificar los procesos celulares, adicionalmente la asimilación por parte de las células requiere dos pasos importantes, primero la unión de la cobalamina con la proteína factor gástrico intrínseco (IF), una vez asociado es captado por el receptor cubilina, que es expresado en la membrana apical de las células epiteliales en el íleo, dentro de estas células la molécula de cobalamina se une a otra proteína denominada transcobalamina que puede unir a la molécula de cobalamina en forma de ferrocobalamina y cianocobalamina; las células del cuerpo importan la transcobalamina mediante el receptor TC II unida a la transcobalamina (73). Dado este complejo mecanismo de absorción la suplementación directa puede no ser adecuada para lograr la asimilación de cantidades significativas de cobalamina y por ende no observamos modificaciones en la viabilidad celular, alteración en la expresión caspasa 3 activa o modificaciones en el ciclo celular.

9. Conclusiones

La suplementación con piridoxina a altas concentraciones afecta la viabilidad de las células de glioblastoma humano de la línea celular U 87-MG, e incrementa la cantidad de caspasa 3 activa en las mismas sin modificar la expresión de Bcl-2, lo que favorece la inducción del proceso de muerte celular. La suplementación con 100 nmol/mL de cobalamina no incrementa la expresión de caspasa 3 activa, tampoco modifica la progresión del ciclo celular o la viabilidad, por lo que la piridoxina, pero no la cobalamina, podría ser un micronutriente auxiliar en el tratamiento de glioblastoma.

10. Referencias Bibliográficas

1. Hanahan, D., Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; *100*(1), 57-70.
2. Hanahan, D., Weinberg, R. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 2011; *144*(5), 646-674.
3. Baldo, P., Fornasier, G., Ciolfi, L., Sartor, I., Francescon, S. Pharmacovigilance in oncology. *International Journal of Clinical Pharmacy*, 2018; *40*(4), 832-841.
4. Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A. Kleihues, P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, 2007; *114*(2), 97-109.
5. Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Xu, J., Kromer, C., Wolinsky, Y., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, J. S. CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2009–2013. *Neuro-Oncology*, 2016 *18*(s5), v1-v75.
6. Chen, R., Smith-Cohn, M., Cohen, A. L., Colman, H. Glioma Subclassifications and their clinical significance. *Neurotherapeutics*, 2017; *14*(2), 284-297.
7. Hombach-Klonisch, S., Mehrpour, M., Shojaei, S., Harlos, C., Pitz, M., Hamai, A., Ghavami, S. Glioblastoma and chemoresistance to alkylating agents: Involvement of apoptosis, autophagy, and unfolded protein response. *Pharmacology Therapeutics*, 2018; *184*, 13-41.
8. Hoshida, R., Jandial, R. 2016 World Health Organization classification of central nervous system tumors: An era of molecular biology. *World Neurosurgery* 2016, *94*, 561-562.
9. Wick, W., Gorlia, T., Bendszus, M., Taphoorn, M., Sahm, F., Harting, I., Van den Bent, M. J. Lomustine and Bevacizumab in progressive glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 2017; *377*(20), 1954-1963.
10. Trejo-Solís, C., Serrano-García, N., Escamilla-Ramírez, Á., Castillo-Rodríguez, R., Jiménez-Farfán, D., Palencia, G. Sotelo, J. Autophagic and Apoptotic pathways as targets for chemotherapy in glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018; *19*(12), 3773.
11. Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E. R., Morrison, S. J. Heterogeneity in cancer: Cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell*, 2009; *138*(5), 822-829.
12. Bayraktar, G., Kreutz, M. R. The role of activity-dependent DNA Demethylation in the adult brain and in neurological disorders. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2018; *11*.

