



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA INHIBICIÓN DE LA
VIABILIDAD CELULAR POR LA EXPOSICIÓN A FÁRMACOS
QUE INHIBEN EL METABOLISMO”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

MARÍA GUADALUPE SERRATO DUARTE



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: Helgi Helen Jung Cook

VOCAL: Profesor: José Eleazar Martínez Barajas

SECRETARIO: Profesor: Felipe Vaca Paniagua

1er. SUPLENTE: Profesor: José Pedraza Chaverri

2° SUPLENTE: Profesor: Andrés Navarrete Castro

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Genómica, Subdirección de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología. Av. San Fernando No. 22, Col. Sección XVI, C. P. 14080 Tel. 56 28 04 00 Ext. 134.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Felipe Vaca Paniagua

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. Carlos Pérez Plasencia

SUSTENTANTE:

María Guadalupe Serrato Duarte

AGRADECIMIENTOS

A Araceli por brindarme el primer impulso para llegar a este punto en mi camino y por su ayuda durante toda la carrera.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química que me han abierto las puertas a nuevos mundos y me han permitido conocer nuevos panoramas.

Al Dr. Felipe Vaca por la oportunidad de trabajar en este proyecto. Le agradezco enormemente su apoyo y dedicación.

Al Dr. Carlos P. Plasencia por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

A la Dra. Verónica Fragoso infinitas gracias por su ayuda y sugerencias, por compartirme su experiencia.

Especialmente a la Dra. Irasema Chirino por sus comentarios, apoyo y confianza. Mi más profundo agradecimiento.

Al laboratorio 1 de la UBIMED de la FES Iztacala, a la Dra. Norma L. por su ayuda en mi primer aprendizaje sobre cultivo celular.

Al departamento de banco de sangre del Instituto Nacional de Cancerología, al Dr. Sánchez Guerrero, por facilitarme las muestras de sangre para llevar a cabo los experimentos con linfocitos.

A Mario, Carlos y nuevamente al Dr. Felipe y Dr. Carlos, por proporcionarme las muestras de sangre para mis primeros experimentos con linfocitos. **A Emma** por tomar las muestras y **a Omar** por su ayuda. Gracias por su tiempo y disposición.

A Sara por su apoyo incondicional en el transcurso de la carrera; **a Jacqueline, Rebeca, Cyntia, Claudia** y a todas aquellas personas que me han brindado su apoyo, tiempo y espacio.

A mi madre[†],

A mis hermanos

y

***A “quienes van por la vida levantando
rocas sólo para ver que hay debajo...”***

INDICE

| | Página |
|--|---------------|
| LISTA DE FIGURAS..... | 7 |
| LISTA DE TABLAS..... | 10 |
| ABREVIATURAS..... | 11 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 13 |
| 1.1 Cáncer..... | 14 |
| 1.2 Cáncer de pulmón..... | 15 |
| 1.2.1 Susceptibilidad al cáncer de pulmón..... | 17 |
| 1.3 Cáncer cérvico-uterino..... | 18 |
| 1.3.1 Virus del papiloma humano..... | 22 |
| 2. MARCO TEÓRICO..... | 24 |
| 2.1 Metabolismo celular..... | 25 |
| 2.2 Enzima LDH-A..... | 27 |
| 2.3 Vía de señalización mTOR..... | 28 |
| 2.4 Tratamiento..... | 31 |
| 2.4.1 Cisplatino..... | 32 |
| 2.4.1.1 Mecanismo de acción..... | 33 |
| 2.4.1.2 Farmacocinética..... | 34 |
| 2.4.1.3 Resistencia a cisplatino..... | 34 |
| 2.5 Metformina..... | 35 |

| | |
|---|----|
| 2.5.1 Mecanismo de acción..... | 36 |
| 2.5.2 Farmacocinética..... | 36 |
| 2.6 Ácido oxámico..... | 38 |
| 2.6.1 Mecanismo de acción..... | 38 |
| 3. OBJETIVOS..... | 40 |
| 4. HIPOTESIS..... | 41 |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 42 |
| 5.1 Líneas celulares..... | 42 |
| 5.2 Linfocitos..... | 43 |
| 5.3 Ensayo de viabilidad celular..... | 44 |
| 5.4 Análisis estadístico..... | 44 |
| 6. RESULTADOS..... | 45 |
| 6.1 Efecto de la Met y el AO en la viabilidad de células de cáncer cérvico-uterino..... | 46 |
| 6.2 Efecto de la Met y el AO en la viabilidad de células de cáncer pulmonar..... | 51 |
| 6.3 Efecto de la Met y el AO en la viabilidad de linfocitos..... | 56 |
| 7. DISCUSIÓN..... | 61 |
| 8. CONCLUSIONES..... | 67 |
| 9. PERSPECTIVA..... | 68 |
| 10. REFERENCIAS..... | 69 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|---------------|
| Fig. 1. Incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más comunes a nivel global, de acuerdo a las regiones más desarrolladas y menos desarrolladas..... | 14 |
| Fig. 2. Evolución del cáncer de pulmón..... | 16 |
| Fig. 3. Rutas de señalización celular de relevancia en el cáncer de pulmón..... | 18 |
| Fig. 4. Progresión del cáncer cérvico-uterino mediada por el virus del papiloma humano (VPH)..... | 20 |
| Fig. 5. Cálculo de la incidencia del virus del papiloma humano (VPH) a nivel mundial..... | 21 |
| Fig. 6. Estructura del genoma del VPH..... | 23 |
| Fig. 7. Coilocitos..... | 23 |
| Fig. 8. Rutas del metabolismo de la glucosa..... | 26 |
| Fig. 9. La glucólisis y reprogramación metabólica en las células cancerosas..... | 27 |
| Fig. 10. Vía de señalización mTOR..... | 30 |
| Fig. 11. Estructura química del cisplatino..... | 32 |
| Fig. 12. Estructura química de la metformina..... | 35 |
| Fig. 13. Estructura química del ácido oxámico..... | 38 |
| Fig. 14. Absorbancia de diferentes densidades celulares de las líneas HeLa, Calu-1 y Caski a las 24 h de siembra..... | 45 |
| Fig. 15. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de células Caski por 24 h..... | 47 |

| | |
|---|----|
| Fig. 16. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de células Caski por 48 h..... | 47 |
| Fig. 17. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de células C-33A por 24 h..... | 48 |
| Fig. 18. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de células C-33A por 48 h..... | 49 |
| Fig. 19. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de células HeLa por 24 h..... | 50 |
| Fig. 20. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de células HeLa por 48 h..... | 50 |
| Fig. 21. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de células A549 por 24 h..... | 51 |
| Fig. 22. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de células A549 por 48 h..... | 52 |
| Fig. 23. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de células A549 por 72 h..... | 52 |
| Fig. 24. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de células Calu-1 por 24 h..... | 53 |
| Fig. 25. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de células Calu-1 por 48 h..... | 54 |
| Fig. 26. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de células Calu-1 por 72 h..... | 54 |
| Fig. 27. Efecto del CDDP-AO-Met sobre la viabilidad de las líneas celulares Caski, C-33A, HeLa, Calu-1 y A549 a las 24 h..... | 55 |
| Fig. 28. Efecto del CDDP-AO-Met sobre la viabilidad de las líneas celulares Caski, C-33A, HeLa, Calu-1 y A549 a las 48 h..... | 55 |
| Fig. 29. Efecto del CDDP-AO-Met sobre la viabilidad de las líneas celulares Calu-1 y A549 a las 72 h..... | 56 |
| Fig. 30. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de linfocitos por 24 h..... | 57 |
| Fig. 31. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de linfocitos por 48 h..... | 57 |

Fig. 32. Efecto del AO a diferentes concentraciones sobre la viabilidad de linfocitos por 24 h.....58

Fig. 33. Efecto del AO a diferentes concentraciones sobre la viabilidad de linfocitos por 48 h.....59

Fig. 34. Efecto de la Met a diferentes concentraciones sobre la viabilidad de linfocitos por 24 h.....60

Fig. 35. Efecto de la Met a diferentes concentraciones sobre la viabilidad de linfocitos por 48 h.....60

INDICE DE TABLAS

| | Página |
|---|---------------|
| Tabla 1. Probabilidad de regresión, persistencia y progresión de NIC..... | 21 |
| Tabla 2. Clasificación epidemiológica de los tipos de VPH..... | 23 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|---|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AMP | Adenosina monofosfato |
| AMPK | Proteína cinasa activada por AMP |
| AO | Ácido oxámico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ASCUS | Células escamosas atípicas de significado indeterminado |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| °C | Grado Celsius |
| CaCu | Cáncer cérvico-uterino |
| CDDP | Cisplatino, cis-Diamminadichloro-platino (II) |
| EGFR | Receptor del factor de crecimiento epidérmico |
| FADH ₂ | Flavin adenina dinucleotido reducido |
| FDA | Agencia de Alimentos y Medicamentos |
| FDG-PET | Tomografía por emisión de positrones con Fluoro-2-deoxi-glucosa |
| g | Gramo |
| GDP | Guanosina difosfato |
| GTPasa | Guanosina trifosfatasa |
| GLUT (1-4) | Transportador de facilitación de glucosa- (1-4) |
| h | Hora |
| II-HADH- α | α -hidroxiácido deshidrogenasa isoenzima II |
| IARC | Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer |
| LDH | Lactato deshidrogenasa |
| LDH-A | Lactato deshidrogenasa A |
| LSIL | Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado |
| m ² | Metro cuadrado |
| MATE1 | Transportador de extrusión de toxinas y múltiples fármacos-1 |
| MATE2-K | Transportador de extrusión de toxinas y múltiples fármacos-2-K |
| Met | Metformina |
| mg | Miligramo |
| mL | Mililitro |

| | |
|--------|---|
| mM | Milimolar |
| MTT | Bromuro de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio |
| mTOR | Objetivo de rapamicina en mamíferos |
| mTORC1 | Complejo 1 del objetivo de rapamicina en mamíferos |
| mTORC2 | Complejo 2 del objetivo de rapamicina en mamíferos |
| NAD+ | Dinucleótido de nicotinamida-adenina oxidado |
| NADH | Dinucleótido de nicotinamida-adenina reducido |
| NIC | Neoplasia cervical intraepitelial |
| nm | Nanómetro |
| NSCLC | Cáncer de pulmón de células no pequeñas |
| OCT1 | Trasportador de cationes organicos-1 |
| OCT2 | Trasportador de cationes organicos-2 |
| OXPPOS | Fosforilación oxidativa |
| p | Peso |
| PBS | Solución buffer de fosfatos |
| pH | Potencial de hidrogeno |
| PI3K | Fosfatidil inositol-3-cinasa |
| pRb | Proteína de retinoblastoma |
| PTEN | Homologo de fosfatasa y tensina |
| Rb | Retinoblastoma |
| Rheb | Homologo Ras enriquecido en cerebro |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SCLC | Cancer de pulmón de células pequeñas |
| SFB | Suero fetal bovino |
| SGLT | Trasportador sodio-glucosa |
| SSI | Solución salina |
| TSC1 | Complejo-1 de esclerosis tuberosa |
| TSC2 | Complejo-2 de esclerosis tuberosa |
| uM | Micromolar |
| v | Volumen |
| VPH | Virus del papiloma humano |

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer representa uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. De acuerdo a la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC), los principales tipos de cáncer se presentan en pulmón, mama, colon-recto, estomago, próstata, hígado y cuello uterino. Sin embargo, el grado de incidencia y mortalidad de cada uno de ellos varía de acuerdo a la región socio-económica (Fig. 1). La mayoría de los nuevos casos y muertes por cáncer se producen en los países en desarrollo. En el 2008, el 53% de los 12.7 millones de nuevos casos y el 63% de los 7.6 millones de defunciones por cáncer a nivel mundial se produjeron en los países de bajos y medianos ingresos (GLOBOCAN, 2008). Se prevé un aumento de 20 millones de nuevos casos por año en el 2020, más de la mitad de los cuales ocurrirán en regiones en desarrollo (Mellstedt, 2006). Una de las causas de esta diferencia es atribuida a la elevada prevalencia de infecciones crónicas en los países en desarrollo (Stewart et al., 2003), específicamente por el virus del papiloma humano, agente causal del cáncer cérvico-uterino; *Helicobacter pylori*, bacteria implicada en el cáncer de estomago y linfoma gástrico (Rastogi et al., 2004), y los virus de la hepatitis B y C, principales agentes etiológicos del cáncer de hígado. Asimismo, la alta prevalencia e incidencia del cáncer en países en desarrollo han sido atribuidas a la baja accesibilidad de la población al diagnóstico temprano y la terapia. Por ejemplo, una de las innovaciones más prometedoras para la prevención del cáncer cervical, la vacuna contra el VPH, aún sigue siendo muy costosa para generalizar su uso en estos países (Outtersson y Kesselheim, 2008).

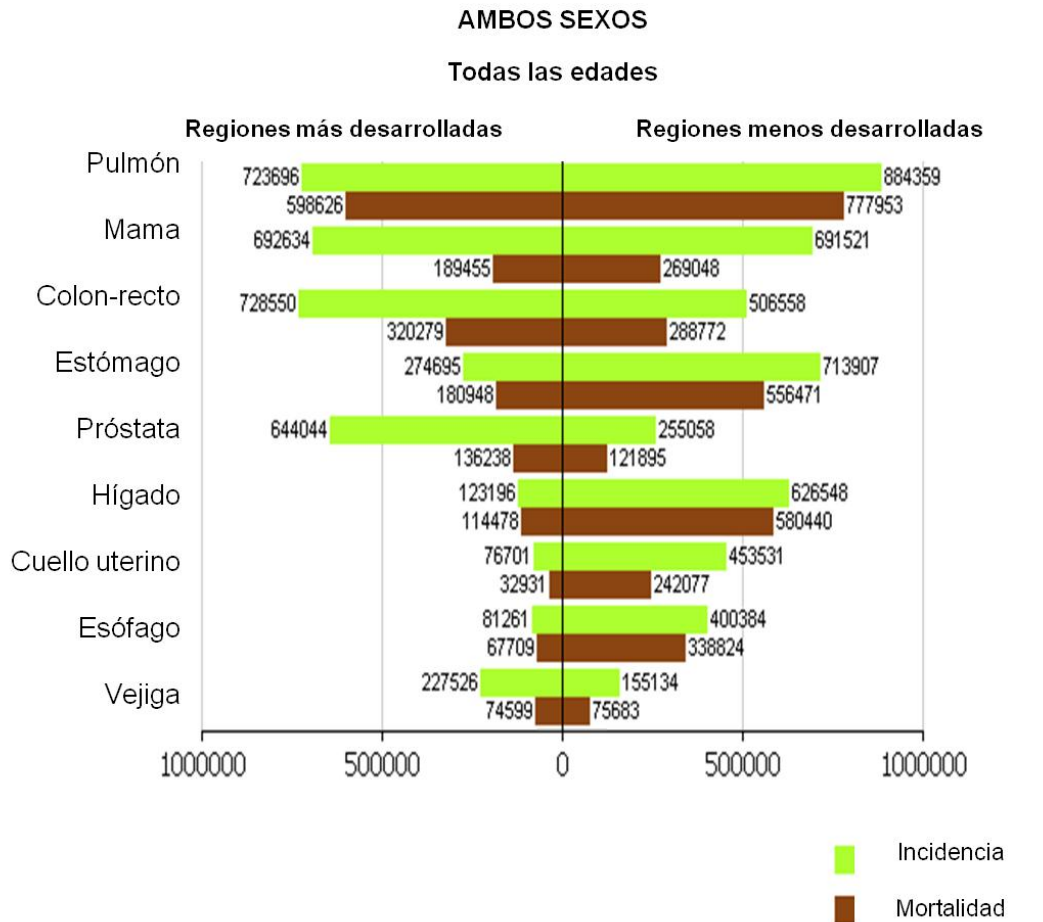


Fig. 1. Incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más comunes a nivel global, de acuerdo a las regiones más desarrolladas y menos desarrolladas. GLOBOCAN 2008 (IARC).

1.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad genética causada por alteraciones en los oncogenes y genes supresores de tumores, caracterizada por la presencia de células anormales que proliferan de forma descontrolada y con capacidad de invadir otros tejidos (Croce, 2008; Clegg *et al.*, 2001). Actualmente se han descrito más de 200 tipos de cáncer, los cuales se clasifican de acuerdo al tipo de órgano o tejido en donde se originan (Peedell, 2005). De esta manera, se denomina carcinoma al tumor que se origina en células epiteliales y se sub-clasifica en adenocarcinoma (glándulas), carcinoma escamoso o epidermoide (células epiteliales no glandulares), carcinoma basocelular (células epiteliales basales de la epidermis) y melanomas (melanocitos) (Stevens, 2001).

1.2 Cáncer de pulmón

Entre las neoplasias malignas, el carcinoma de pulmón es la primera causa de mortalidad por cáncer a nivel mundial, con más de 1376000 defunciones cada año y 1608000 nuevos casos anuales (Fig. 1). De la misma manera, en México es la causa de más de 8800 defunciones y 9140 nuevos casos cada año (GLOBOCAN, 2008). Su incidencia se relaciona principalmente al consumo de tabaco de manera activa o pasiva en un 80-90%, a la exposición a mutágenos, al consumo excesivo de alcohol y a antecedentes familiares (Hammond *et al.*, 1980; Carbone, 1992; Rudin *et al.*, 2009; Bagnardi *et al.*, 2010). Los principales tipos de esta neoplasia son el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), presente en aproximadamente el 85% de todas las neoplasias de pulmón, y el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), presente en un 15% (Herbst *et al.*, 2008). Aun con tratamiento, la tasa de supervivencia a 5 años para esta neoplasia es del 15% de los casos (Tanner y Silvestri, 2010). Este pobre pronóstico se debe sobre todo a que al momento del diagnóstico la neoplasia se encuentra frecuentemente en etapa avanzada y las opciones de tratamiento son limitadas (Pirozynski, 2006).

La carcinogénesis pulmonar es un proceso que consiste en varios pasos, durante los cuales las células epiteliales sufren cambios morfológicos antes de convertirse en invasivas (Fig. 2) (Herbst *et al.*, 2008). Estos cambios incluyen la displasia y carcinoma *in situ*, consideradas las principales lesiones premalignas, al presentar una mayor probabilidad de avanzar a cáncer invasivo (Johnson, 1998; Maitra *et al.*, 1999).

El cáncer de pulmón de NSCLC se clasifica de acuerdo con el tamaño del tumor, el grado de participación de los nodos linfáticos y el grado de metástasis distante (clasificación TNM). De esta manera, se han descrito como estadio 0 a la etapa en la que el cáncer no se ha diseminado más allá del revestimiento interior del pulmón; el estadio I, el cáncer es pequeño y se ha diseminado a las capas del tejido pulmonar; el estadio II, el cáncer se ha diseminado a algunos ganglios linfáticos cerca del tumor original o se ha propagado a la pared torácica; el estadio III, el cáncer se ha diseminado a tejidos cercanos o se ha propagado a ganglios linfáticos distantes; y estadio IV, el

cáncer se ha diseminado a otros órganos distantes (Abeloff *et al.*, 2008). En pacientes con NSCLC la tasa de supervivencia a 5 años es de 49, 16 y 2% para los pacientes con enfermedad en estadio local (estadio I), regional (estadio II y III) y metastásico (estadio IV), respectivamente (Ries *et al.*, 2005; Jemal *et al.*, 2008). Estos pacientes, en un 50%, desarrollan metástasis a otros órganos como el cerebro, hígado y mamas, lo cual disminuye su esperanza de vida a menos de un año, y en algunos casos con una supervivencia media de menos de tres meses (Cho *et al.*, 2005).

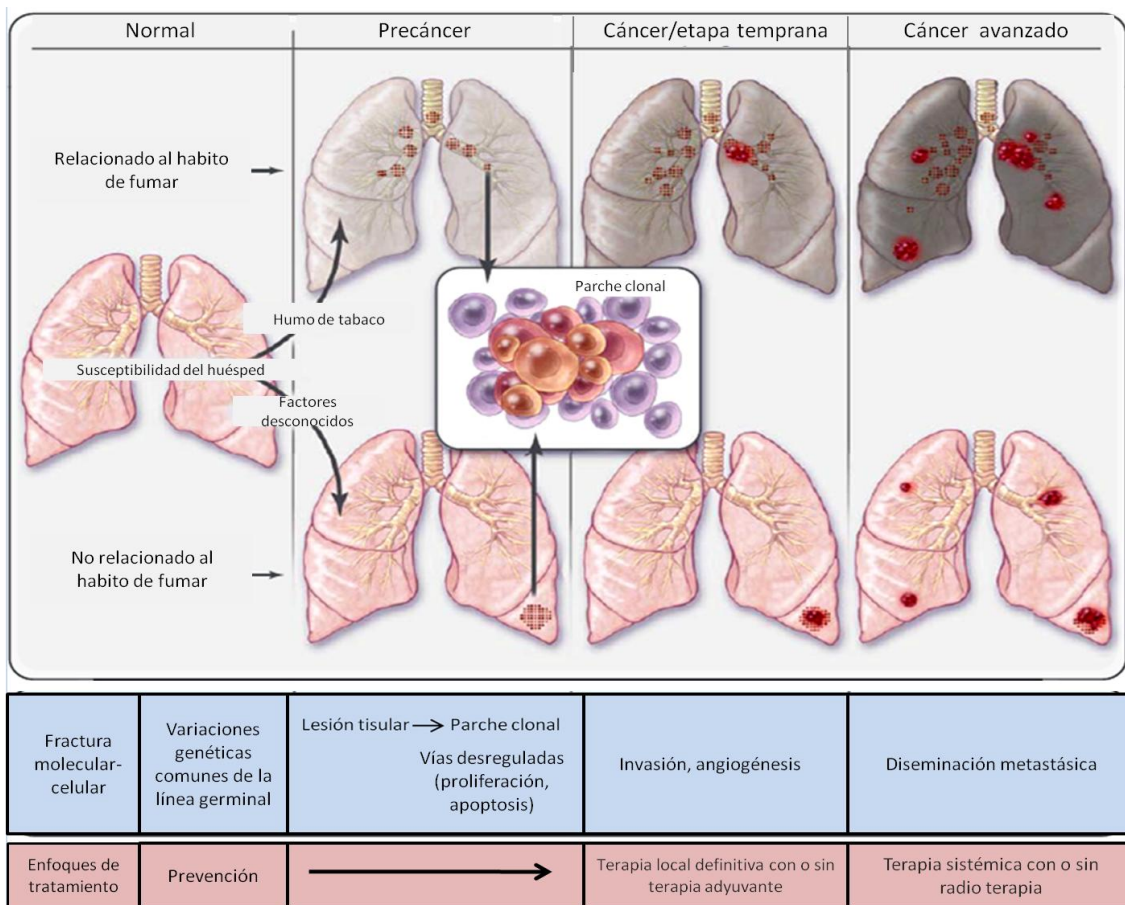


Fig. 2. Evolución del cáncer de pulmón. Factores ambientales, como el humo del tabaco, y la susceptibilidad genética interactúan para influir en la carcinogénesis. Los factores que no están relacionadas con el tabaquismo, se producen inicialmente en forma de cambios genéticos. Estos cambios pueden persistir a largo plazo y dar lugar a la activación de vías aberrantes y la función celular (ej. proliferación y apoptosis desreguladas) para producir cambios premalignos, incluyendo displasia y parches clonales, angiogénesis, invasión, el cáncer en estadio temprano, y el cáncer avanzado y metástasis. Las neoplasias malignas de pulmón relacionadas y no relacionadas con el tabaquismo presentan perfiles moleculares diferentes, incluidos las mutaciones en el gen p53, gen KRas y EGFR. Parches relacionados con el tabaco y el cáncer primario (carcinoma de células escamosas y SCLC) frecuentemente se desarrollan en la vía aérea central. La mayoría de los tumores no relacionados con el tabaquismo (adenocarcinomas) se desarrollan en las vías respiratorias periféricas. Las opciones de tratamiento son limitadas. Modificado de Herbst *et al.*, 2008.

El SCLC es el tipo de cáncer de pulmón más agresivo y generalmente comienza en los conductos aéreos (bronquios) en el centro del tórax. Las células de este tipo de cáncer pulmonar crecen rápidamente y forman tumores grandes, los cuales frecuentemente se diseminan con rapidez a otras partes del cuerpo como cerebro, hueso e hígado (Abeloff *et al.*, 2008). Debido a su rápido crecimiento y diseminación sólo se han descrito dos etapas de desarrollo: I) la etapa limitada, las células cancerosas se encuentran sólo en un pulmón, en ganglios linfáticos cercanos y en el líquido pleural; y II) la etapa extensa, el cáncer se ha diseminado fuera del pulmón, a la zona del pecho o a otras partes del cuerpo. Hasta el momento todas las pruebas de detección y tratamiento de esta neoplasia no han demostrado disminuir la mortalidad (Tanner y Silvestri, 2010).

1.2.1 Susceptibilidad al cáncer de pulmón

La susceptibilidad al cáncer de pulmón y el mal pronóstico, se incrementan en los síndromes de cáncer hereditario. Estos son causados por mutaciones inducidas por alteraciones cromosómicas y pérdida de la función de genes supresores de tumores como la serina treonincinasa 11 (LKB1 o STK11) (Tiainen *et al.*, 1999), el retinoblastoma (Rb) (Weinberg, 1995; Roberts, 1989), y el homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) (Bailey *et al.*, 2004; Akca *et al.*, 2011). De la misma manera, mutaciones adquiridas que causan inactivación de genes, como el supresor tumoral p53 (Miller *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1995; Hwang *et al.*, 2003), o sobreexpresión de genes como el oncogen K-Ras (Repasky *et al.*, 2004; Roberts y Der, 2007; Rudin *et al.*, 2009), el oncogen c-Myc (Herbst *et al.*, 2008; Varella-Garcia, 2010) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Moscatello, 1995; Mendelsohn y Baselga, 2003; Bell *et al.*, 2005), favorecen la carcinogénesis pulmonar. Adicionalmente, una disminución de la capacidad de reparación del ADN promueve la progresión del cáncer de pulmón, en particular cuando existe exposición al humo de tabaco (Fig. 3) (Spitz *et al.*, 2003).

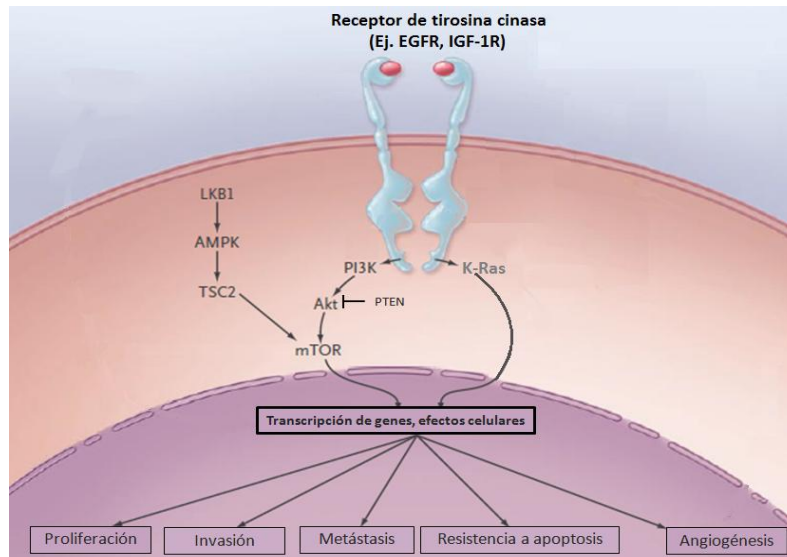


Fig. 3. Rutas de señalización celular de relevancia en el cáncer de pulmón. Los receptores de tirosinas cinasas, como el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el receptor-1 del factor de crecimiento de la insulina (IGF-1R), activan varias vías de señalización, incluyendo las vías K-Ras y PI3K-Akt-mTOR, que a su vez puede tener un efecto sobre la proliferación, la supervivencia, invasión, metástasis y la angiogénesis del tumor. Estas vías también pueden ser moduladas por la vía LKB1-AMPK que está implicado en la sensibilidad de energía celular y el estrés. La mayoría de estas funciones dependen de la señalización a través del dominio cinasa del receptor. PTEN: Homólogo de fosfatasa y tensina; TSC2: complejo de esclerosis tuberosa 2. Modificado de Herbst *et al.*, 2008.

1.3 Cáncer cérvico-uterino

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es la segunda neoplasia más común entre mujeres en países en desarrollo y el séptimo más común entre mujeres en los países desarrollados. Cada año se diagnostican 530000 nuevos casos y 275000 mujeres mueren por este tipo de cáncer a nivel mundial, de los cuales más del 80% provienen de Asia, África, Latino América y el Caribe (Fig. 1) (GLOBOCAN, 2008). En México esta neoplasia es la segunda más frecuente en mujeres, con una incidencia mayor de 10180 casos y más de 5000 muertes cada año (GLOBOCAN, 2008). El cáncer de cuello uterino cuando es detectado en fase temprana es uno de los tipos de cáncer más tratados con éxito en un periodo de 5 años, con una tasa de supervivencia relativa del 80-93%, sin embargo, si no es tratado oportunamente la tasa de supervivencia a 5 años es del 60% en estado regional y del 16% en etapa metastásica (SEER, 2010; Centro Nacional de Datos sobre el Cáncer, 2010).

El agente etiológico de este carcinoma es el virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo, el cual se encuentra en el 99.7% de los casos, y se transmite vía sexual (Walboomers *et al.*, 1999; Zur Hausen, 2002). El VPH infecta a los queratinocitos de la capa basal del epitelio del cérvix, la cual ha sido expuesta por microlesiones. En un periodo de 3-5 años de infección aparecen en el cuello de la matriz neoplasias escamosas intraepiteliales, también llamadas lesiones premalignas o displasias, las cuales de no ser tratadas oportunamente pueden progresar de displasias leves a displasias moderadas, a displasias severas o carcinoma *in situ*, hasta avanzar a carcinoma invasivo y carcinoma metastásico (Cheng *et al.*, 1995; Woodman *et al.*, 2007). El cáncer cervical en su etapa invasiva se extiende a la pared pélvica, la vejiga, el recto y ganglios linfáticos; en etapa metastásica se propaga a órganos como pulmón, hígado, cavidad abdominal y el tracto gastrointestinal (Fagundes *et al.*, 1992).

Existen dos sistemas formales para la clasificación citológica de las condiciones precursoras de cáncer cervical. El primero, de acuerdo con el sistema de neoplasia cervical intraepitelial (NIC), clasifica a: la neoplasia cervical leve como NIC I, la displasia moderada como NIC II; y a la displasia severa, incluyendo carcinoma *in situ*, como NIC III (Richart *et al.*, 1973; Kiviat *et al.*, 1996). El otro sistema es la clasificación Bethesda, que incluye: las células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS), las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LSIL), que incluyen al NIC I, y las lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (HSIL), que incluyen al NIC II y III (Fig. 4) (National Cancer Institute, 2005).

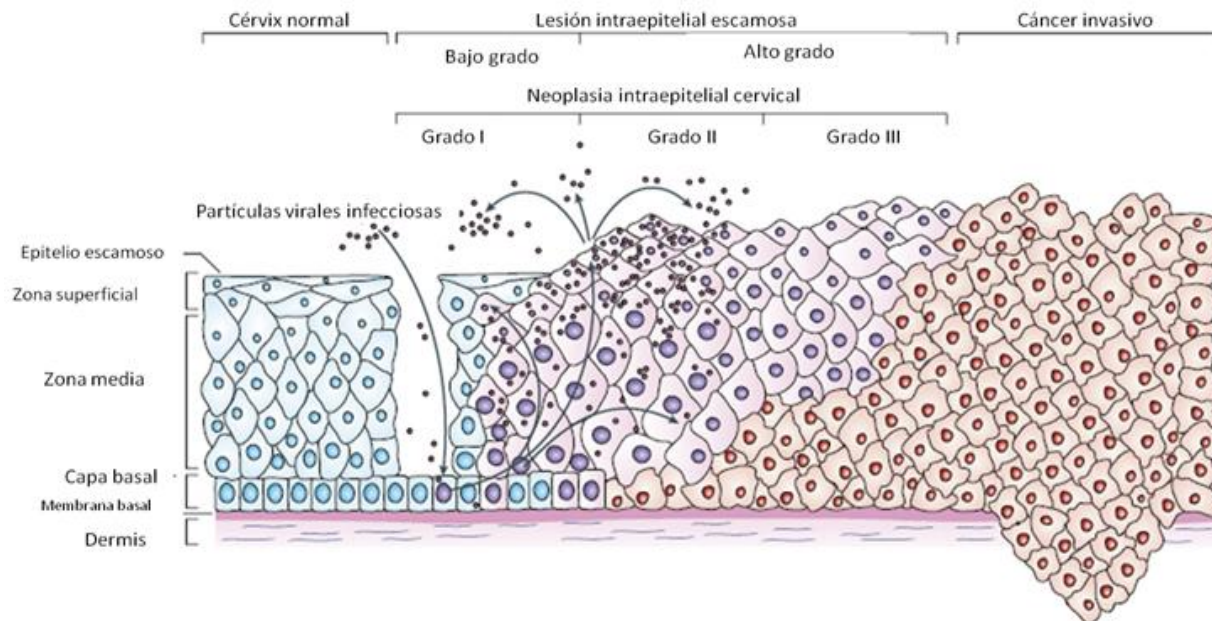


Fig. 4. Progresión del cáncer cervicouterino mediada por el virus del papiloma humano (VPH). El VPH infecta a las células basales a través de microabrasiones en el epitelio del cuello uterino. Dependiendo de diversos factores la infección puede permanecer como lesión intraepitelial de bajo grado o avanzar a lesión intraepitelial de alto grado o cáncer invasivo. Durante la neoplasia intraepitelial grado I y II, los genes del VPH se expresan, y se replica el ADN viral (núcleos de color morado). En las capas superiores del epitelio (la zona media y la zona superficial) el genoma viral se replica más. La replicación del DNA viral produce grandes cantidades de material genético del virus y lleva a la producción de viriones. Estas células sí muestran la apariencia coilocítica característica de la infección por VPH de alto grado. La progresión de las lesiones de alto riesgo a cáncer microinvasor e invasivo se asocia con la integración del genoma del VPH en los cromosomas del huésped (núcleos rojos). Modificado de Ciaran *et al.*, 2007.

Se estima que aproximadamente 630 millones de personas están infectadas con el VPH a nivel mundial (Centers for Disease Control and Prevention, 2009). Asimismo, se calcula que en un 50-80% de las mujeres sexualmente activas, en todo el mundo, se infectan con el VPH por lo menos una vez en su vida (Crum *et al.*, 2003). La mayoría de las infecciones por el VPH son transitorias e indetectables después de 6-18 meses (Moscicki *et al.*, 2006). Sin embargo, si la infección persiste puede desarrollarse un precáncer y estas células precancerosas pueden volverse cancerosas con el paso del tiempo. Se ha calculado que el tiempo promedio requerido para que una lesión epitelial evolucione de un grado al siguiente es aproximadamente de 5 años; y de 1-30 años (con un promedio de 10-13 años) es el tiempo que le toma a una lesión de alto grado progresar a cáncer invasor (Gustafsson *et al.*, 1989; Myers *et al.*, 2000).

Varios estudios han abordado la evolución natural de CaCu, orientados principalmente en la regresión, la persistencia y la progresión de la enfermedad, estas investigaciones han mostrado que la mayoría de las lesiones de bajo grado son transitorias. En cambio, las NIC de alto grado tienen mayor probabilidad de convertirse en cáncer invasor, aunque también algunas de estas lesiones persisten o retroceden (Tabla 1) (Ostor *et al.*, 1993; Mitchell *et al.*, 1994; Melinkow *et al.*, 1998; Holowaty *et al.*, 1999).

| Tabla 1. Probabilidad de regresión, persistencia y progresión de NIC | | | | |
|--|-----------|--------------|----------------------|--------------------------------|
| Categoría NIC | Regresión | Persistencia | Progresión a NIC III | Progresión a carcinoma invasor |
| NIC I | 57% | 32% | 11% | 1% |
| NIC II | 43% | 35% | 22% | 1.5% |
| NIC III | 32% | 56% | - | 12% |

Se calcula que por cada millón de mujeres infectadas por VPH, 10% desarrollan cambios precancerosos en el tejido del cuello uterino (displasia). De estos aproximadamente el 8% desarrollarán cáncer limitado a las capas externas de las células de cuello uterino (carcinoma in situ); y aproximadamente 1600 desarrollarán cáncer invasivo (Fig. 5) (JHPIEGO, 2000).

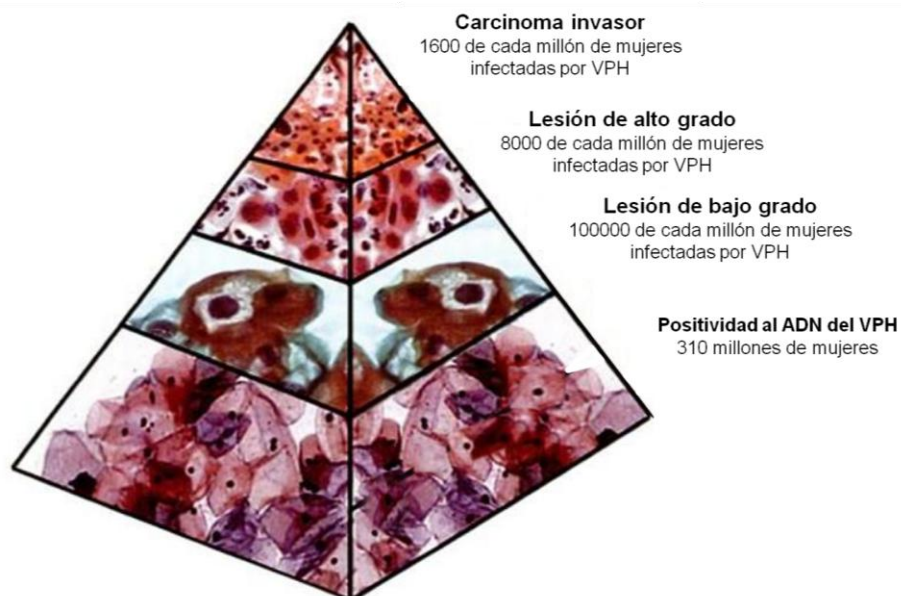


Fig. 5. Cálculo de la incidencia del virus del papiloma humano (VPH) a nivel mundial. Progresión de lesiones precursoras a cáncer cervico-uterino.

1.3.1 Virus del papiloma humano

Actualmente se han descrito alrededor de 120 tipos de VPH, de los cuales 40 infectan el tracto genital (de Villiers *et al.*, 1994). Los VPH son virus sin envoltura, de ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena, de aproximadamente 8000 pares de bases. El genoma del VPH está constituido por: región larga de control (LCR), región temprana y región tardía (Fig. 6). En la región LCR se encuentran secuencias que regulan la transcripción de los genes virales (zur Hausen, 2002). La región temprana, contiene genes que participan en la replicación viral. Está constituida de segmentos llamados marcos de lectura abierta (ORF), los cuales codifican para proteínas de expresión temprana, denominadas E1, E2, E4, E5, E6 y E7 (zur Hausen, 2000). Las proteínas E1 y E2 forman un complejo que reconoce el origen de replicación del genoma viral, al cual se unen de tal manera que E1 es la proteína iniciadora de la replicación del DNA y E2 regula la transcripción en la replicación (Frattoni y Laimins, 1994; Shah *et al.*, 1996). Asimismo, E2 actúa como represor transcripcional de los genes E6 y E7 (Stevenson *et al.*, 2000). E4 participa en el desmantelamiento de las redes de citoqueratina en las células epiteliales, lo cual origina la apariencia coilocítica característica de las células infectadas con VPH de alto riesgo (Fig. 7) (Koss y Durfee, 1956; Roberts *et al.*, 1994). E5 presenta actividad oncogénica al formar complejos con receptores transmembranales que le confieren la capacidad de fusionar células (Hwang *et al.*, 1995). Cuando el genoma viral se linealiza, se integra al genoma celular y se pierden los genes E1, E2, E4, E5 (Schneider-Maunoury *et al.*, 1987), lo cual favorece la expresión de E6 y E7, principales proteínas oncogénicas de los virus de alto riesgo, de hallazgo común integrados al genoma celular de las células malignas de CaCu (Mantovani y Barks, 2001). Ambas proteínas presentan funciones específicas involucradas en la transformación e inmortalización de las células epiteliales humanas (Munger *et al.*, 1989). Además, participan en el mantenimiento de la célula tumoral mediante la inhibición de supresores tumorales (Werness *et al.*, 1990; Dyson *et al.*, 1989). Por otra parte, la región tardía está formada por dos segmentos denominados L1 y L2, donde se encuentran genes virales que forman proteínas de la cápside (Orth y Favre, 1985; Scheffner *et al.*, 1994).