13. Bradshaw, R. A., Dennis, E. A. *Handbook of cell signaling*. Academic Press. (3rd ed.) 2010; 57-89.
14. Loscalzo, J., Handy, D. E. Epigenetic modifications: Basic mechanisms and role in cardiovascular disease *Pulmonary Circulation*, 2014; 4(2), 169-174.
15. Lind, M. I., Spagopoulou, F. Evolutionary consequences of epigenetic inheritance. *Heredity*, 2018; 121(3), 205-209.
16. Choi, J. D., Lee, J. Interplay between epigenetics and genetics in cancer. *Genomics Informatics*, 2013; 11(4), 164.
17. Miozzo, M., Vaira, V., Sirchia, S. M. Epigenetic alterations in cancer and personalized cancer treatment. *Future Oncology*, 2015; 11(2), 333-348.
18. Stern, L. L., J B. Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers*, 2000; 9(8), 849-53.
19. Hawkins, L. J., Al-attar, R., Storey, K. B. Transcriptional regulation of metabolism in disease: From transcription factors to epigenetics. *PeerJ*, 2018; 6, e5062
20. Cui, X., Ma, C., Vasudevaraja, V., Serrano, J., Tong, J., Peng, Y., Delorenzo, M., Shen, G., Frenster, J., Morales, R. T., Qian, W., Tsirigos, A., Chi, A. S., Jain, R., Kurz, S. C., Sulman, E. P., Placantonakis, D. G., Snuderl, M., & Chen, W. Dissecting the immunosuppressive tumor microenvironments in Glioblastoma-on-a-Chip for optimized PD-1 immunotherapy. , 202;0 9, e52253.
21. Dong, Z., & Cui, H. Epigenetic modulation of metabolism in glioblastoma. *Seminars in Cancer Biology*, 2019; 57, 45-51.
22. Xu, W., Yang, H., Liu, Y., Yang, Y., Wang, P., Kim, S., Xiong, Y. Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-Dependent Dioxygenases. *Cancer Cell*, 2011; 19(1), 17-30.
23. Agnihotri, S., Zadeh, G. Metabolic reprogramming in glioblastoma: The influence of cancer metabolism on epigenetics and unanswered questions. *Neuro-Oncology*, 2015; 18(2), 160-172.
24. Khatami, F., Aghamir, S. M., Tavangar, S. M. Oncometabolites: A new insight for oncology. *Molecular Genetics Genomic Medicine*, 2019; 7(9).
25. Ashkenazi, A., Holland, P., Eckhardt, S. Ligand-based targeting of Apoptosis in cancer: The potential of recombinant human Apoptosis ligand 2/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL). *Journal of Clinical Oncology*, 2008; 26(21), 3621-3630.

26. Lomonosova, E., Chinnadurai, G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: An overview. *Oncogene*, 2008; 27(S1), S2-S19.
27. Gröber, U., Holzhauser, P., Kisters, K., Holick, M., Adamietz, I. Micronutrients in Oncological intervention. *Nutrients*, 2016; 8(3), 163.
28. Michelakis, E. D., Sutendra, G., Dromparis, P., Webster, L., Haromy, A., Niven, E., Petruk, K. C. Metabolic modulation of glioblastoma with Dichloroacetate. *Science Translational Medicine*, 2010; 2(31), 31ra34-31ra34.
29. Chang H, -H, Cheng Y, -C, Tsai W, -C, Tsao M, -J, Chen Y: Pyr3 Induces Apoptosis and Inhibits Migration in Human Glioblastoma Cells. *Cell Physiol Biochem*, 2018; 48, 1694-1702.
30. Gómez-Salas, G. Micronutrients and Chronic Diseases: Which Way Is The Scientific Evidence Pointing To? *Acta Médica Costarricense*, 2009; 51(3), 147-154.
31. Hübner, J. Update Komplementäre Onkologie. *Der Onkologe*, 2013; 19(11), 970-982.
32. Shah S, Sylvester PW. Tocotrienol-induced caspase-8 activation is unrelated to death receptor apoptotic signaling in neoplastic mammary epithelial cells. *Exp Biol Med*. 2004; 229(8), 745-55.
33. Klein EA, Thompson IM Jr, Tangen CM, Crowley JJ, Lucia MS, Goodman PJ, et. Al. Vitamin E and the risk of prostate cancer: The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA*. 2011; 306(14), 1549-56.
34. Colquhoun A, Schumacher RI. gamma-Linolenic acid and eicosapentaenoic acid induce modifications in mitochondrial metabolism, reactive oxygen species generation, lipid peroxidation and apoptosis in Walker 256 rat carcinosarcoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 2001; 1533(3), 207-19.
35. Carlisle A, Lee N, Matthew-Onabanjo A, Spears M, Park S, Youkana D et al. Selenium detoxification is required for cancer-cell survival. *Nature Metabolism*. 2020; 2(7), 603-611.
36. Peng, D., Ge, G., Gong, Y., Zhan, Y., He, S., Guan, B., Zhou, L. Vitamin C increases 5-hydroxymethylcytosine level and inhibits the growth of bladder cancer. *Clinical Epigenetics*, 2018; 10(1).
37. Cascante, M., Centelles, J. J., Veech, R. L., Lee, W. P., Boros, L. G. Role of thiamin (Vitamin B-1) and Transketolase in tumor cell proliferation. *Nutrition and Cancer*, 2000; 36(2), 150-154.
38. M. M. Effects of vitamin B12 and folate deficiency on brain development in children. *Food and Nutrition Bulletin*, 2008; 29 (s11), S126-S131.