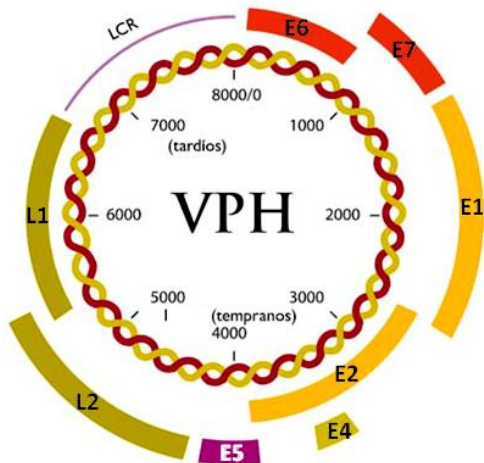


Fig. 6. Estructura del genoma del VPH. El genoma del VPH es una molécula de ADN circular de doble cadena. Se divide en tres regiones: región no codificante o reguladora Long Control Region (LCR) y la región codificante, dividida a su vez en dos regiones de expresión, temprana (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y tardía (L1 y L2). Fuente: The Health's Professional's HPV HANDBOOK, 2004.

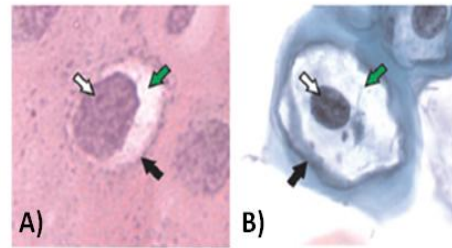


Fig. 7. Coilocitos. El coilocito es una célula escamosa madura que presenta efectos citopáticos, típica en infecciones del VPH. Se muestra una preparación de la citología cervical de: (A) una biopsia y (B) una tinción de Papanicolaou. Las flechas muestran características típicas coilocíticas en una célula: un acéntrico, hiper cromático y moderadamente agrandado núcleo (flecha blanca) desplazado por una vacuola perinuclear de gran tamaño (flecha verde), rodeada por un citoplasma engrosado (flecha negra). Fuente: Krawczyk *et al.*, 2008.

Los VPH se clasifican, de acuerdo al riesgo de progresión a cáncer, en virus de bajo o alto riesgo (Tabla 2). Los tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 45 y 58 se han encontrado en los tumores más invasivos (Walboomers *et al.*, 1999; Bosch *et al.*, 2002; Muñoz *et al.*, 2003); de los cuales el VPH16 y VPH18 se han encontrado en aproximadamente 70% de todos los CaCu (Clifford, 2003).

| Tabla 2. Clasificación epidemiológica de los tipos de VPH | |
|---|--|
| Riesgo | Tipo de VPH |
| Alto | 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 |
| Bajo | 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, CP6108 |

2. MARCO TEÓRICO

En las últimas décadas se ha demostrado que las células cancerosas adquieren fenotipos comunes como autosuficiencia de las señales de crecimiento, resistencia a las señales antiproliferativas, potencial replicativo ilimitado, evasión de apoptosis, angiogénesis sostenida, invasión de tejidos y metástasis (Hanahan y Weinber, 2000); y actualmente se ha sugerido la reprogramación metabólica (Ortega *et al.*, 2009). Estos hallazgos son consistentes con los reportes que demuestran que la mayoría de los tumores cancerosos presentan una sobreexpresión de proteínas relacionadas al fenotipo maligno (Por ejemplo GLUT1, LDHA, c-Myc, HIF-1, Akt) que favorecen su supervivencia, progresión e invasividad (Warburg, 1956; Zhong y Howard, 1990; Ferreira, 2010; Guertin y Sabatini, 2007).

Además de las características fenotípicas del cáncer mencionadas, el efecto Warburg es también un evento fundamental que ocurre en la mayoría de los tumores malignos (Altenberg y Greulich, 2004). El efecto Warburg se define como la capacidad que presentan las células cancerosas de mantener un elevado flujo glucolítico aún en presencia de oxígeno (Warburg *et al.*, 1956). De esta manera, el fenotipo glucolítico favorece la invasividad, persistencia y agresividad del tumor, lo cual confiere una ventaja proliferativa en la evolución del cáncer (Garber, 2006; Gatenby y Gillies, 2007; Gillies *et al.*, 2008; Hsu y Sabatini, 2008).

Actualmente este fenotipo metabólico es la base para el diagnóstico de tumores *in vivo* por tomografía de emisión de positrones con fluoro-2-desoxiglucosa (FDG-PET) con un 90% de especificidad y sensibilidad (Pauwels *et al.*, 2000). Adicionalmente, el producto final de la glucólisis, el lactato, es también usado como marcador biológico en el diagnóstico clínico de diversos tipos de cáncer (Kennedy *et al.*, 2010), al igual que la enzima que cataliza su producción, la lactato deshidrogenasa en su isoforma A (Favilla *et al.*, 2010).

2.1 Metabolismo celular

Las células normales y tumorales deben mantener una homeóstasis energética. Esta es más elevada en las células tumorales y fundamental para su rápida proliferación y supervivencia; cualquier alteración de este nivel de energía va a comprometer la función y viabilidad celular (Veech *et al.*, 2001).

La glucosa es el principal sustrato energético y fuente de los precursores biosintéticos necesarios para mantener la homeostasis celular. Este carbohidrato es transportado al medio intracelular principalmente a través de los transportadores de facilitación de glucosa (GLUT), compuestos por seis isoformas (GLUT1-6) (Mueckler, 1994). El metabolismo energético de la glucosa en los mamíferos se lleva a cabo por dos diferentes procesos: fermentación láctica y respiración aeróbica. En la fermentación láctica, producida exclusivamente en el citosol, la glucosa es degradada a piruvato a través de la glucólisis y posteriormente el piruvato es reducido a lactato (Fig. 8). En total, este proceso genera 2 ATP (Adenosina trifosfato), por molécula de glucosa, además de equivalentes energéticos en forma NADH (Dinucleótido de nicotinamida-adenina reducida). Por otra parte, la respiración aeróbica está compuesta por la glucólisis, ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA) o Ciclo de Krebs, y la fosforilación oxidativa (Fig. 8). En esta vía, la glucosa es oxidada principalmente en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos en las mitocondrias, dando como resultado dióxido de carbono (CO₂) y coenzimas reducidas (NADH y FADH₂). Estas coenzimas participan en la cadena de transportes de electrones generando el gradiente electroquímico de H⁺, con función de intermediario metabólico, para la síntesis de ATP. Este proceso es denominado fosforilación oxidativa (OXPHOS) y da lugar a un rendimiento energético 20 veces mayor de oxidación de glucosa que por la vía glucolítica (Ganapathy *et al.*, 2009). En células normales esto sólo puede ocurrir en presencia de O₂, mientras que en la fermentación puede ocurrir en su ausencia (Nelson y Cox, 2008).

La mayoría de células tumorales inhiben parcialmente la fosforilación oxidativa, generando una disminución de la producción de ATP en las mitocondrias (Wallace,

2005). Sin embargo, para satisfacer sus crecientes demandas de energía aumentan la tasa glucolítica (Warburg, 1956). Esta vía, solo puede ser sostenida con la regeneración de la coenzima NAD⁺ (Dinucleótido de nicotinamida-adenina) (Warburg, 1956). Esta coenzima, en las células normales se regenera principalmente debido a la oxidación mitocondrial de NADH en la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa (López-Alarcón y Eboli, 1986). Sin embargo, las células tumorales regeneran NAD⁺ principalmente mediante la conversión de piruvato en lactato aún en condiciones adecuadas de oxígeno, lo cual es facilitado por la sobre-expresión de la enzima lactato deshidrogenasa en su isoforma LDH-A (Semenza *et al.*, 1996; Bauer *et al.*, 2004). Por lo tanto, para las células cancerosas la producción de lactato es esencial para el mantenimiento continuo y elevado del flujo glucolítico (Fig. 8) (Kennedy y Dewhirst, 1986).

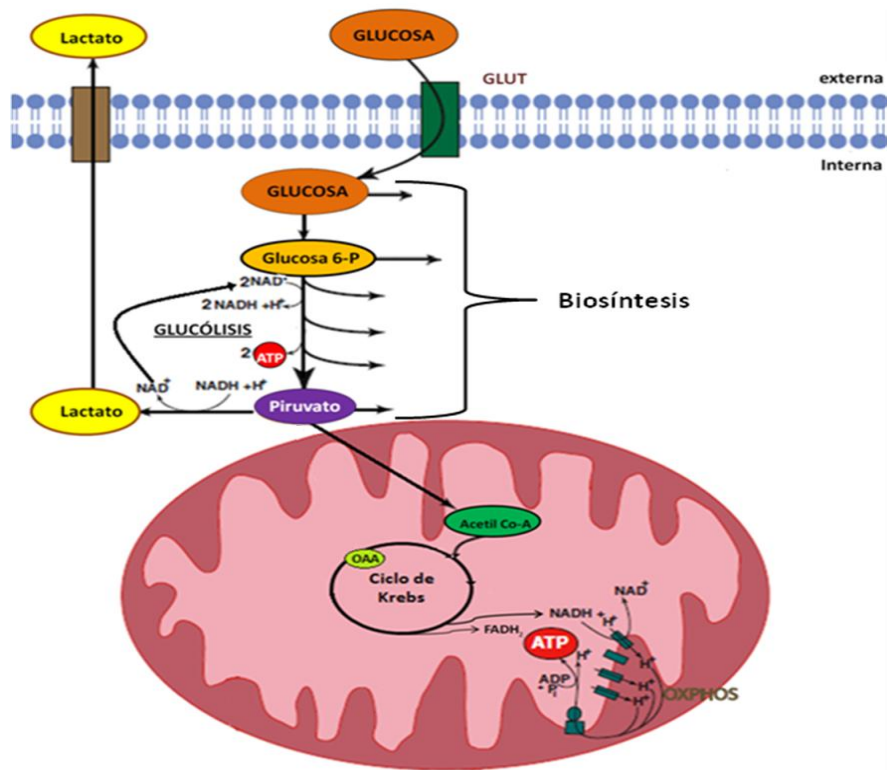


Fig. 8. Rutas del metabolismo de la glucosa. Después de entrar en la célula, al ser captada por los transportadores de glucosa (GLUT), la glucosa puede ser utilizada para la biosíntesis de carbohidratos, aminoácidos, proteínas, triacilglicéridos, nucleótidos, o es oxidada secuencialmente en la glucólisis dando lugar a 2 moléculas de piruvato, NADH y ATP. El Piruvato puede entrar en la mitocondria y sufrir una descarboxilación oxidativa que da lugar a acetil-CoA, que se condensa con el oxalacetato (OAA), alimentando así el ciclo de Krebs. En el ciclo de Krebs se generan coenzimas reducidas (NADH y FADH₂) que se re-oxidan mediante los complejos respiratorios, los cuales transfieren los electrones hasta el O₂ permitiendo el bombeo H⁺ en contra del gradiente. Se genera así el gradiente electroquímico para la síntesis de ATP mediante la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Modificado de Ortega *et al.*, 2009.

2.2 Enzima LDH-A

La LDH es una enzima tetramérica con cinco isoformas (A4, A3B1, A2B2, A1B3 y B4) compuesta por dos subunidades principales, la subunidad A y B (Markert *et al.*, 1975; Le *et al.*, 2010). La LDH-A (también conocida como LDH-5, M-LDH, o A4) cataliza la conversión de piruvato a lactato, produciendo NAD⁺ y lactato (Burgner y Ray, 1984). Por otra parte, la LDH-B (también conocida como LDH-1, H-LDH, o B4), favorece cinéticamente la conversión de lactato a piruvato (Balinsky *et al.*, 1983).

Investigaciones recientes sugieren que la enzima LDH-A, es necesaria para la transformación mediada por c-Myc, oncogen que induce su expresión (Fig. 9) (Shim *et al.*, 1997; Zhong *et al.*, 1999). Este oncogen estimula el flujo glucolítico mediante el aumento de la expresión de los transportadores de glucosa (GLUT1 y GLUT3) y otras enzimas glucolíticas como hexocinasa II, Fosfofructocinasa-1, aldosa, enolasa y piruvato cinasa-M (Kim *et al.*, 2006; Semenza, 2003).

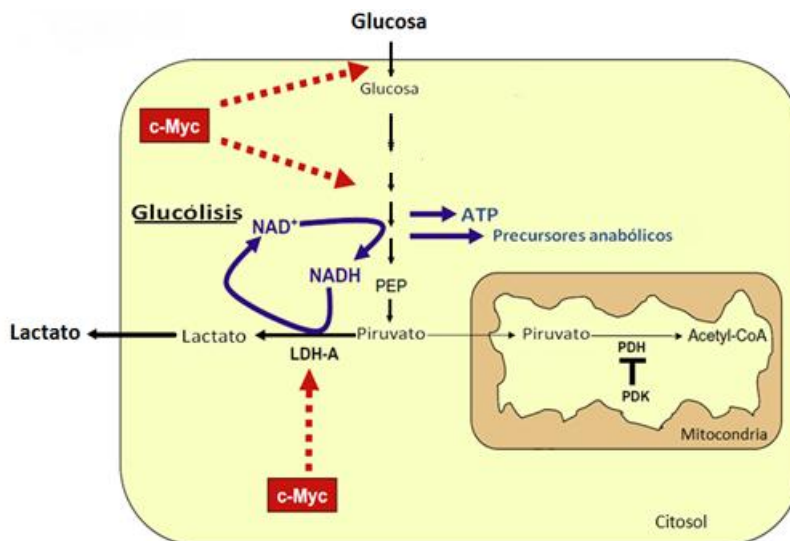


Fig. 9. La glucólisis y la reprogramación metabólica en las células cancerosas. El flujo glucolítico genera ATP y precursores biosintéticos en el citosol. El piruvato se convierte en lactato por la acción de la lactato deshidrogenasa A (LDH-A), lo que conlleva a la regeneración de NAD⁺ de NADH. La cinasa piruvato deshidrogenasa (PDK) bloquea la activación de la piruvato deshidrogenasa mitocondrial (PDH), lo que limita la conversión de piruvato en acetil-CoA y el mantenimiento del ciclo de Krebs. c-Myc es un oncogen que estimula el flujo glucolítico mediante el aumento de la expresión de los transportadores de glucosa y/o enzimas glucolíticas, incluyendo la LDH-A. PEP: fosfoenolpiruvato. Las flechas con mayor grosor indican mayor actividad en la célula tumoral. Modificado de Feron, 2009.

2.3 Vía de señalización mTOR

Diversas investigaciones han identificado a la vía de señalización mTOR como regulador central del crecimiento, ciclo y metabolismo celular, y recientemente se ha descrito como elemento importante en la regulación de la motilidad de las células tumorales y metástasis del cáncer (Shaw *et al.*, 2006; Guertin y Sabatini, 2007; Zhou y Huang, 2010). Asimismo, esta vía ha sido ampliamente descrita como sobre-activada en las células tumorales (Hudson *et al.*, 2002).

La proteína conocida como blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR) es una serina/ treonina cinasa, que integra las señales de los factores de crecimiento, niveles de oxígeno, el estado de energía y el estado nutricional, para coordinar el crecimiento celular y la progresión del ciclo celular (Sonenberg, 2004; Loewith y Hall, 2004; Sarbassov *et al.*, 2005; Dann y Thomas, 2006; Cook y Morley, 2007). Esta cinasa forma parte de dos complejos de bioquímica diferente llamados mTORC1 y mTORC2 (Wullschleger *et al.*, 2006). El complejo mTORC1 se compone por las subunidades mTOR, GβL (también llamado mLST8) y Raptor (proteína reguladora asociada a mTOR); y controla el crecimiento de las células en respuesta a la disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento (Sarbassov *et al.*, 2005). Por otro lado, el complejo mTORC2, está formado por mTOR, GβL y Riptor; media la proliferación y supervivencia celular (Fig. 10) (Guertin y Sabatini, 2007).

Actualmente se han descrito tres principales mecanismos de activación de mTOR, que incluyen la vía Akt/PI3K, de manera directa o indirecta, y a través del complejo de Rag GTPasas (Fig. 10). La activación de mTOR por la vía Akt/PI3K, altamente activada en el cáncer humano, inicia con la fosforilación de la fosfatidil-inositol-3 cinasa (PI3K) (De Fea *et al.*, 1997; Guertin y Sabatini, 2007). Posteriormente, PI3K activa a Akt, oncogen que estimula de manera positiva a mTOR por dos posibles mecanismos: 1) por inhibición de PRAS40, regulador negativo de mTOR (Sancak *et al.*, 2007; Vander *et al.*, 2007); o 2) por la inhibición del complejo de esclerosis tuberosa (TSC1/TSC2), regulador negativo de la Rheb GTPasa, que estimula directamente a mTORC1 (Guertin DA, Sabatini, 2007; Sancak *et al.*, 2008). Por otra parte, la activación de mTOR a través

de la familia de Rag GTPasas, consiste en la estimulación del complejo Rag A o Rag B/ Rag C o Rag D en respuesta a la concentración de aminoácidos, este complejo interacciona con Raptor causando la activación de mTOR (Manning, 2004; Guertin DA, Sabatini, 2007).

La activación de mTOR controla la síntesis de proteínas (Burnett *et al.*, 1998.); inhibe la autofagia (Meijer, 2003); estimula la biosíntesis de lípidos (Lazar, 2005), la biogénesis de ribosomas (Guertin y Sabatini, 2007); regula el ciclo celular, la proliferación y la supervivencia celular (Dang, 1999). Además de controlar la expresión de oncogenes como c-Myc y HIF-1, que estimulan la expresión de enzimas glucolíticas (Fig. 10) (Hudson *et al.*, 2002; Dang *et al.*, 2006; Bernardi *et al.*, 2006).

Sin embargo, la vía mTOR es inhibida en respuesta a estrés energético (Krause *et al.*, 2002; Inoki *et al.*, 2003; Reiter *et al.*, 2005) o por la acción de fármacos como la rapamicina (Dowling *et al.*, 2007). Uno de los principales mecanismos inhibidores de mTOR es el mediado por la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) (Krause *et al.*, 2002). Esta cinasa actúa como un sensor de energía intracelular para el complejo mTORC1 (Hardie y Hawley 2001). Se activa en respuesta a factores de estrés ambiental, energético y nutricional, o por la acción de fármacos como AICAR y la metformina (Hattori *et al.*, 2006; Towler y Hardie, 2008; Kahn *et al.*, 2005).

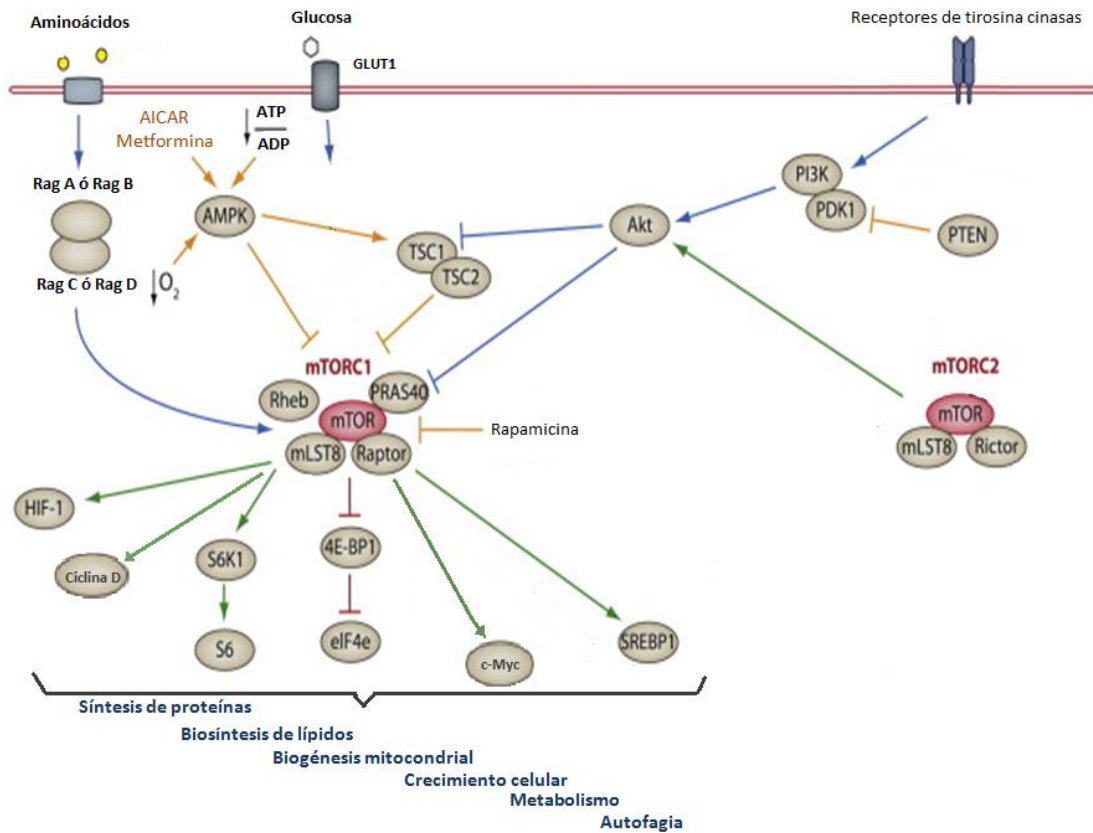


Fig. 10. Vía de señalización mTOR. El objetivo de rapamicina en mamíferos (mTOR) es la subunidad catalítica de dos complejos llamados mTORC1 y mTORC2. mTORC1 es sensible a los factores de crecimiento, hipoxia, falta de energía y aminoácidos. El complejo TSC1-TSC2 regula negativamente la GTPasa Rheb, la cual activa directamente mTORC1. El complejo de proteínas Rag, reguladas por la entrada de aminoácidos, activa mTORC1 por un mecanismo independiente. mTORC1 controla la expresión de: el factor inducible de hipoxia (HIF-1), la ciclina D, el oncogen c-Myc, la proteína ribosomal S6, el factor de iniciación eucariótico 4e (eIF4e) y la proteína de unión al elemento regulado por esteroides (SREBP1); los cuales participan en la síntesis de proteínas y lípidos, la biogénesis mitocondrial, crecimiento celular, metabolismo e inhibición de la autofagia. La señalización mTORC2 tiene múltiples funciones en el control de la supervivencia celular, la regulación del metabolismo, y la organización del citoesqueleto. Cuando está activo, mTORC2 fosforila a la cinasa Akt, la cual a su vez activa a mTORC1. Akt es activada por la fosfatidil-inositol-3 cinasa (PI3K) o por la cinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK1), y es regulada negativamente por PTEN. Las líneas azules indican señales que conducen a la activación de mTOR y las naranjas a su inhibición, las verdes promueven una función particular, y las rojas indican inhibición de la función de la proteína. Modificado de Powell y Delgoffe, 2010.

2.4 TRATAMIENTO

El tratamiento estándar contra los tumores pulmonares y cervicales, comprende el empleo de cisplatino (CDDP), agente citotóxico que daña el DNA, combinado con otros fármacos quimioterapéuticos y/o radioterapia (Schiller *et al.*, 2002; Tewari y Monk, 2005; Monk *et al.*, 2007). Esta terapia ha probado ser la más exitosa en las últimas décadas, aunque su aplicación es limitada, debido a que presenta alta nefrotoxicidad y ototoxicidad (Ries y Klastersky, 1986). Actualmente la terapia de cisplatino parece haber alcanzado una meseta terapéutica, con una tasa de respuesta objetiva del 30-40% y una media de supervivencia de aproximadamente un año en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadio III, estadio IV, o recurrencia de la enfermedad (schiller *et al.*, 2002; Ohe *et al.*, 2007); y una tasa de respuesta del 15-25% en pacientes con CaCu persistente o recurrente (National Institutes of Health Consensus, 1997; Im y Monk, 2002). Por otra parte, las lesiones tempranas del cáncer cervical son tratadas quirúrgicamente, mientras que las etapas localmente avanzadas son tratadas con CDDP concurrente y radioterapia. El tumor cervical metastásico se trata con quimioterapia paliativa (Monk *et al.*, 2007). Adicionalmente, el desarrollo de la vacuna contra el VPH ha mostrado ser un factor importante para la prevención de CaCu, sin embargo, su costo no ha permitido difundir su distribución en países de escasos recursos (Otterson y Kesselheim, 2008).

Durante las últimas décadas se han identificado una serie de nuevos fármacos como topotecan, vinorelbina, gemcitabina, doxorubicina y paclitaxel, como agentes coadyuvantes para el tratamiento de ambas neoplasias. Sin embargo, la elevada toxicidad de estos agentes continúa representando una limitante para su uso (Sandler *et al.*, 1995; Crino *et al.*, 1995; Langer *et al.*, 1995).

Ante esta problemática, diversas investigaciones han demostrado que la inhibición metabólica y bloqueó de las vías de señalización, ampliamente descritas como sobre-activadas en la mayoría de las células tumorales, son blancos relevantes para el desarrollo de nuevas terapias. De esta manera, estudios epidemiológicos recientes han

demostrado que pacientes diabéticos tratados con el hipoglucemiante oral Metformina (Met), ampliamente descrita como un inhibidor de la vía mTOR, presentan una menor incidencia a cualquier tipo de cáncer (Evans *et al.*, 2005; Buzzai *et al.*, 2007; Jiralerspong *et al.*, 2009). Adicionalmente, trabajos *in vivo* e *in vitro* han descrito que la Met inhibe la expresión de oncoproteínas, bloquea el ciclo celular e inhibe el crecimiento tumoral (Zhou *et al.*, 2001; Zakikhani *et al.*, 2006; Zhuang y Miskimins, 2008). Por otra parte, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el ácido oxámico (AO) es un potente inhibidor de la lactato deshidrogenasa A, enzima ampliamente asociada al crecimiento tumoral, la invasividad, la metástasis y a un pronóstico pobre (Gillies, 2001b; Fantin *et al.*, 2006; Thornburg *et al.*, 2008; Koukourakis *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2009; Zhuang *et al.*, 2010). Ante este nuevo enfoque de la quimioterapia, en el presente trabajo se evaluaron los efectos sobre la viabilidad celular del ácido oxámico y de la Metformina, solos y en combinación con el cisplatino, en líneas celulares provenientes de tumores malignos de tejido cervical y pulmonar.

2.4.1 Cisplatino

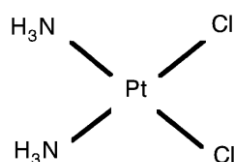


Fig. 11. Estructura química del cisplatino.

El cisplatino (cis-diaminodichloroplatino (II), CDDP) es un compuesto inorgánico de coordinación metálico. Molécula sensible a la luz, en la cual el platino se encuentra en estado de oxidación +2. Es un polvo de color amarillo oscuro. Punto de fusión de 270 ° C., soluble 0.253 g / 100 ml en agua a 25° C y 1 mg/ml en cloruro de sodio al 0.9% (Budavari, 1989).

Sintetizado por primera vez en 1844 por Michel Peyrone (Peyrone y Chemie, 1845). Sin embargo, su estructura fue descrita hasta 1893 por Alfred Wegner (Daugaard y

Abildgaard, 1989). En 1965, sus propiedades antitumorales fueron descritas por Rosenberg y cols., (Rosenberg *et al.*, 1965). En 1971, fue usado por primera vez en un paciente con cáncer. Y en 1978, fue aprobado por la FDA para su uso clínico en la terapia contra el cáncer (Lebwohl y Canetta, 1998), bajo la marca comercial Platinol® (Bristol-Myers Squibb), primero en Canadá y posteriormente en Estados Unidos y a nivel mundial (Lebwohl y Canetta, 1998).

El cisplatino es uno de los agentes quimioterapéuticos más ampliamente usados para el tratamiento de tumores sólidos como el cáncer de esófago, cabeza, pulmón, ovario, testículo y cérvix, así como mielomas, linfomas y melanomas. Entre sus nombres comerciales se incluyen el Platinol (Bristol), Platamine (Farmaitalia), Platistil (Pfizer), Platosin (Farnachemie), Cisplatin injection (Abbot).

Durante las últimas tres décadas, 23 fármacos a base de cisplatino se han usado en ensayos clínicos, de los cuales dos (carboplatino y oxaliplatino) han sido aprobados para su comercialización internacional, y nedaplatino solo en Japón. En la actualidad hay cuatro fármacos (satraplatino, picoplatino, lipoplatino y Prolindac) en distintas fases de ensayo clínico (Wheate *et al.*, 2010).

2.4.1.1 Mecanismo de acción

El cisplatino entra a las células principalmente a través de transportadores de cationes orgánicos, expresados en diversos tejidos como hígado, intestino y riñones (Ciarimboli *et al.*, 2005). Sin embargo, este fármaco presenta una mayor afinidad por la isoforma 2 (OCT2) (Ciarimboli *et al.*, 2005; Koepsell *et al.*, 2007). Una vez dentro de la célula los ligandos cloruros del cisplatino se sustituyen por moléculas de agua (activación por hidrólisis), generando una especie con carga positiva que puede reaccionar con sitios nucleofílicos de macromoléculas intracelulares como proteínas, fosfolípidos de la membrana, microfilamentos del citoesqueleto, moléculas que contiene tioles, ARN y ADN (Lau y Ensing, 2010). El cisplatino intracelular reacciona con el ADN nuclear para formar aductos, es decir, causa la unión cruzada entre dos bases nitrogenadas. Estos

aductos provocan la desnaturalización local de la cadena de ADN, lo cual estimula mecanismos de reparación que conducirán a la muerte celular por apoptosis; este es considerado su principal mecanismo citotóxico (Pérez, 1998; Jamieson y Lippard., 1999).

2.4.1.2 Farmacocinética

El cisplatino es administrado vía intravenosa, tiene una vida media inicial en plasma de 25-49 minutos y una segunda vida media de 58-73 h, más del 90% del fármaco se une a proteína plasmática (Weiner y Jacobs, 1983). Es excretado principalmente por los transportadores MATE1 y MATE2-K vía renal, en un 27-45% en los primeros cinco días, y el resto del cisplatino se excreta por orina en más de 50 días (Aleksunes *et al.*, 2008; Chirino y Pedraza-Chaverri, 2009). Presenta severos efectos secundarios como vomito, trastornos del sistema digestivo, ototoxicidad, neurotoxicidad y nefrotoxicidad. Su efecto nefrotóxico, presente en 28-38% de los pacientes a dosis de 50-100 mg/m², ha limitado su uso clínico (Ries y Klastersky, 1986).

2.4.1.3 Resistencia a cisplatino

El uso y la eficacia terapéutica del cisplatino son limitados a causa de sus graves efectos secundarios y a la resistencia intrínseca o adquirida al fármaco. Los mecanismos de resistencia a cisplatino, en aproximadamente el 20% de los pacientes, se han reportado como multifactoriales e incluyen cambios en el transporte de fármacos que conducen a la disminución de su captación (Hospers *et al.*, 1988); aumento de la desintoxicación de los fármacos (Perez, 1998); cambios en la reparación del ADN (Chaney *et al.*, 1996); y por alteraciones en la vía de muerte por apoptosis (Piulats *et al.*, 2009).

2.5 Metformina

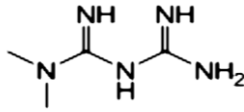


Fig. 12. Estructura química de la metformina.

La Metformina (3-(diaminometilideno)-1,1-dimetilguanidina; Met) es un polvo blanco cristalino, higroscópico. Punto de fusión de 225°C, soluble 1:2 en agua (p/v) y 1:100 de etanol (p/v), insoluble en éter y cloroformo (Budavari, 1996; Moffat *et al*, 2004).

La Met, principio activo aislado de la lila francesa (*Galega officinalis*) en 1920, planta usada como agente hipoglucemiante desde tiempos medievales (Bailey y Day, 1989). Fue sintetizada en 1922 por Emil Werner y James Bell (Schäfer, 1983). Posteriormente en 1929, Slotta y Tschesche publican el primer estudio sobre la Met como reductor de los niveles de glucosa en conejos (Schäfer, 1983). Estudios subsecuentes realizados en 1950 por Eusebio Y. García, demostraron que este fármaco reducía los niveles de glucosa en sangre hasta límites fisiológicos en pacientes tratados, y sin mostrar toxicidad (García, 1950). En 1969, Sterne describió las propiedades normoglucemiantes de la Met (Sterne, 1969). En 1970, Vladimir Dilman desarrollo originalmente la idea de que las biguanidas antidiabéticas podrían ser prometedoras como medicamentos contra el cáncer (Martin-Castillo *et al.*, 2010). En 1995 fue aprobada por la FDA como tratamiento para la diabetes tipo II, clasificándola como fármaco categoría B: sin riesgo teratogénico ni letalidad embrionaria humana conocida.

Glucophage fue la primera marca de formulación de Met a ser comercializada en Estados Unidos, a partir de 1995, bajo licencia por Bristol-Myers Squibb. Actualmente, este fármaco es el más ampliamente prescrito para la diabetes tipo II en el mundo. Entre sus nombres comerciales se incluyen Glucophage XR (Bristol-Myers Squibb), *Obimet* (Abott), *Dianben* (Merck), *Diaformin* (Alphapharm), Metformin (Apotex).

2.5.1 Mecanismo de acción

La Met es una base hidrofílica que a pH fisiológico existe como especie catiónica (>99,9%), entra al medio celular a través de los transportadores de cationes orgánicos, principalmente por OCT1 y OCT2, expresados en diversos tejidos como hígado, intestino y riñones (Koepsell *et al.*, 2007). En el paciente diabético, la actividad hipoglucemiante de la Met ocurre al disminuir la absorción intestinal de la glucosa, mediante la supresión de los transportadores sodio-glucosa (SGLT) (Wright y Turk, 2004); aumenta la captación de glucosa en los tejidos periféricos al inducir la translocación de los transportadores GLUT1 y GLUT4 (Matthaei *et al.*, 1993); mejora la interacción insulina-receptor al inhibir mTOR (Florez *et al.*, 2004); disminuye la producción de glucosa hepática, debido a la inhibición de la gluconeogénesis (Stumvoll *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2008). Adicionalmente, la Met inhibe la lipogénesis y promueve la oxidación de ácidos grasos libres (Violet *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008; Vázquez *et al.*, 2009; Algire *et al.*, 2010). Por otra parte, se ha sugerido que la Met activa a AMPK por dos posibles mecanismos: 1) al estimular a LKB1, el cual fosforila a AMPK (Shaw *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2001), y 2) por inhibición del complejo I de la cadena respiratoria, lo cual provoca el incremento de la concentración de ADP, promoviendo así la activación de AMPK (Hawley *et al.*, 2002; El-Mir *et al.*, 2000; Owen *et al.*, 2000; Hinke *et al.*, 2007).

Recientemente, la Met se ha descrito como un inhibidor de la vía mTOR (Dowling *et al.*, 2007; Memmott *et al.*, 2009). Se han propuesto algunos posibles mecanismos de acción inhibitoria a través de la activación de la AMPK y vías independientes, como el complejo de Rag GTPasas (Gwinn *et al.*, 2008; Wingo *et al.*, 2009; Foretz *et al.*, 2010; Kalender *et al.*, 2010).

2.5.2 Farmacocinética

La Met se absorbe en el tracto gastrointestinal, en mayor proporción en el intestino delgado. La unión a las proteínas plasmáticas es en un porcentaje muy bajo (Goodman

y Gilman, 1996). Presenta una biodisponibilidad oral del $55 \pm 16\%$, la cual disminuye en presencia de alimentos. Se excreta inalterada en la orina en un 50% y el resto en heces (Graham *et al.*, 2011). Su excreción renal se lleva a cabo principalmente a través de los transportadores de extrusión de toxinas y múltiples fármacos, MATE1 y MATE2-K, isoformas específicas del riñón (Toyama *et al.*, 2010).

Está indicada preferentemente en el tratamiento de: diabetes mellitus, desde 1995, síndrome de ovario poliquístico y obesidad. Su dosis máxima de administración es de 2550 mg al día (Clifford *et al.*, 1996). Adicionalmente, es un fármaco accesible y de bajo costo.

Algunos de los efectos adversos descritos son: malestar gastrointestinal (diarrea, náuseas, molestias abdominales, anorexia); sabor metálico; puede dañar la absorción de vitamina B12 y ácido fólico; puede causar acidosis láctica, lo cual puede ser un grave problema en sobredosis y cuando se prescribe a pacientes con daño renal y hepático (Devlin, 1999; Clifford *et al.*, 1996).

Durante los últimos años se ha reportado que la Met es capaz de ejercer acciones antioxidantes (Srividhya *et al.*, 2002; Khouri *et al.*, 2004; Sander *et al.*, 2006; Kukidome *et al.*, 2006; Ouslimani *et al.*, 2005), efecto anti-inflamatorio (Dandona *et al.*, 2004; Isoda *et al.*, 2006; Nath *et al.*, 2009), actividad antitumoral (in vitro e in vivo) (Anisimov *et al.*, 2005; Zakikhani *et al.*, 2006; Ben *et al.*, 2008; Jiralerspong *et al.*, 2009), y adicionalmente, induce linfocitos T de memoria (Araki *et al.*, 2009; Pearce *et al.*, 2009; Prlic y Bevan, 2009).

2.6 Ácido oxámico

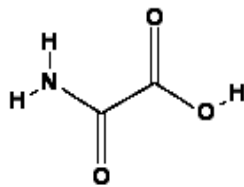


Figura 13. Estructura química del ácido oxámico.

El ácido oxámico (ácido oxamidico, ácido aminooxacético, monoamina del ácido oxálico) es un polvo cristalino blanco de punto de fusión de 214°C, soluble en agua (50 mg/mL) e insoluble en etanol, metanol y éter (Budavari, 2006).

En 1959 Fiume demostró el efecto inhibitor del AO en la LDH de hepatoma ascítico Yoshida (Fiume, 1959). Posteriormente en 1961, se reportó la actividad inhibitora del AO sobre el metabolismo de células tumorales Ehrlich y HeLa *in vitro* (Papaconstantinou y Colowick, 1961). En 1986, Martin-Raquero y cols., demostraron una potencial actividad como agente hipoglucémico (Martin-Requero *et al.*, 1986). En 1994, Gorlach y Acker determinaron que el AO en el modelo de esferoides de células de cáncer colon, provocaba un aumento de la sensibilidad del tumor a la radiación (Gorlach y Acker, 1994). Actualmente, se han reanudado las investigaciones sobre el AO, esto ha conducido al estudio y síntesis de compuestos derivados, los cuales también han mostrado actividad inhibitora sobre la LDH-A en mamíferos y protozoarios (Yu *et al.*, 2001); además de acción antiparasitaria sobre *Plasmodium falciparum* y *Trypanosoma cruzi* (Deck *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2007; Aguirre-Alvarado *et al.*, 2010).

2.6.1 Mecanismo de acción

El ácido oxámico, análogo estructural del piruvato, es un inhibidor de la aspartato aminotransferasa (Lustig y Redman, 1979; Thornburg *et al.*, 2008) y de manera específica de la lactato deshidrogenasa en su isoforma A, enzima que regula el flujo

glucolítico mediante la conversión de piruvato a lactato. El AO entra al medio intracelular a través de los transportadores de monocarboxilatos (MCT), principalmente en su isoforma 1 (MCT1) (Carpenter y Halestrap, 1994). Entre las isoformas de MCT, la MCT1 se expresa más ampliamente y tiene extensa especificidad de sustrato en diversos tejidos (Halestrap y Price, 1999).

El principal mecanismo de acción del AO consiste en la formación del complejo ternario inactivo AO-NADH-LDHA, compitiendo con el piruvato por el sitio activo de la enzima LDH-A (Novoa *et al*, 1959). De esta manera, actúa principalmente como inhibidor de la glucólisis (Hakala *et al.*, 1953; Novoa *et al*, 1959).

La actividad antiparasitaria del AO consiste en la inhibición selectiva de la enzima α -hidroxiácido deshidrogenasa II (II-HADH) de *Trypanosoma cruzi* y la inactivación de la LDH de *Plasmodium falciparum*, ambas enzimas con una función homóloga (regenerar NAD⁺ para mantener el flujo glucolítico) y de suma importancia para el suministro de energía, la motilidad del flagelo y la supervivencia del parásito (Elizondo *et al*, 2003; Choi *et al.*, 2007).

Por otra parte, el AO disminuye la gluconeogénesis como consecuencia secundaria de la reducción de la entrada de piruvato a las mitocondrias (Martin-Requero *et al.*, 1986).

3. OBJETIVOS:

1. Desarrollar el ensayo de determinación de viabilidad celular por MTT en líneas de células tumorales y linfocitos de individuos clínicamente asintomáticos.
2. Evaluar el efecto del cisplatino, la metformina y el ácido oxámico sobre la viabilidad celular en líneas de células tumorales de cáncer de cérvix.
3. Evaluar el efecto del cisplatino, la metformina y el ácido oxámico sobre la viabilidad celular en líneas de células tumorales de cáncer de pulmón.
4. Aislar linfocitos de sangre periférica, de muestras obtenidas de donadores clínicamente asintomáticos, por el método de fraccionamiento con Ficoll.
5. Evaluar en linfocitos de muestras de donadores clínicamente asintomáticos el efecto del cisplatino, la metformina y el ácido oxámico sobre la viabilidad celular.

4. HIPOTESIS:

Dada la alta dependencia de los tumores sólidos por el metabolismo de la glucosa y el lactato, el fármaco hipoglucemiante e inhibidor de la vía mTOR de síntesis de proteínas, la metformina, y el inhibidor de la lactato deshidrogenasa A (LDH-A), el ácido oxámico; causarán una mayor inhibición de la viabilidad celular en las líneas de células tumorales en comparación con la inhibición observada en células no tumorales.