39. Shayne V. Whole food nutrition, the missing link in vitamin therapy. San Jose [Calif]: *iUniverse.*; 2000; 80-89.
40. Janssen, J. J., Grefte, S., Keijer, J., De Boer, V. C. Mito-nuclear communication by mitochondrial metabolites and its regulation by B-vitamins. *Frontiers in Physiology*, 2019; 10.
41. Iwanaszko, M., Kimmel, M. NF- κ b and IRF pathways: Cross-regulation on target genes promoter level. *BMC Genomics*, 2015; 16(1).
42. West, A. P., Shadel, G. S., Ghosh, S. Mitochondria in innate immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 2011; 11(6), 389-402.
43. Mackey A., Davis S., Gregory J. Vitamin B6. In: Shils M., Shike M., Ross A., Caballero B., Cousins R., editors. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Lippincott Williams and Wilkins; Baltimore, MD, USA: 2006; 194–210
44. Vrolijk M, Opperhuizen A, Jansen E, Hageman G, Bast A, Haenen G. The vitamin B6 paradox: Supplementation with high concentrations of pyridoxine leads to decreased vitamin B6 function. *Toxicology in Vitro*. 2017; 44,206-212.
45. Matsuo T, Sadzuka Y. In Vitro Anticancer Activities of B6 Vitamers: A Mini-review. *Anticancer Research*. 2019; 39(7), 429-3432.
46. Mikkelsen, K., Prakash, M. D., Kuol, N., Nurgali, K., Stojanovska, L., Apostolopoulos, V. Anti-tumor effects of vitamin B2, B6 and B9 in Promonocytic lymphoma cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019; 20(15), 3763.
47. Wei Y, Lu M, Mei M, Wang H, Han Z, Chen M et al. Pyridoxine induces glutathione synthesis via PKM2-mediated Nrf2 transactivation and confers neuroprotection. *Nature Communications*. 2020; 11(1), 914.
48. He, F., Ru, X., & Wen, T. NRF2, a transcription factor for stress response and beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020. 21(13), 4777.
49. Hoss, G. R., Poloni, S., Blom, H. J., Schwartz, I. V. Three main causes of Homocystinuria: CBS, cblC and MTHFR deficiency. What do they have in common? *Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening*, 2019; 7, 2326-4594.
50. Tripathi, M., Zhang, C. W., Singh, B. K., Sinha, R. A., Moe, K. T., DeSilva, D. A., Yen, P. M. Hyperhomocysteinemia causes ER stress and impaired autophagy that is reversed by vitamin B supplementation. *Cell Death and Disease*, 2016; 7(12), e2513.
51. Park, C.S., Cho, K., Bae, D.R. et al. Methyl-donor nutrients inhibit breast cancer cell growth. *In Vitro Cell.Dev.Biol.Animal*. 2008; 44, 268.