Por otra parte, la exposición de células normales a los fármacos, metformina y ácido oxámico, al no presentar una alta dependencia por la glucosa y el lactato, no se verá afectada su viabilidad celular.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares: Caski, C-33A, HeLa, A549 y Calu-1. Las células Caski, C-33A, HeLa y Calu-1 fueron cultivadas en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM-F12) suplementado con suero fetal bovino al 10%; A549 cultivadas en medio GIBCO F-12K suplementado con suero fetal bovino al 10%. Todas las líneas celulares fueron incubadas a 37°C en 5% de CO₂ hasta tener una confluencia del 70 al 80%. Después de haber sido lavadas con PBS, tripsinizadas (Solución Tripsina-EDTA) y contadas (azul de tripano), las células fueron sembradas por sextuplicado en placas de 96 pozos, cada pozo con densidad celular de 10000 células, en su respectivo medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino al 10%.

Posterior al sembrado en placa de cada línea celular, estas fueron incubadas por 24 h en las condiciones citadas anteriormente. Después, el medio fue cambiado por medio de cultivo libre de suero y el tratamiento correspondiente, para ser conservadas en incubación a 24 h, 48 h y/o 72 h, en las siguientes combinaciones: 1) Control (sin fármaco), 2) CDDP, 3) CDDP-AO, 4) CDDP-Met, 5) CDDP-AO-Met, 6) AO, 7) AO-Met, 8) Met. Asimismo, se fue renovando el medio de cultivo con tratamiento cada 24 h. En el caso de los tratamientos, las concentraciones de los fármacos utilizadas son: Metformina (clorhidrato de 1,1-dimetilbiguanida; Sigma-Aldrich) 25 mM, disuelta en agua estéril; Ácido oxámico (Sigma-Aldrich) 10 mM, disuelto en agua estéril; y Cisplatino (cis-Diamminadichloro-platino (II); Sigma-Aldrich) 5 µM, disuelto en solución salina isotónica (SSI). Cada experimento fue realizado por triplicado.

5.2 Linfocitos

La obtención de linfocitos se realizó por el método de Ficoll (GE Healthcare) siguiendo la metodología del fabricante. Se utilizó el paquete leucocitario de tres muestras sanguíneas de tres donadores clínicamente sanos. Se diluyeron 12.5 ml de muestra en 27.5 ml de PBS y se agregaron a 10 mL de Ficoll. La muestra se centrifugó a 1500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente, sin freno. De esta manera se obtuvieron cuatro fases por gradiente de densidad: la primera, en la parte superior del tubo, compuesta por plasma y plaquetas; en la segunda fase se encuentran los linfocitos en aproximadamente un 70% y, en menor cantidad, monocitos, la tercera fase la forma el ficoll y en la cuarta fase se encuentran los glóbulos rojos y polimorfonucleares. Se aspiró la fase de linfocitos y se lavó tres veces con medio de cultivo RPMI sin suero fetal bovino, centrifugando a 1000, 1200 y 1500 rpm, respectivamente, durante 10 minutos. En cada lavado el medio fue eliminado y el botón de células fue resuspendido en medio RPMI sin suero fetal bovino. Para separar a los linfocitos de las células mononucleares, se incubaron las muestras en cajas petri a 37°C en 95% de O₂ por 1 h. De esta manera se logró la adherencia de las células mononucleares y los linfocitos se obtuvieron en suspensión, para lograr un mayor enriquecimiento de linfocitos esto se realizó dos veces. El sobrenadante fue centrifugado, se contaron los linfocitos obtenidos y se resuspendieron en RPMI con 10% de suero fetal bovino. Se incubaron por 24 h a 37°C en 95% de O₂. Subsecuentemente, fueron contados y sembrados 200000 linfocitos por pozo en placa de 96 pozos por triplicado, en medio libre de suero y se adicionó el tratamiento correspondiente por 24 h y 48 h. Los tratamientos fueron los siguientes: 1) Control (sin fármacos), 2) CDDP (control positivo), 3) AO, 4) Met, 5) AO-Met. Asimismo fue renovando el medio de cultivo con tratamiento cada 24 h. Las concentraciones de los fármacos utilizadas fueron: Metformina (Clorhidrato de 1,1-Dimetilbiguanida; Sigma-Aldrich) 25 mM, disuelta en agua estéril; Ácido oxámico (Sigma-Aldrich) 10 mM, disuelto en agua estéril; y Cisplatino (cis-Diamminadichloro-platino (II); Sigma-Aldrich) 0.2 µM, disuelto en solución salina isotónica (SSI). Cada experimento fue realizado por triplicado.

5.3 Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad celular fue determinada por el método MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Una vez transcurrido el tiempo de exposición al tratamiento, el medio fue eliminado totalmente de cada pozo, se añadieron 10 μ L de solución stock de MTT (Amresco) 12 mM disueltos en 100 μ L de medio libre de suero. Las placas se incubaron durante 4 horas a 37°C en 5% de CO₂. Posteriormente se eliminó el medio, se agregaron 100 μ L de dimetilsulfoxido (DMSO) y se incubaron las placas por 10 minutos. Se determinó la absorbancia (espectrofotómetro Epoch marca Biotek) a una longitud de onda de 540 nm.

5.4 Análisis estadístico

Los resultados se reportaron como la media \pm error estándar y se compararon mediante análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Bonferroni para analizar más de dos grupos. La prueba t de student se empleó para comparar diferencias entre dos grupos. Valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

6. RESULTADOS

Para evaluar la absorbancia correspondiente a distintas densidades celulares de las líneas HeLa, Calu-1 y Caski, se determinó la viabilidad de diferentes cantidades celulares por pozo, en incubaciones hechas en medio de cultivo a 24 h.

En todas las líneas celulares empleadas se observó un incremento lineal al aumentar la densidad celular (Fig. 14). Con estos datos se determinó que en estas líneas celulares 10000 células por pozo corresponden a un intervalo de absorbancia de 0.3-0.8, el cual se encuentra dentro de los límites de la ley de Lambert-Beer (Sierra *et al.*, 2010). En los experimentos subsecuentes de viabilidad se empleó esta cantidad de células por pozo en todas las líneas celulares.

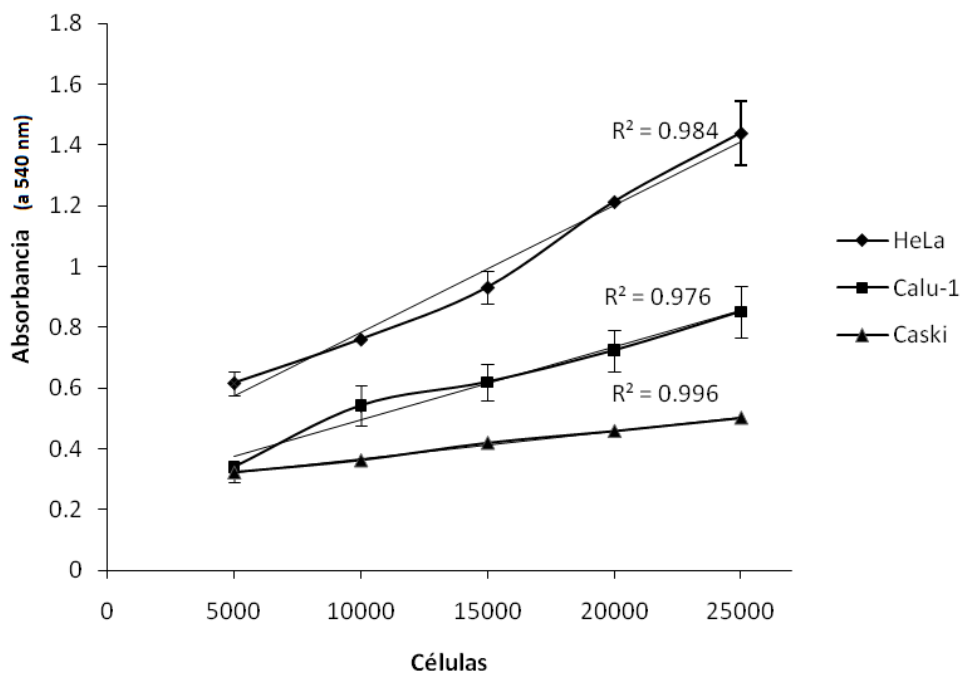


Fig. 14. Absorbancia de diferentes densidades celulares de las líneas HeLa, Calu-1 y Caski a las 24 h de siembra. Se sembraron de manera independiente células de tres líneas diferentes en medio de cultivo con SFB al 10% en placas de 96 pozos por 24 h. Después de la incubación se determinó la intensidad de la señal (Absorbancia), a una longitud de onda de 540 nm, de las células viables por el método de MTT. Los datos son la media +/- error estándar (n=6) de tres experimentos independientes.

6.1 Efecto de la Met y el AO en la viabilidad de células de cáncer cérvico-uterino

Se evaluó el efecto del AO y la Met sobre la viabilidad en las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino: Caski, C-33A y HeLa. Las células fueron incubadas en medio con AO 10 mM, Met 25 mM, de manera independiente y en combinación con CDDP 5 μ M.

La viabilidad de las células Caski al ser tratadas con AO o Met por 24 h disminuyó de manera significativa ($p < 0.05$) a 63% y 68%, respectivamente (Fig. 15). En esta línea celular, el efecto del AO o la Met no aumentó con el tiempo, ya que se tuvieron 78% y 66% de viabilidad a las 48 h, respectivamente (Fig. 16). El mayor efecto sobre la viabilidad se observó con los tratamientos CDDP-AO-Met y AO-Met. Interesantemente, los valores de viabilidad con ambos tratamientos fueron muy similares a las 24 h (CDDP-AO-Met: 36%; AO-Met: 35%) y 48 h (CDDP-AO-Met: 39%; AO-Met: 32%). A las 24 h todos los tratamientos con AO o Met, solos o en combinación, tuvieron una reducción de la viabilidad celular significativamente mayor ($p < 0.05$) a la observada con el tratamiento con CDDP (86%). El tratamiento AO-CDDP no mostró un efecto mayor sobre la viabilidad celular que aquel con AO sin combinar a las 24 h. Sin embargo, a las 48 h este tratamiento disminuyó la viabilidad a 60%, en comparación con 80% con el AO sin combinar.

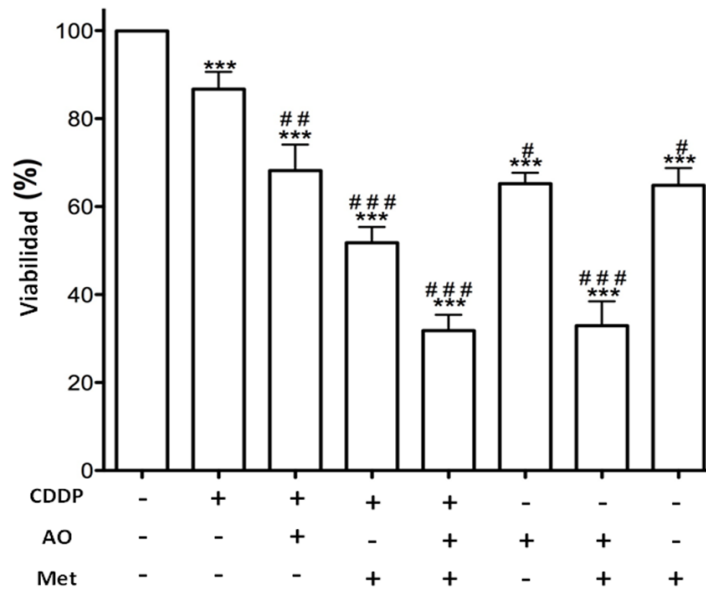


Fig. 15. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de células Caski por 24 h. Se sembraron células Caski en medio de cultivo suplementado con SFB al 10% en placas de 96 pozos por 24 h. Después de la siembra, las células fueron tratadas con ácido oxámico (AO) 10 mM, metformina (Met) 25 mM y cisplatino (CDDP) 5 μ M en medio de cultivo sin SFB por 24 h. Después de la incubación con los fármacos se evaluó la viabilidad por el método de MTT. Los datos son la media \pm error estándar (n=6) de tres experimentos independientes. Los grupos marcados con símbolos distintos son significativamente diferentes (***) $p < 0.0001$ vs Control; # $p < 0.05$ vs CDDP, ## $p < 0.001$ vs CDDP, ### $p < 0.0001$ vs CDDP).

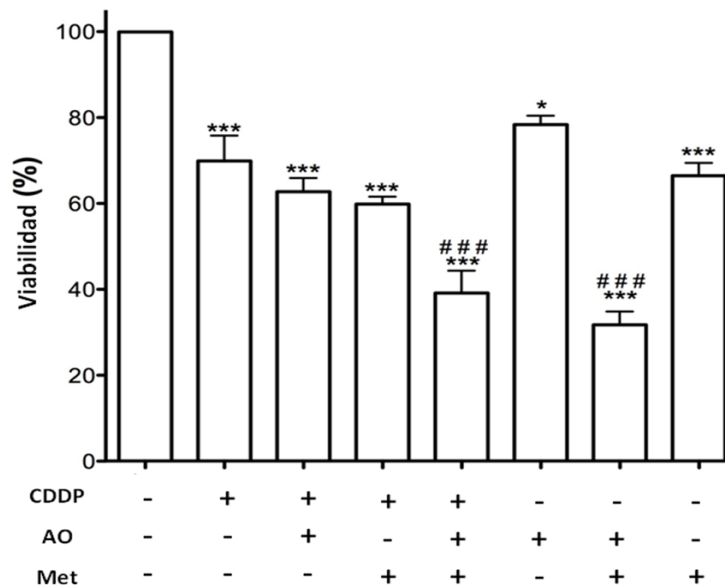


Fig. 16. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de células Caski por 48 h. Se sembraron células Caski en medio de cultivo suplementado con SFB al 10% en placas de 96 pozos por 24 h. Después de la siembra, las células fueron tratadas con ácido oxámico (AO) 10 mM, metformina (Met) 25 mM y cisplatino (CDDP) 5 μ M en medio de cultivo sin SFB por 48 h. Después de la incubación con los fármacos se evaluó la viabilidad por el método de MTT. Los datos son la media \pm error estándar (n=6) de tres experimentos independientes. Los grupos marcados con símbolos distintos son significativamente diferentes (* $p < 0.05$ vs Control, *** $p < 0.0001$ vs Control; ### $p < 0.0001$ vs CDDP).

La viabilidad de las células C-33A al ser tratadas con AO o Met por 24 h disminuyó significativamente ($p < 0.05$) a 80% y 63%, respectivamente (Fig. 17). En esta línea celular, el efecto del AO o la Met aumentó con el tiempo, ya que se tuvieron 57% y 28% de viabilidad a las 48 h, respectivamente (Fig. 18). El mayor efecto inhibitor se observó con los tratamientos CDDP-AO-Met y AO-Met. Notablemente, los valores de viabilidad con ambos tratamientos fueron muy similares a las 24 h (CDDP-AO-Met: 48%; AO-Met: 49%) y 48 h (CDDP-AO-Met: 10%; AO-Met: 13%). A las 24 h la reducción de la viabilidad celular fue superior a la observada con el tratamiento con CDDP (73%). El tratamiento AO-CDDP mostró un efecto mayor sobre la viabilidad celular que aquel con AO sin combinar a las 24h (AO-CDDP: 66%; AO: 80%) y 48 h (AO-CDDP: 29%; AO: 57%). El tratamiento Met-CDDP no mostró un efecto mayor sobre la viabilidad celular que aquel con Met sin combinar a las 24 h y 48 h.

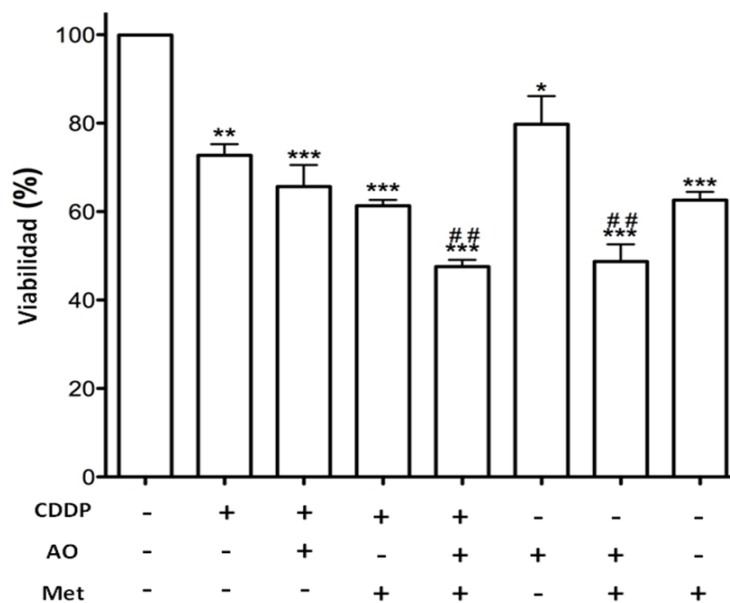


Fig. 17. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de células C-33A por 24 h. Se sembraron células C-33A en medio de cultivo suplementado con SFB al 10% en placas de 96 pozos por 24 h. Después de la siembra, las células fueron tratadas con ácido oxámico (AO) 10 mM, metformina (Met) 25 mM y cisplatino (CDDP) 5 uM en medio de cultivo sin SFB por 24 h. Después de la incubación con los fármacos se evaluó la viabilidad por el método de MTT. Los datos son la media \pm error estándar ($n=6$) de tres experimentos independientes. Los grupos marcados con símbolos distintos son significativamente diferentes (* $p < 0.05$ vs Control, ** $p < 0.001$ vs Control, *** $p < 0.0001$ vs Control; ## $p < 0.001$ vs CDDP).

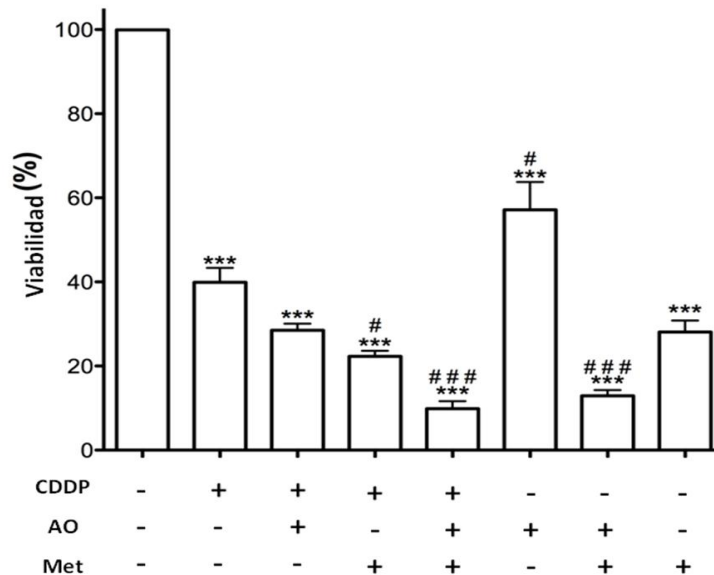


Fig. 18. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de células C-33A por 48 h. Se sembraron células C-33A en medio de cultivo suplementado con SFB al 10% en placas de 96 pozos por 24 h. Después de la siembra, las células fueron tratadas con ácido oxámico (AO) 10 mM, metformina (Met) 25 mM y cisplatino (CDDP) 5 uM en medio de cultivo sin SFB por 48 h. Después de la incubación con los fármacos se evaluó la viabilidad por el método de MTT. Los datos son la media +/- error estándar (n=6) de tres experimentos independientes. Los grupos marcados con símbolos distintos son significativamente diferentes (***) $p \leq 0.0001$ vs Control; # $p \leq 0.05$ vs CDDP, ### $p \leq 0.0001$ vs CDDP).

La viabilidad de las células HeLa al ser tratadas con AO o Met por 24 h disminuyó significativamente ($p < 0.0001$) a 52% y 57%, respectivamente (Fig. 19). En esta línea celular el CDDP, el AO y la Met sin combinar tuvieron efectos similares sobre la inhibición de la viabilidad a las 24 h (con 60%, 52% y 57% respectivamente) y 48 h (con 47%, 46% y 45%, respectivamente). El mayor efecto sobre la viabilidad se observó con los tratamientos CDDP-AO-Met y AO-Met. Los valores de viabilidad con ambos tratamientos fueron muy similares a las 24 h (CDDP-AO-Met: 27%; AO-Met: 25%) y 48 h (CDDP-AO-Met: 11%; AO-Met: 14%). A las 48 h, los tratamientos AO-CDDP (28%) y Met-CDDP (14%) mostraron un efecto de disminución de la viabilidad significativamente mayor ($p < 0.0001$) que el observado con el tratamiento de CDDP sin combinar (48%) (Fig. 20).