52. Djurovic, Z., Mutavdzin, S., Drobnjakovic, M., Djurovic, M., Cvrkota, I., Jovanovic, V. Relationship between malignant brain tumors and values of Homocysteine, folic acid, and vitamin B12. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*, 2018; online ahead of print.
53. Ehrlich, M. DNA methylation in cancer: Too much, but also too little. *Oncogene*, 2002; 21(35), 5400-5413.
54. Hernández-SanMiguel, E., Gargini, R., Cejalvo, T., Segura-Collar, B., Núñez-Hervada, P., Hortigüela, R., Sánchez-Gómez, P. Ocoxin modulates cancer stem cells and M2 macrophage polarization in glioblastoma. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019; 2019, 1-12.
55. Jang, Y., Kim, J., Ko, J. W., Kwon, Y. H. Homocysteine induces PUMA-mediated mitochondrial apoptosis in SH-SY5Y cells. *Amino Acids*, 2016; 48(11), 2559-2569.
56. Liu, Y., Lang, F., Chou, F., Zaghoul, K. A., Yang, C. Isocitrate Dehydrogenase mutations in glioma: Genetics, biochemistry, and clinical indications. *Biomedicines*, 2020; 8(9), 294.
57. Lopez-Gonzalez, M. A., Sotelo, J. Brain tumors in Mexico: Characteristics and prognosis of glioblastoma. *Surgical Neurology*, 2000; 53(2), 157-162.
58. Ohgaki, H., Kleihues, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American Journal of Pathology*, 2007; 170(5), 1445-1453.
59. Pawlowska, E., Szczepanska, J., Szatkowska, M., Blasiak, J. An interplay between senescence, Apoptosis and autophagy in glioblastoma Multiforme—Role in pathogenesis and therapeutic perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018; 19(3), 889.
60. Rudd, M., Lea, R., Goodwin, W. P54 * the use of folate to reduce cell viability in glioma cells. *Neuro-Oncology*, 2014; 16(s6).
61. Schulze, M., Hutterer, M., Sabo, A., Hoja, S., Lorenz, J., Rothhammer-Hampl, T., Riemenschneider, M. J. Chronophin regulates active vitamin B6 levels and transcriptomic features of glioblastoma cell lines cultured under non-adherent, serum-free conditions. *BMC Cancer*. 2018, 18(1), 524.
62. Soares, J. M., Faria, B. M., Ascari, L. M., Alves-Leon, S. V., Souza, J. M. Diosmin induces caspase-dependent apoptosis in human glioblastoma cells. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2019; 91(4).
63. Sun, X., Johnson, J., St. John, J. C. Global DNA methylation synergistically regulates the nuclear and mitochondrial genomes in glioblastoma cells. *Nucleic Acids Research*, 2018; 46(12), 5977-5995.

64. Wan, L., Sun, Y., Zhang, F., Ren, Y. Low-dose Homocystine enhances proliferation and migration of Bv2 Microglia cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2016; 36(8), 1279-1289.
65. Weller, M., Rieger, J., Grimm, C., Van Meir, E. G., De Tribolet, N., Krajewski, S., Reed, J. C., von Deimling, A., & Dichgans, J. Predicting chemoresistance in human malignant glioma cells: the role of molecular genetic analyses. *International journal of cancer*, 1998; 79(6), 640–644.
66. Albersen, M., Bosma, M., Jans, J.J., Hofstede, F.C., van Hasselt, P.M., de Sain-van der Velden, M.G., Visser, G., Verhoeven-Duif, N.M., Vitamin B6 in plasma and cerebrospinal fluid of children. *PLoS One*. 2015; 10 (3), e0120972.
67. Misha F. Vrolijk, Antoon Opperhuizen, Eugène H.J.M. Jansen, Geja J. Hageman, Aalt Bast, Guido R.M.M. Haenen. The vitamin B6 paradox: Supplementation with high concentrations of pyridoxine leads to decreased vitamin B6 function, *Toxicology in Vitro*, 2017: 44,206-212.
68. Contestabile Roberto, di Salvo Martino Luigi, Bunik Victoria, Tramonti Angela and Vernì Fiammetta. The multifaceted role of vitamin B6 in cancer: Drosophila as a model system to investigate DNA damage. *Open Biol*. 2020; 10: 200034.
69. Franklin JL. Redox regulation of the intrinsic pathway in neuronal apoptosis. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(8), 1437-48.
70. Wei Yang, Shuai Liu, Yunlei Li, Yujie Wang, Yao Deng, Weimin Sun, Hualan Huang, Junmou Xie, Andong He, Honglv Chen, Ailin Tao, Jie Yan. Pyridoxine induces monocyte-macrophages death as specific treatment of acute myeloid leukemia, *Cancer Letters*, 2020 492; 96-105.
71. Andres, E., Serraj, K., Zhu, J., & Vermorken, A. J. M. The pathophysiology of elevated vitamin B12 in clinical practice. *QJM*, 2013; 106(6), 505–515.
72. Zulfiqar, Abrar-Ahmad et al. “Hipervitaminosis B12. Nuestra experiencia y una revisión” Hypervitaminosis B12. Our experience and a review. *Medicina*. 2019; 79(5),391-396.
73. Seetharam, B. Receptor-mediated endocytosis of cobalamin (vitamin B12). *Annual review of nutrition*, 1999; 19, 173-95.