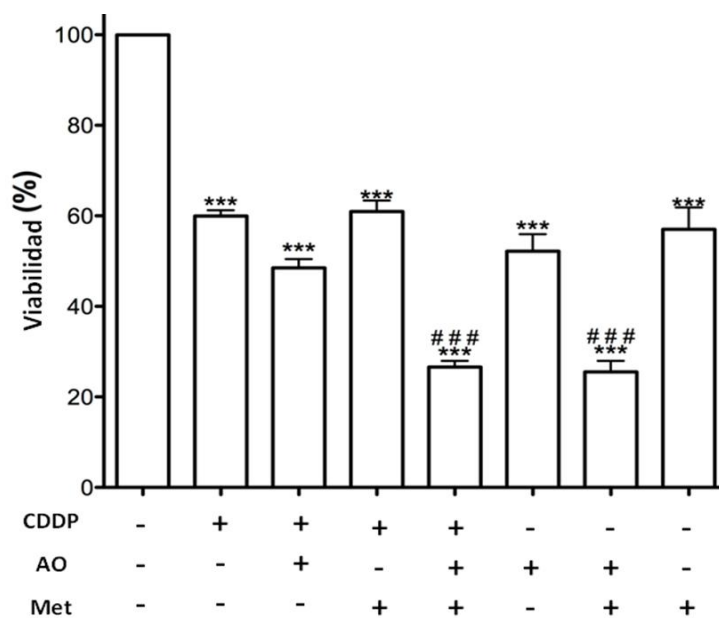


Fig. 19. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de células HeLa por 24 h. Se sembraron células HeLa en medio de cultivo suplementado con SFB al 10% en placas de 96 pozos por 24 h. Después de la siembra, las células fueron tratadas con ácido oxámico (AO) 10 mM, metformina (Met) 25 mM y cisplatino (CDDP) 5 μ M en medio de cultivo sin SFB por 24 h. Después de la incubación con los fármacos se evaluó la viabilidad por el método de MTT. Los datos son la media \pm error estándar (n=6) de tres experimentos independientes. Los grupos marcados con símbolos distintos son significativamente diferentes (***) $p \leq 0.0001$ vs Control; ### $p \leq 0.0001$ vs CDDP).

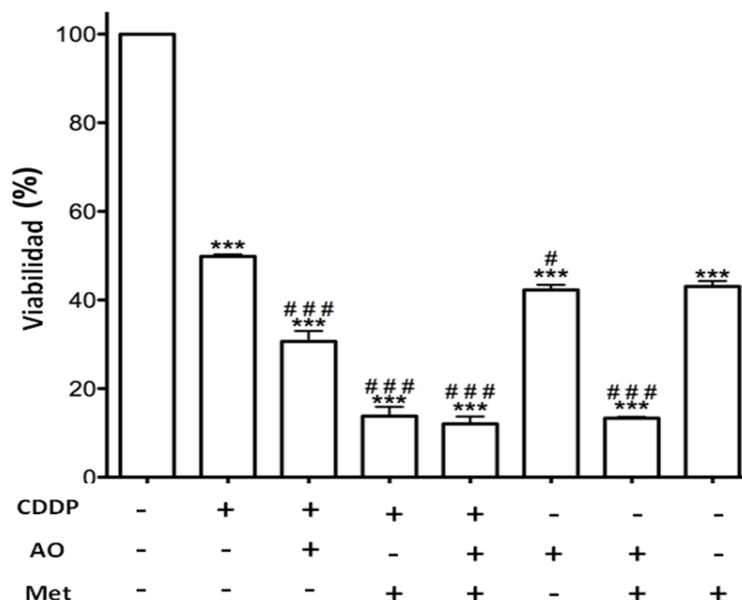


Fig. 20. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de células HeLa por 48 h. Se sembraron células HeLa en medio de cultivo suplementado con SFB al 10% en placas de 96 pozos por 24 h. Después de la siembra, las células fueron tratadas con ácido oxámico (AO) 10 mM, metformina (Met) 25 mM y cisplatino (CDDP) 5 μ M en medio de cultivo sin SFB por 48 h. Después de la incubación con los fármacos se evaluó la viabilidad por el método de MTT. Los datos son la media \pm error estándar (n=6) de tres experimentos independientes. Los grupos marcados con símbolos distintos son significativamente diferentes (***) $p \leq 0.0001$ vs Control; # $p \leq 0.05$ vs CDDP, ### $p \leq 0.0001$ vs CDDP).

6.2 Efecto de la Met y el AO en la viabilidad de células de cáncer pulmonar

Se evaluó el efecto del AO y la Met sobre la viabilidad en las líneas celulares de NSCLC: A549 y Calu-1. Las células fueron incubadas en medio con AO 10 mM, Met 25 mM, de manera independiente y en combinación con CDDP 5 uM.

La viabilidad de la línea celular A549, procedente de tejido de NSCLC, disminuyó de manera similar y significativa ($p < 0.05$) sólo con los tratamientos con CDDP-AO-Met y AO-Met, al 74% (Fig. 21). Sin embargo, a las 48 h todos los tratamientos tuvieron efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la inhibición de la viabilidad (Fig. 22). En las células tratadas con AO y la Met sin combinar se observaron efectos similares a las que se incubaron con CDDP sin combinar, a las 48 h y 72 h. El mayor efecto sobre la inhibición de la viabilidad se observó con los tratamientos Met-CDDP (41%), CDDP-AO-Met (38%) y AO-Met (37%) a las 48 h. Sin embargo, a las 72 h el mayor efecto se observó con las combinaciones Met-CDDP (17%) y CDDP-Met-AO (11%) (Fig. 23).

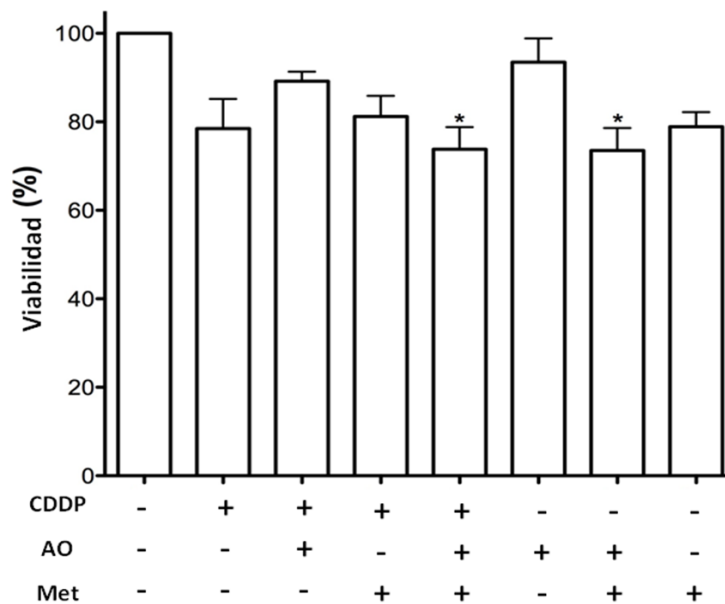


Fig. 21. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de células A549 por 24 h. Se sembraron células A549 en medio de cultivo suplementado con SFB al 10% en placas de 96 pozos por 24 h. Después de la siembra, las células fueron tratadas con ácido oxámico (AO) 10 mM, metformina (Met) 25 mM y cisplatino (CDDP) 5 uM en medio de cultivo sin SFB por 24 h. Después de la incubación con los fármacos se evaluó la viabilidad por el método de MTT. Los datos son la media \pm error estándar ($n=6$) de tres experimentos independientes. Los grupos marcados con símbolos distintos son significativamente diferentes ($*p < 0.05$).

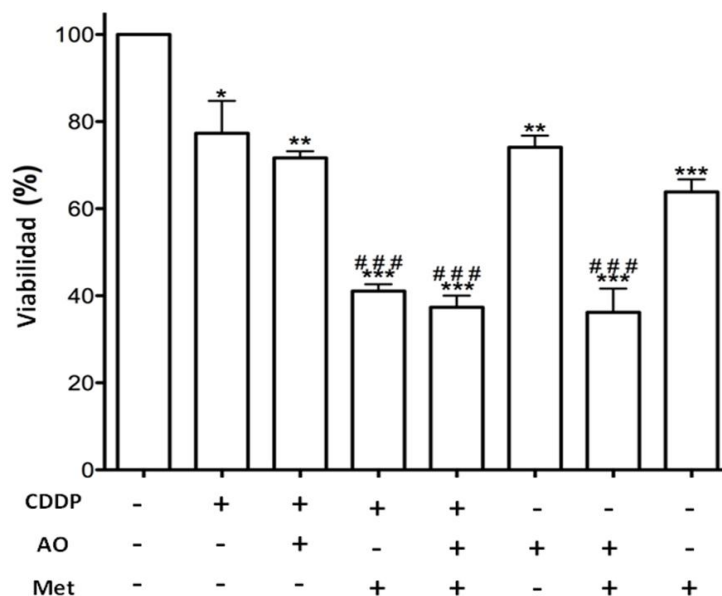


Fig. 22. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de células A549 por 48 h. Se sembraron células A549 en medio de cultivo suplementado con SFB al 10% en placas de 96 pozos por 24 h. Después de la siembra, las células fueron tratadas con ácido oxámico (AO) 10 mM, metformina (Met) 25 mM y cisplatino (CDDP) 5 uM en medio de cultivo sin SFB por 48 h. Después de la incubación con los fármacos se evaluó la viabilidad por el método de MTT. Los datos son la media +/- error estándar (n=6) de tres experimentos independientes. Los grupos marcados con símbolos distintos son significativamente diferentes (*p<0.05 vs Control, ** p<0.001 vs Control, *** p<0.0001 vs Control; ### p<0.0001 vs CDDP).

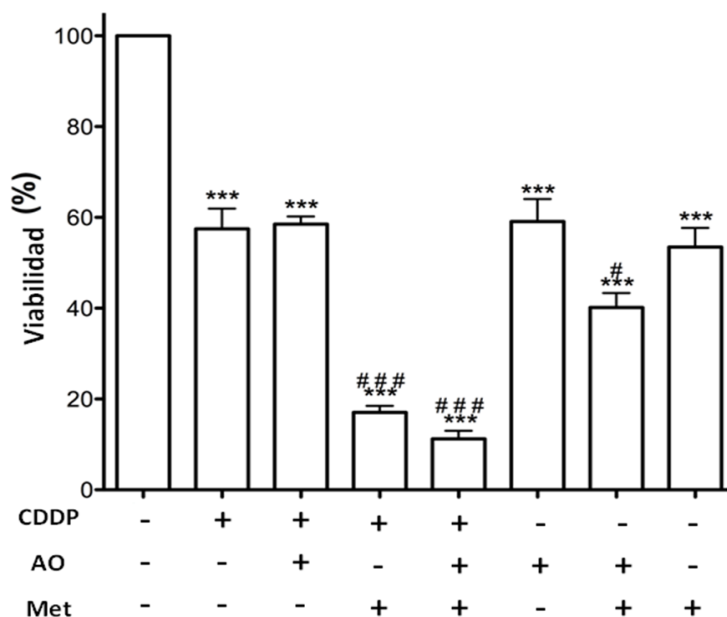


Fig. 23. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de células A549 por 72 h. Se sembraron células A549 en medio de cultivo suplementado con SFB al 10% en placas de 96 pozos por 24 h. Después de la siembra, las células fueron tratadas con ácido oxámico (AO) 10 mM, metformina (Met) 25 mM y cisplatino (CDDP) 5 uM en medio de cultivo sin SFB por 72 h. Después de la incubación con los fármacos se evaluó la viabilidad por el método de MTT. Los datos son la media +/- error estándar (n=6) de tres experimentos independientes. Los grupos marcados con símbolos distintos son significativamente diferentes (***) p<0.0001 vs Control; # p<0.05 vs CDDP, ### p<0.0001 vs CDDP).

La viabilidad de las células Calu-1 al ser tratadas con AO o Met, solos y en combinación, por 24 h disminuyó de manera significativa ($p \leq 0.0001$) (Fig. 24). La reducción de la viabilidad celular fue significativamente superior ($p < 0.001$) a la observada con el tratamiento con CDDP (97%). En esta línea celular, el mayor efecto sobre la viabilidad se observó con el tratamiento CDDP-AO-Met a las 48 h (34%) y 72 h (28%). Los tratamientos AO-CDDP y Met-CDDP no tuvieron un efecto mayor sobre la viabilidad celular que aquellos con AO o Met sin combinar a las 24 h y 48 h (Fig. 24 y 25). Sin embargo, a las 72 h el tratamiento Met-CDDP disminuyó la viabilidad a 36%, en comparación con 55% con la Met sin combinar (Fig. 26).

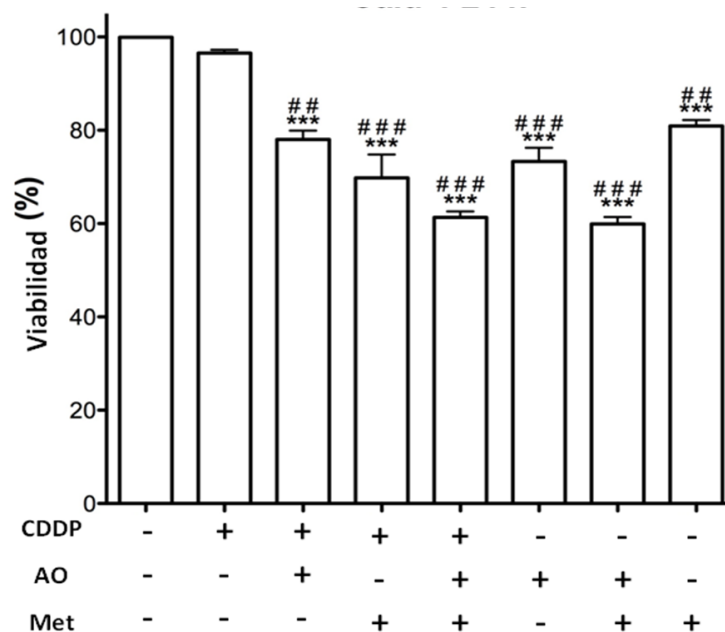


Fig. 24. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de células Calu-1 por 24 h. Se sembraron células Calu-1 en medio de cultivo suplementado con SFB al 10% en placas de 96 pozos por 24 h. Después de la siembra, las células fueron tratadas con ácido oxámico (AO) 10 mM, metformina (Met) 25 mM y cisplatino (CDDP) 5 uM en medio de cultivo sin SFB por 24 h. Después de la incubación con los fármacos se evaluó la viabilidad por el método de MTT. Los datos son la media +/- error estándar (n=6) de tres experimentos independientes. Los grupos marcados con símbolos distintos son significativamente diferentes (***) $p < 0.0001$ vs Control; ## $p < 0.001$ vs CDDP, ### $p < 0.0001$ vs CDDP).

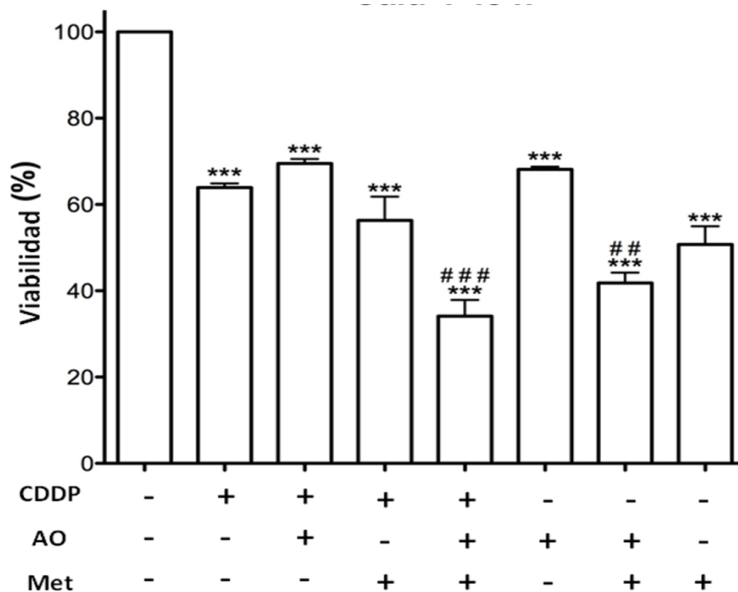


Fig. 25. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de células Calu-1 por 48 h. Se sembraron células Calu-1 en medio de cultivo suplementado con SFB al 10% en placas de 96 pozos por 24 h. Después de la siembra, las células fueron tratadas con ácido oxámico (AO) 10 mM, metformina (Met) 25 mM y cisplatino (CDDP) 5 uM en medio de cultivo sin SFB por 48 h. Después de la incubación con los fármacos se evaluó la viabilidad por el método de MTT. Los datos son la media +/- error estándar (n=6) de tres experimentos independientes. Los grupos marcados con símbolos distintos son significativamente diferentes (***) $p < 0.0001$ vs Control; ## $p < 0.001$ vs CDDP, ### $p < 0.0001$ vs CDDP).

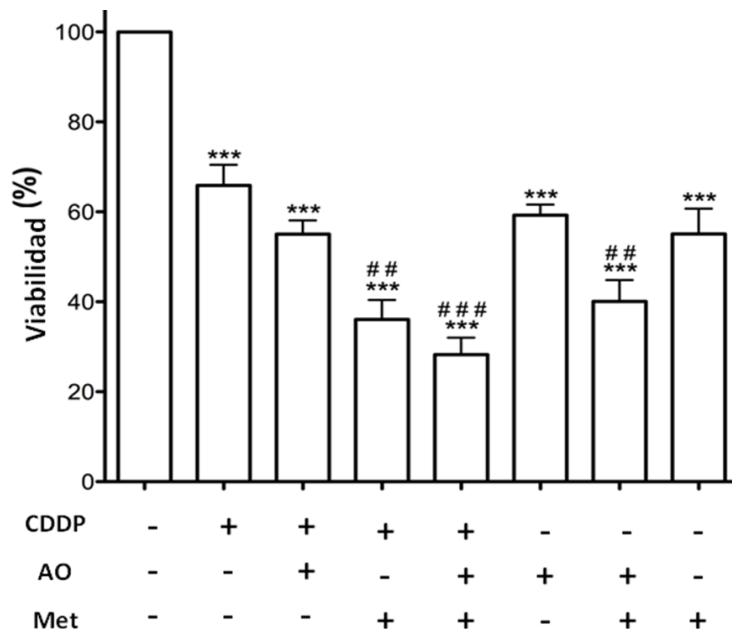


Fig. 26. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de células Calu-1 por 72 h. Se sembraron células Calu-1 en medio de cultivo suplementado con SFB al 10% en placas de 96 pozos por 24 h. Después de la siembra, las células fueron tratadas con ácido oxámico (AO) 10 mM, metformina (Met) 25 mM y cisplatino (CDDP) 5 uM en medio de cultivo sin SFB por 72 h. Después de la incubación con los fármacos se evaluó la viabilidad por el método de MTT. Los datos son la media +/- error estándar (n=6) de tres experimentos independientes. Los grupos marcados con símbolos distintos son significativamente diferentes (***) $p < 0.0001$ vs Control; ## $p < 0.001$ vs CDDP, ### $p < 0.0001$ vs CDDP).

Las líneas celulares procedentes de CaCu (Caski, C-33A y HeLa) mostraron una mayor sensibilidad al tratamiento con CDDP-AO-Met a la observada en las células A549, a las 24 h. Sin embargo, Caski y HeLa mostraron una inhibición de su viabilidad con este tratamiento significativamente mayor ($p < 0.001$) que las células Calu-1. La línea celular A549, mostró menor sensibilidad al tratamiento con CDDP-AO-Met a las 24 h (Fig. 27). Adicionalmente, se observó que las líneas celulares C-33A y HeLa tuvieron una mayor inhibición de su viabilidad con el tratamiento CDDP-AO-Met que el observado en las líneas de NSCLC a las 48 h. Sin embargo, Caski, Calu-1 y A549 tuvieron un efecto sobre su viabilidad de manera similar con este tratamiento (Fig 28).

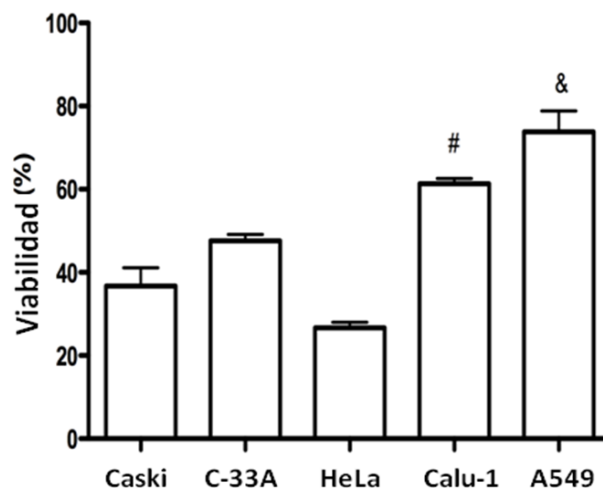


Fig. 27. Efecto del CDDP-AO-Met sobre la viabilidad de las líneas celulares Caski, C-33A, HeLa, Calu-1 y A549 a las 24 h. Los grupos marcados con símbolos distintos son significativamente diferentes (# $p < 0.001$ vs Caski/ HeLa, & $p < 0.001$ vs Caski/ C33A/ HeLa).