11. Anexos

Anexo 1:

Implicaciones bioéticas

El presente protocolo empleó únicamente la línea celular U87-MG, que es una línea celular ya establecida y ampliamente descrita por lo que no es considerada como material relevante bajo el Human cell lines and the Human Tissue Act 2004 (Acta de 2004 “Líneas celulares humanas y Tejido Humano”), por lo que no es necesaria la aprobación del comité de ética, de igual manera durante el establecimiento, almacenamiento, identificación, transporte, y congelación del cultivo se tuvieron las consideraciones pertinentes a lo largo del protocolo.

Anexo 2: Authenticate

Tesis Carilina Abigail Martínez Mendiola

INFORME DE ORIGINALIDAD

8%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Internet	172 palabras — 2%
2	ri.uaemex.mx Internet	115 palabras — 1%
3	idoc.pub Internet	31 palabras — < 1%
4	zagan.unizar.es Internet	31 palabras — < 1%
5	sedici.unlp.edu.ar Internet	29 palabras — < 1%
6	www.nutricion-sport.com Internet	24 palabras — < 1%
7	pesquisa.bvsalud.org Internet	23 palabras — < 1%
8	core.ac.uk Internet	22 palabras — < 1%
9	tesis.ipn.mx Internet	22 palabras — < 1%
10	www.jove.com Internet	

Anexo 3: Buffer de lisis

- 10 mL de Tris 0.5M pH 6.8

- 50 μL de EDTA 0.2M pH 8.0
- 200 μL de EGTA 50mM pH 7.9
- 102 μL de β -mercaptoetanol
- 1 mL de IGEPAL

Completar a 100 mL de agua destilada, guardar la solución en un frasco ámbar o envuelto en papel aluminio a 4°C. La solución es estable por un mes aproximadamente si se mantiene en condiciones adecuadas.

Anexo 4: Buffer fosfato salino (PBS)

Sal	Concentración (mmol/L)	Concentración (g/L)
NaCl	137	8.0
KCl	2.7	0.2
Na_2HPO_4	10	1.44
KH_2PO_4	1.8	0.24

Anexo 5: Gel de poliacrilamida

Constituyentes	4%	10%
Acrilamida al 30% (mL)	1.3	10.0
Bis-acrilamida al 1% (mL)	1.5	3.9
1.5 M Tris, pH 8.7 (mL)	-	8.1
0.5M Tris, pH 6.7 (mL)	1.25	-
20% SDS (μL)	65	200
H ₂ O (mL)	5.725	7.9
TEMED (μL)	10	10
Persulfato de Amonio al 10% (μL)	150	225

Anexo 6: Buffer de corrida

Constituyentes:

- Tris-base 1.51g
- Glicina 7.5g
- SDS 0.5g
- Aforar a 1,000 mL con agua destilada.

Anexo 7: Buffer de transferencia

- Tris-base 03.03 g
- Glicina 14.4 g
- Metanol 200 mL
- SDS 0.5 g
- Aforar a 1000 mL con agua destilada.
- pH: 8.3