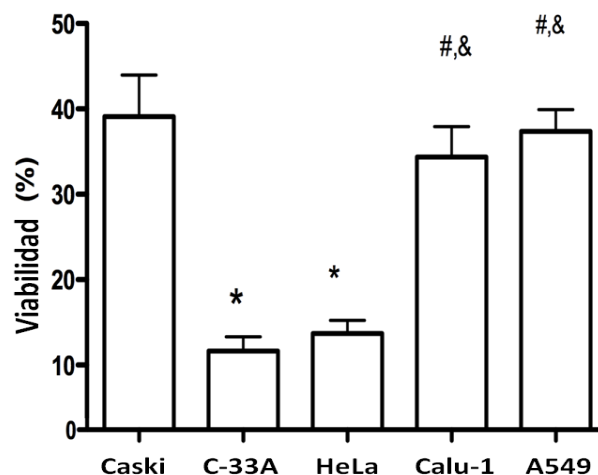


Fig. 28. Efecto del CDDP-AO-Met sobre la viabilidad de las líneas celulares Caski, C-33A, HeLa, Calu-1 y A549 a las 48 h. Los grupos marcados con símbolos distintos son significativamente diferentes (* $p < 0.001$ vs Caski; # $p < 0.01$ vs C-33A, & $p < 0.01$ vs HeLa).

Por otra parte, se observó que el tratamiento con CDDP-AO-Met en la línea celular A549 a las 72 h tuvo un efecto sobre la viabilidad significativamente mayor ($p < 0.001$) que el observado en las células Calu-1 (Fig. 29).

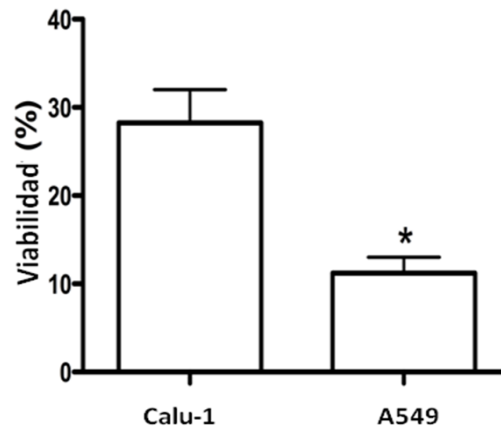


Fig. 29. Efecto del CDDP-AO-Met sobre la viabilidad de las líneas celulares Calu-1 y A549 a las 72 h. El símbolo marcado en cada grupo indica diferencia significativa (* $p < 0.001$ vs Calu-1).

6.3 Efecto de la Met y el AO en la viabilidad de linfocitos

Se evaluó el efecto del AO, la Met y la combinación AO-Met sobre la viabilidad de linfocitos de donadores clínicamente asintomáticos a las mismas concentraciones usadas en las líneas celulares. Se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) de la viabilidad con Met (77%) y AO-Met (71%) a las 24 h (Fig. 30). Sin embargo, el efecto sobre la inhibición de la viabilidad de los linfocitos a las 48 h aumentó significativamente con Met sin combinar ($p < 0.001$), AO sin combinar y con Met-AO ($p < 0.0001$) (Fig. 31). Se observó una viabilidad del 64% con AO, 61% con Met y 48% con AO-Met.

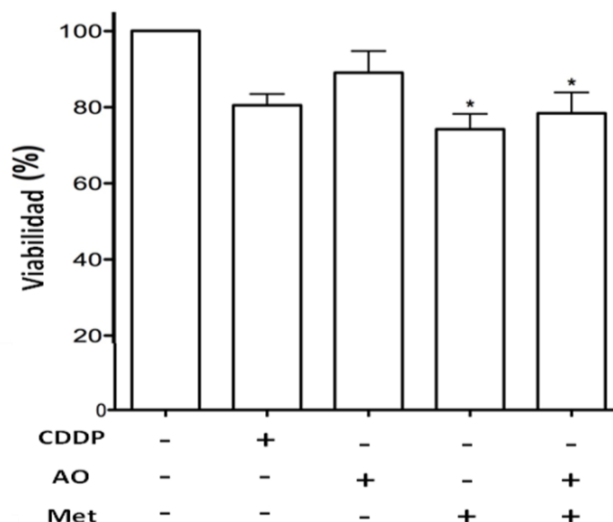


Fig. 30. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de linfocitos por 24 h. Se sembraron linfocitos en medio de cultivo suplementado con SFB al 10% en placas de 96 pozos por 24 h. Después de la siembra, las células fueron tratadas con ácido oxámico (AO) 10 mM, metformina (Met) 25 mM y cisplatino (CDDP) 0.2 uM en medio de cultivo sin SFB por 24 h. Después de la incubación con los fármacos se evaluó la viabilidad por el método de MTT. Los datos son la media +/- error estándar (n=3) de tres experimentos independientes. El símbolo marcado en cada grupo indica diferencia significativa (* p<0.05).

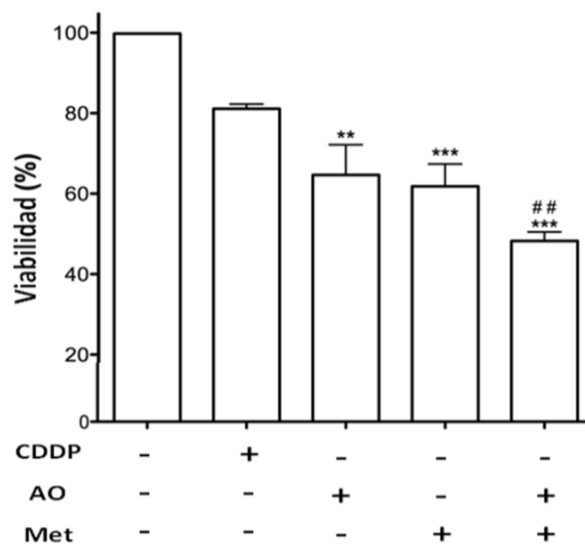


Fig. 31. Efecto del AO y la Met sobre la viabilidad de linfocitos por 48 h. Se sembraron linfocitos en medio de cultivo suplementado con SFB al 10% en placas de 96 pozos por 24 h. Después de la siembra, las células fueron tratadas con ácido oxámico (AO) 10 mM, metformina (Met) 25 mM y cisplatino (CDDP) 0.2 uM en medio de cultivo sin SFB por 48 h. Después de la incubación con los fármacos se evaluó la viabilidad por el método de MTT. Los datos son la media +/- error estándar (n=3) de tres experimentos independientes. Los grupos marcados con símbolos distintos son significativamente diferentes (**p<0.001 vs Control, *** p<0.0001 vs Control; ## p<0.001 vs CDDP).

Por otra parte, se trataron linfocitos con diferentes concentraciones de AO para evaluar su efecto citotóxico en células normales. El AO a 5 mM, concentración inferior a la usada en los ensayos con las líneas celulares tumorales (10 mM), no mostró efecto sobre la viabilidad de los linfocitos a las 24 h (Fig. 32). Sin embargo, a concentraciones superiores, el efecto del AO aumentó con el tiempo. Se observó un descenso de la viabilidad de manera drástica y similar a las 24 h (25 mM: 14%; 50 mM y 100 mM: 13%) (Fig. 32) y 48 h (25 mM: 19%; 50 mM 18% y 100 mM: 17%) (Fig. 33).

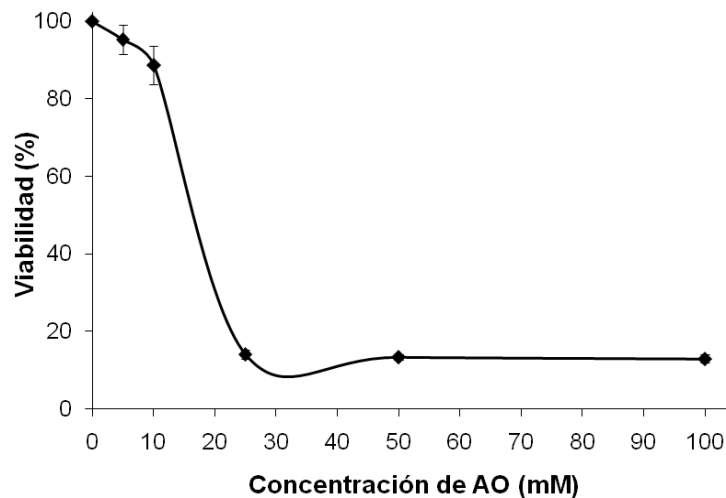


Fig. 32. Efecto del AO a diferentes concentraciones sobre la viabilidad de linfocitos por 24 h. Se sembraron linfocitos en medio de cultivo suplementado con SFB al 10% en placas de 96 pozos. Después de la siembra, las células fueron tratadas con ácido oxámico a 5, 10, 25, 50 y 100 mM en medio de cultivo sin SFB por 24 h. Después de la incubación con los fármacos se evaluó la viabilidad por el método de MTT. Los datos son la media +/- error estándar (n=3) de tres experimentos independientes.

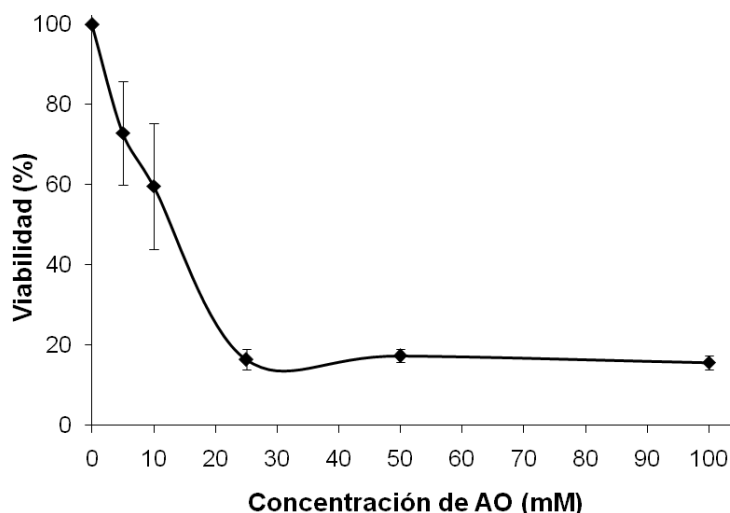


Fig. 33. Efecto del AO a diferentes concentraciones sobre la viabilidad de linfocitos por 48 h. Se sembraron linfocitos en medio de cultivo suplementado con SFB al 10% en placas de 96 pozos. Después de la siembra, las células fueron tratadas con ácido oxámico a 5, 10, 25, 50 y 100 mM en medio de cultivo sin SFB por 48 h. Después de la incubación con los fármacos se evaluó la viabilidad por el método de MTT. Los datos son la media +/- error estándar (n=3) de tres experimentos independientes.

De igual manera, se trataron linfocitos con diferentes concentraciones de Met para evaluar su citotoxicidad. La Met a concentraciones inferiores a 25 mM mostró un efecto sobre la viabilidad de los linfocitos inferior al 15% a las 24 h (Fig. 34). Se observó una viabilidad similar a las concentraciones de 5 mM (86%) y 10 mM (87%). A estas concentraciones el efecto de la Met no aumentó con el tiempo. Sin embargo, a concentraciones iguales o superiores a las usadas en las líneas celulares a las 48 h, tuvieron un mayor efecto de inhibición de la viabilidad de los linfocitos (25 mM: 57%; 50 mM: 35%; 100 mM: 24% (Fig. 35).

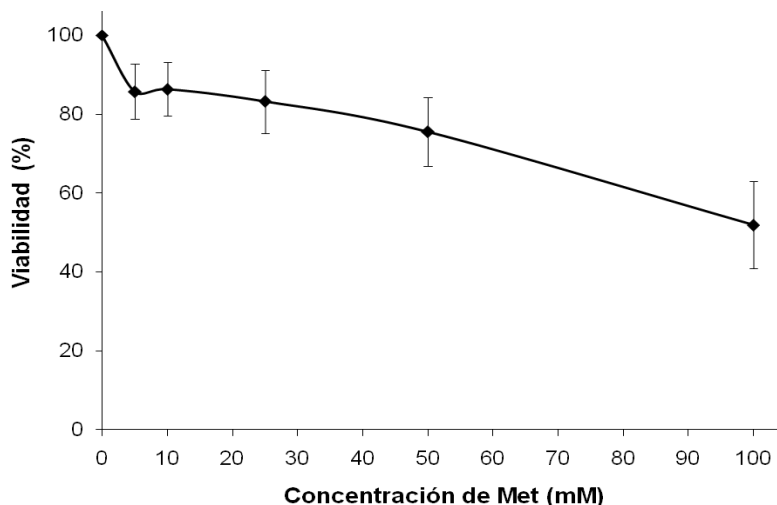


Fig. 34. Efecto de la Met a diferentes concentraciones sobre la viabilidad de linfocitos por 24 h. Se sembraron linfocitos en medio de cultivo suplementado con SFB al 10% en placas de 96 pozos. Después de la siembra, las células fueron tratadas con metformina a 5, 10, 25, 50 y 100 mM en medio de cultivo sin SFB por 24 h. Después de la incubación con los fármacos se evaluó la viabilidad por el método de MTT. Los datos son la media +/- error estándar (n=3) de tres experimentos independientes.

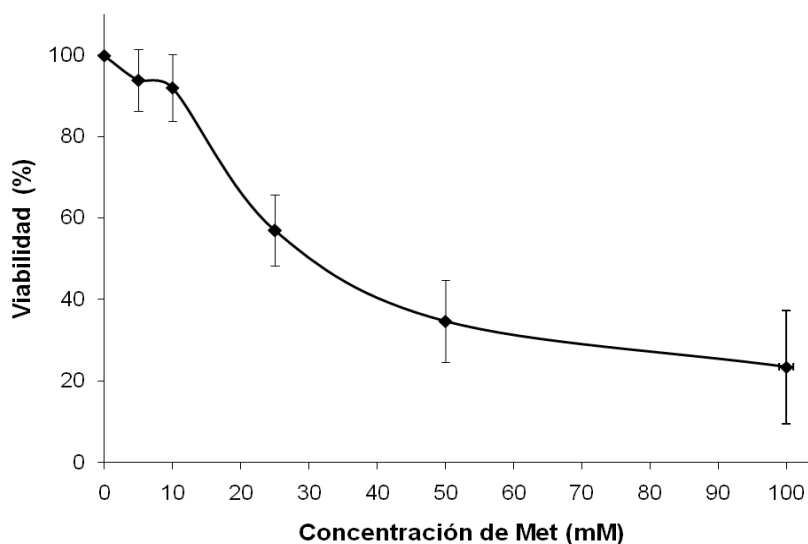


Fig. 35. Efecto de la Met a diferentes concentraciones sobre la viabilidad de linfocitos por 48 h. Se sembraron linfocitos en medio de cultivo suplementado con SFB al 10% en placas de 96 pozos. Después de la siembra, las células fueron tratadas con metformina a 5, 10, 25, 50 y 100 mM en medio de cultivo sin SFB por 48 h. Después de la incubación con los fármacos se evaluó la viabilidad por el método de MTT. Los datos son la media +/- error estándar (n=3) de tres experimentos independientes.

7. DISCUSIÓN

Investigaciones enfocadas en el metabolismo y vías de señalización de las células tumorales han fortalecido una nueva perspectiva para el tratamiento contra el cáncer, a través de la inhibición del metabolismo energético, en combinación con el bloqueo de vías de señalización fundamentales para la viabilidad y proliferación de la célula tumoral. Este enfoque tiene dos ventajas relevantes respecto a otras perspectivas terapéuticas: es más específico, ya que las células tumorales tienen más sensibilidad a los inhibidores metabólicos que las células normales (Moreno-Sánchez *et al.*, 2007), y al ser combinada con otros agentes antitumorales podría aumentar la eficacia del tratamiento convencional (Kroemer y Pouyssegur, 2008).

En el presente estudio se determinó el efecto del ácido oxámico y la metformina sobre la viabilidad de líneas celulares procedentes de cáncer cervical y de NSCLC. La viabilidad celular fue determinada por el método MTT, el cual es un método colorimétrico que mide cuantitativamente la actividad metabólica de la enzima succinato deshidrogenasa de las células viables. El MTT, compuesto de color amarillo e hidrofóbico, es reducido en las células viables por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa a su forma insoluble llamada formazán, de color azul oscuro (Slater *et al.*, 1963; Mosmann, 1983).

Trabajos previos, hechos *in vitro* e *in vivo*, han demostrado el efecto inhibitor del AO sobre la viabilidad de células neoplásicas (Novoa *et al.*, 1959; Papaconstantinou y Colowick, 1961a; Papaconstantinou y Colowick, 1961b; Thornburg *et al.*, 2008). A este respecto, se ha descrito que el AO inhibe la glucólisis mediante el bloqueo de la actividad de la LDH-A (Hakala *et al.*, 1953; Novoa *et al.*, 1959). Esta enzima se considera como fundamental en la célula tumoral para el mantenimiento del elevado flujo de la vía glucolítica (Warburg *et al.*, 1956; Burgner y Ray, 1984). Lo anterior debido a que la glucólisis sólo puede ser sostenida con la regeneración de la coenzima NAD⁺ (Warburg, 1956). Las células tumorales regeneran NAD⁺ principalmente mediante la conversión de piruvato en lactato, aún en condiciones adecuadas de oxígeno (o normoxia), hecho que es facilitado por la sobre-expresión de la LDH-A (Semenza *et al.*,

1996; Bauer *et al.*, 2004; Moreno-Sánchez *et al.*, 2007). De esta manera, se incrementa la producción de lactato, el cual es liberado activamente al medio extracelular a través de los transportadores de monocarboxilatos, específicamente en su isoforma 4 (MCT4), hecho que contribuye al equilibrio del pH intracelular (Brizel *et al.*, 2001; Feron, 2009). En consecuencia, la sobre-expresión de esta enzima glucolítica se ha descrito como causante de la acumulación de lactato en el medio extracelular, induciendo así la acidificación del microambiente alrededor de la célula cancerosa (Brizel *et al.*, 2001; Gillies, 2001). Este fenómeno se ha estudiado en modelos tumorales *in vivo*, en donde se ha observado que facilita la invasividad, la metástasis y la angiogénesis, a través de la destrucción de las poblaciones celulares adyacentes normales, como consecuencia de la degradación de su membrana extracelular (Lu *et al.*, 2002; Semenza, 2008). De esta manera la LDH-A ha sido frecuentemente asociada en la clínica con el crecimiento tumoral, la invasividad, la metástasis y a un pronóstico pobre en diferentes neoplasias (Gillies, 2001; Fantin *et al.*, 2006; Koukourakis *et al.*, 2009; Zhuang *et al.*, 2010). Asimismo, existen reportes que han demostrado que la inhibición de la LDH-A origina retraso en el crecimiento celular y deterioro de la viabilidad de las células cancerosas (Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2006; Fantin *et al.*, 2006; Xie y *et al.*, 2009). Estos hallazgos son consistentes con los resultados reportados en este estudio, ya que el ácido oxámico mostró un efecto inhibitorio sobre la viabilidad de las células Caski, C-33A, HeLa, A549 y Calu-1. De esta manera, la enzima LDH-A es considerada como un blanco farmacológico de interés en la terapia antitumoral (Xie *et al.*, 2009; Le *et al.*, 2010).

Por otra parte, la metformina, hipoglucemiante oral ampliamente usado en el tratamiento de la diabetes tipo II, se ha descrito como un fármaco con actividad antitumoral (Evans *et al.*, 2005; Buzzai *et al.*, 2007; Jiralerspong *et al.*, 2009). Estudios epidemiológicos han confirmado que esta biguanida, reduce significativamente la incidencia del cáncer y mejora la supervivencia del paciente diabético (Evans *et al.*, 2005; Libby *et al.*, 2009; Landman *et al.*, 2010). Actualmente es usada en estudios en fase clínica para el tratamiento del cáncer de mama (Cazzaniga *et al.*, 2009; Jiralerspong *et al.*, 2009). Su mecanismo de acción contra las células tumorales no ha

sido esclarecido totalmente. Se ha sugerido que la capacidad de la Met para suprimir el crecimiento de las células tumorales, *in vivo* e *in vitro*, se debe a: 1) la activación de la cinasa AMPK (Zhou *et al.*, 2001; Zakikhani *et al.*, 2006), 2) la inducción del arresto del ciclo celular (Zhuang y Miskimins, 2008; Alimova *et al.*, 2009), 3) inducción de apoptosis (Isakovic *et al.*, 2007; Yasmeen *et al.*, 2011), 4) la inhibición de síntesis de proteínas (Vazquez-Martin *et al.*, 2009a), 5) reducción de los niveles de insulina circulante (DeFronzo y Goodman, 1995), y 6) la eliminación de las células pluripotenciales tumorales (Hirsch *et al.*, 2009). Sin embargo, estos posibles mecanismos convergen en un efector común, la inhibición de la vía mTOR. Esta vía de señalización es compleja y ha sido ampliamente descrita reguladora central de la síntesis de proteínas, la biogénesis de los ribosomas, la transcripción de genes, la autofagia, la diferenciación, la proliferación y la supervivencia celular, la motilidad de las células tumorales y metástasis del cáncer (Shaw *et al.*, 2006; Guertin y Sabatini, 2007; Zhou y Huang, 2010; Ji y Zheng, 2010). La cinasa mTOR ha sido descrita como hiperactivada en la mayoría de los tumores malignos humanos y en las líneas celulares derivadas de ellos, lo cual les confiere una ventaja proliferativa (Rao *et al.*, 2004). Diversas investigaciones han demostrado que mTOR es inhibida en respuesta a estrés energético, a través de mecanismos mediados por AMPK (Inoki *et al.*, 2003; Harris y Lawrence, 2003; Hardie, 2008); por la acción de fármacos inhibidores como la Rapamicina (Dowling *et al.*, 2007; Sancak *et al.*, 2007; Vander *et al.*, 2007); o por el bloqueo de la actividad del complejo de Rag-GTPasas (Manning, 2004; Guertin y Sabatini, 2007). De esta manera, dentro de los posibles mecanismos de acción de la Met en las células cancerosas, el más aceptado ha sido el de la activación de AMPK dependiente de LKB1 (Harris y Lawrence, 2003; Gwinn *et al.*, 2008). El supresor tumoral LKB1 es activado por esta biguanida induciendo así la fosforilación y activación de la AMPK (Sanchez-Cespedes, 2007). Esto provoca la estimulación del complejo TSC1/TSC2, induciendo la unión de GDP-Rheb al complejo mTORC1, la cual bloquea la actividad de subunidad catalítica mTOR (Inoki *et al.*, 2003; Hardie, 2008). Por otra parte, existe evidencia que sugiere otro posible mecanismo de la Met independiente de TSC1/TSC2, que consiste en la fosforilación directa de Raptor, componente de mTORC1, mediada por AMPK, causando la inhibición del complejo mTORC1 (Gwinn *et al.*, 2008). Adicionalmente,

existen hallazgos que demuestran un mecanismo de acción alternativo de la Met, independiente de LKB1 y AMPK, el cual consiste en la supresión de la señalización de mTOR por la inhibición del complejo de las Rag GTPasas (Kalender *et al.*, 2010). Este hallazgo es consistente con los resultados reportados en este estudio, ya que en nuestros ensayos la Met mostró un efecto inhibitorio sobre la viabilidad de las células HeLa y A549, previamente descritas como deficientes del gen LKB1 (Sanchez-Cespedes *et al.*, 2007; Wingo *et al.*, 2009). LKB1 es un supresor tumoral, que actúa como regulador negativo de la vía mTOR, ya que activa mediante una fosforilación a AMPK. En consecuencia, la pérdida de su función favorece la actividad de mTOR (Tainen *et al.*, 1999; Neshat *et al.*, 2001).

Se determinó que el ácido oxámico o la metformina, en combinación con CDDP incrementan el efecto inhibitorio de este agente quimioterapéutico en las líneas celulares Caski, C-33A, HeLa, A549 y Calu-1, mejorando así su eficacia. Estos resultados son consistentes con los reportes que han descrito al AO y la Met, de manera independiente, como agentes que sensibilizan a las células resistentes a fármacos quimioterapéuticos (Heo *et al.*, 2008; Hirsch *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010).

Adicionalmente, en este trabajo se determinó que las incubaciones realizadas con CDDP-AO-Met y AO-Met causaron la mayor inhibición de la viabilidad y que ambos tratamientos tuvieron valores similares de inhibición en las líneas celulares de CaCu y en las líneas celulares de NSCLC. Esto sugiere que, en estas condiciones experimentales, el CDDP no contribuye en la inhibición de la viabilidad celular. Este resultado se debe posiblemente a que el CDDP y la Met comparten el transportador que los internaliza a la célula, el OCT2, lo cual sugiere que existe una posible competencia entre ambos fármacos por este transportador. El CDDP y la Met tienen elevada afinidad por el OCT2 (Yonezawa *et al.*, 2005; Ciarimboli, 2011). Sin embargo, la Met también tiene gran afinidad por el transportador OCT1 (Choi y Song, 2008), mientras que el CDDP presenta baja afinidad por dicho transportador (Ciarimboli *et al.*, 2005). En este trabajo la concentración de Met fue cuatro órdenes de magnitud superior a la del CDDP, lo cual favorecería la entrada preferencial de la biguanida a la célula, minimizando la

contribución del CDDP en la inhibición de la viabilidad celular. Sin embargo, esto no es consistente con lo que se observó en las líneas celulares HeLa y A549 tratadas con Met-CDDP, condiciones que tuvieron un mayor efecto inhibitorio que con el tratamiento Met sin combinar (Fig. 20, Fig. 22, Fig. 23). Por otra parte, el AO se internaliza a la célula, de manera independiente a estos dos fármacos a través de los transportadores de monocarboxilatos, con una mayor afinidad por la isoforma 1 (MCT1) (Carpenter y Halestrap, 1994). Estos transportadores se expresan en la membrana plasmática y mitocondrial de las células (Gladden, 2004).

También se determinó que las células de cáncer cérvico-uterino, Caski, HeLa y C-33A, ampliamente descritas con fenotipo invasivo (Riou *et al.*, 1990; Higgins *et al.*, 1991; Lorincz *et al.*, 1992), son más sensibles al ácido oxámico y la metformina que las células de cáncer de pulmón A549 y Calu-1. Este hallazgo es consistente con los reportes que indican que las líneas celulares más agresivas presentan una correlación entre su fenotipo invasivo y su capacidad glucolítica, debido a que las células tumorales invasivas presentan una mayor demanda de energía metabólica, y por lo tanto de glucosa (Winehouse, 1972; Gatenby *et al.*, 2004). De esta manera, es probable que factores genéticos y epigenéticos que incidan sobre la expresión de génica estén relacionados a las diferencias en la susceptibilidad entre estas líneas celulares.

Estos resultados sugieren un efecto sinérgico con la combinación del AO-Met, posiblemente como resultado de la inhibición de la glucólisis y la vía de mTOR, alterando el metabolismo de las células cancerosas. Por un lado al disminuir el flujo de energía glucolítica al inhibir LDH-A; y por otra parte al bloquear mTOR, inhibiendo así el crecimiento y proliferación de la célula tumoral (Rao *et al.* 2004; Dowling *et al.*, 2007; Memmott *et al.*, 2009; Wingo *et al.*, 2009; Kalender *et al.*, 2010; Le *et al.*, 2010). Asimismo, numerosas investigaciones han establecido que la elevada actividad y expresión de enzimas glucolíticas, como LDH-A, y de transportadores de glucosa, como GLUT1, son inducidas por c-Myc, oncoproteína cuya expresión es dependiente de la vía de mTOR (Barthel *et al.*, 1999; Osthus *et al.*, 2000; Semenza, 2003; Shaw, 2006). Por lo tanto, es posible que la inhibición de mTOR también origine una disminución de LDH-

A, además de otras enzimas glucolíticas y de transportadores de glucosa, afectando así a la vía glucolítica.

Adicionalmente, se determinó que el AO y la Met a las concentraciones usadas en las líneas tumorales, presentan un efecto inhibitor de la viabilidad de linfocitos de pacientes clínicamente asintomáticos. Sin embargo, bajo estas condiciones, dicha inhibición de la viabilidad fue menor a la observada en todas las líneas de células tumorales estudiadas en este trabajo. Este hecho, confirma la hipótesis planteada en este trabajo: la célula tumoral es más sensible a los fármacos que inhiben la producción de lactato y la síntesis de proteínas que las células no tumorales. Asimismo, cabe resaltar que la concentración de metformina (25 mM) que se empleó en este estudio fue supraterapéutica y se encuentra tres órdenes de magnitud por encima de las concentraciones plasmáticas registradas a partir de las dosis comúnmente usadas en pacientes diabéticos (10-50 uM) (Bristol-Myers Squibb, 2009; Martin-Castillo *et al.*, 2010). Por lo tanto, es importante considerar que las células en cultivo *in vitro* se desarrollan en condiciones de hiperglucemia, en un ambiente de nutrientes en cantidad excesiva, ya que los medios de cultivo contienen elevadas cantidades de glucosa, dando como resultado la estimulación del crecimiento celular. Por lo tanto, fueron necesarias concentraciones elevadas de Met y AO para evaluar sus efectos en las células tumorales. Sin embargo, a concentraciones inferiores a las utilizadas en las líneas tumorales, se observó baja citotoxicidad de ambos fármacos en los linfocitos. Este hallazgo es consistente con los reportes que han descrito a las células normales como menos sensibles a los inhibidores metabólicos y sugiere que el fenotipo tumoral puede ser blanco de estrategias terapéuticas dirigidas contra los cambios en el metabolismo de la célula maligna que no están presentes en la célula normal (Zu y Guppy, 2004; Moreno-Sánchez *et al.*, 2007).

8. CONCLUSIONES

- Los fármacos AO y Met inhiben la viabilidad de líneas celulares de cáncer cérvico-uterino y de cáncer de pulmón.
- El AO y la Met sensibilizan a las líneas celulares Caski, Calu-1 y A549 al efecto del CDDP.
- El AO y Met en combinación presentan un efecto sinérgico, el cual muestra una mayor inhibición de la viabilidad que el CDDP solo, en las líneas celulares Caski, C-33A, HeLa, A549 y Calu-1.
- En células derivadas de cáncer cérvico-uterino (Caski, C-33A y HeLa) el mayor efecto sobre la inhibición de la variabilidad se observó, en magnitud semejante, con el tratamiento CDDP-AO-Met y con AO-Met.
- En las células derivadas de cáncer de pulmón (Calu-1 y A549) el mayor efecto sobre la inhibición de la viabilidad se observó con el tratamiento de CDDP-AO-Met.
- Los tratamientos con AO y Met, solos y en combinación, aumentan su efecto inhibitor de la viabilidad al prolongar el tiempo de exposición.
- El AO y la Met disminuyeron la viabilidad de los linfocitos de donadores clínicamente asintomáticos, debido a las elevadas concentraciones usadas de ambos fármacos.
- El AO y Met causaron una mayor inhibición de la viabilidad en las líneas de células tumorales en comparación con la inhibición observada en los linfocitos, células no tumorales, ya que las células tumorales presentan una elevada dependencia por el metabolismo del lactato y de la sobre-activación de la vía mTOR.

9. PERSPECTIVAS

- Determinar las vías metabólicas y de señalización que específicamente son inhibidas en las células cancerosas por la acción conjunta del AO y la Met.
- El AO y la Met son una opción factible para realizar estudios *in vivo*, lo cual podría establecer las bases de protocolos de tratamiento en fase clínica dirigidos al establecimiento de un nuevo enfoque terapéutico contra el cáncer cervical y pulmonar.

10. REFERENCIAS

Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG. *Clinical Oncology*. 4th ed. Philadelphia, Pa: Churchill Livingstone Elsevier; 2008:chap 76.

Aguirre-Alvarado C, Zaragoza-Martinez F, Rodriguez-Paez, L. Tellez-Rendon, Noguera B., and Baeza et al., Trypanocidal activity of the ethyl ester of N-propyl and N-isopropyl oxamates on intracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* acute infected mice, *J Enzyme Inhib Med Chem* .2010;25;111–115.

Akca H, Demiray A, Tokgun O, Yokota J. Invasiveness and anchorage independent growth ability augmented by PTEN inactivation through the PI3K/AKT/NFκB pathway in lung cancer cells. *Lung Cancer*. 2011.

Alimova IN, Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Dillon T, Lind SE, et al. Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro. *Cell Cycle* 2009;8:909–15.

Algire C., Lilian Amrein, Mahvash Zakikhani, Lawrence Panasci and Michael Pollak: Metformin blocks the stimulative effect of a high-energy diet on colon carcinoma growth in vivo and is associated with reduced expression of fatty acid synthase. *Endocr Relat Cancer*. 2010; 351-60.

Altenberg B, Greulich KO. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics*. 2004; 84:1014-1020.

Anisimov VN, Berstein LM, Egormin PA, et al. Effect of metformin on life span and on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Exp Gerontol*. 2005;40:685–693.

Araki K, Turner AP, Shaffer VO, Gangappa S, Keller SA, Bachmann MF, Larsen CP, Ahmed R. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature*. 2009;460(7251):108-12.

- Bagnardi V, Randi G, Lubin J, Consonni D, Lam TK, et al. Alcohol consumption and lung cancer risk in the Environment and Genetics in Lung Cancer Etiology (EAGLE) study. *Am J Epidemiol.* 2010;171(1):36-44.
- Bailey CJ, Day C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care.* 1989;12(8):553-64.
- Bauer DE, Harris MH, Plas DR, et al. Cytokine stimulation of aerobic glycolysis in hematopoietic cells exceeds proliferative demand. *FASEB J.* 2004;18(11):1303–1305.
- Bell DW, Gore I, Okimoto RA, et al. Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR. *Nat Genet* 2005; 37:1315-6.
- Ben Sahra I, Laurent K, Loubat A, Giorgetti-Peraldi S, Colosetti P, et al. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene.* 2008;27(25):3576-86.
- Bernardi R, Guernah I, Jin D, Grisendi S, Alimonti A, Teruya-Feldstein J, Cordon-Cardo C, Simon MC, Rafii S, Pandolfi PP. PML inhibits HIF-1alpha translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature.* 2006;442(7104):779-85.
- Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4:335–48.
- Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J. Prevalence of Human Papillomavirus in Cervical Cancer: A Worldwide Perspective. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87(11):796–802.
- Bristol-Myers Squibb. Glucophage® package insert Princeton. 2009. Disponible en: http://packageinserts.bms.com/pi/pi_glucophage.pdf. Diciembre 29, 2010.

- Brizel DM, Schroeder T, Scher RL, et al. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in headand-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51:349–53.
- Budavari S . *The Merck index, an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*, 11th ed. Rahway, New Jersey, Merck and Co., Inc. 1989. p 361.
- Burgner JW 2nd, Ray WJ Jr. On the origin of the lactate dehydrogenase induced rate effect. *Biochemistry*. 1984. 23(16):3636-48.
- Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, Snyder SH, Sabatini DM. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 1432–1437.
- Buzzai M, Jones RG, Amaravadi RK *et al*. Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. *Cancer Res* 2007; 67:6745–52.
- Carbone D. Smoking and cancer. *Am J Med*. 1992; 93(1A):13S-17S.
- Carpenter L, Halestrap AP. The kinetics, substrate and inhibitor specificity of the lactate transporter of Ehrlich-Lette tumour cells studied with the intracellular pH indicator BCECF. *Biochem J*. 1994;304 (Pt 3):751-60.
- Cazzaniga M, Bonanni B, Guerrieri-Gonzaga A, Decensi A. Is it time to test metformin in breast cancer clinical trials?. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009; 1(3):701-5.
- Centers for Disease Control and Prevention. Genital HPV infection: CDC Fact Sheet. November 24, 2010. Available at: www.cdc.gov/STD/HPV/STDFact-HPV.htm.
- Ciaran B. J. Woodman, Stuart I. Collins and Lawrence S. Young. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature reviews* 2007;7:11-22.

- Chaney SG, Sancar A, Piulats JM, Jiménez L, García del Muro X, Villanueva A, Viñals F, Germà-Lluch JR. DNA repair: enzymatic mechanisms and relevance to drug response. *Cancer Inst.* 1996; 88(19):1346-60.
- Cheng, S., Schmidt-Grimminger, D. C., Murant, T., Broker, T. R. & Chow, L. T. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev.* 1995. **9**, 2335–2349.
- Chirino YI, Pedraza-Chaverri Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *J. Exp Toxicol Pathol.* 2009;61(3):223-42.
- Cho LC, Dowell JE, Garwood D, Spangler A, Choy H. Prophylactic cranial irradiation with combined modality therapy for patients with locally advanced non-small cell lung cancer. *Semin Oncol.* 2005;32(3):293-8.
- Choi SR, Beeler AB, Pradhan A, Watkins EB, Rimoldi JM, Tekwani B, Avery MA. Generation of oxamic acid libraries: antimalarials and inhibitors of Plasmodium falciparum lactate dehydrogenase. *J Comb Chem.* 2007; 9(2):292-300.
- Choi MK, Song IS. Organic Cation Transporters and their Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Consequences. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2008;23(4):243-53.
- Ciarimboli G, Ludwig T, Lang D, Pavenstadt H, Koepsell H, Piechota HJ, et al. Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *Am J Pathol* 2005; 167:1477-84.
- Clegg A, Scott DA, Sidhu M, Hewitson P, Waugh N. A rapid and systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of paclitaxel, docetaxel, gemcitabine and vinorelbine in non-small-cell lung cancer. *Health Technol Assess.* 2001;5(32):1-195.

- Clifford G, Smith J, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003; **88** 63–73.
- Clifford J. Bailey, Ph.D., M.R.C.Path., and Robert C. Turner, M.D. Metformin. *N Engl J Med*. 1996; pp. 574-79.
- Crino L, Scagliotti G, Marangolo M, et al. Cisplatin-gemcitabine combination in non-small cell lung cancer (NSCLC): a phase II study. *Prog Proc Am Soc Clin Oncol*. 1995;14:352.
- Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*. 2008;358(5):502-11.
- Crum CP, Abbott DW, Quade BJ. Cervical cancer screening: From the papanicolaou smear to the vaccine era. *Journal of Clinical Oncology*. 2003;21(10):224–230.
- Dandona P, Aljada A, Ghanim H, Mohanty P, Tripathy C, Hofmeyer D, Chaudhuri A. Increased plasma concentration of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and MIF mRNA in mononuclear cells in the obese and the suppressive action of metformin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(10):5043-7.
- Dang, C.V. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol. Cell. Biol*. 1999., 19, 1–11.
- Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F. The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol*. 2006;16(4):253-64.
- Deck LM, Royer RE, Chamblee BB, Hernandez VM, Malone RR, Torres JE, Hunsaker LA, Piper RC, Makler MT, Vander Jagt DL. Selective inhibitors of human lactate dehydrogenases and lactate dehydrogenase from the malaria parasite *Plasmodium falciparum* *J Med Chem*. 1998 Sep 24;41(20):3879-87.

- DeFronzo RA, Goodman AM. Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group. *N Engl J Med*. 1995; 333:541-9.
- de Villiers EM. Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1994;186:1-12.
- Devlin T. *Bioquímica*. Reverté. 1999; Vol 1. pp. 291.
- Dmitri Kirpichnikov, MD; Samy I. McFarlane, MD; and James R. Sowers, MD. Metformin: An Update. *Ann Intern Med* .2002; pp. 25-33.
- Dowling RJ, Zakikhani M, Fantus IG, Pollak M, Sonenberg N. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2007;67(22):10804-12.
- Dyson, N., Howley, P. M., Münger, K. & Harlow, E. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 1989; 243, 934–937.
- Elizondo S, Chena MA, Rodríguez-Páez L, Noguera B, Baeza I, Wong C. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* alpha-hydroxyacid dehydrogenase-isozyme II by N-isopropyl oxamate and its effect on intact epimastigotes. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2003; pp. 265-71.
- El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Averet N, Rigoulet M, Leverve X. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 2000; 275: 223–228.
- Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, et al. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* 2005; 330:1304–5.

- Fantin VR, St-Pierre J, Leder P: Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 2006, 9:425-434.
- Favilla V, Cimino S, Madonia M, Morgia G. New advances in clinical biomarkers in testis cancer. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2010;2:456-77.
- Fay JR, Steele V, Crowell JA. Energy homeostasis and cancer prevention: the AMP-activated protein kinase. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2009 Apr;2(4):301-9.
- Feron O. Pyruvate into lactate and back: From the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiotherapy and Oncology* 2009;92:329-333.
- Ferreira LM. Cancer metabolism: the Warburg effect today. *Exp Mol Pathol*. 2010;89(3):372-80.
- Fiume I. Effect of inhibition of lactic dehydrogenase by the action of oxamic acid on the development of Yoshida's ascites hepatoma *Boll Soc Ital Biol Sper*. 1959;35(5):236-40.
- Fiume L, Manerba M, Vettraino M, Di Stefano G. Impairment of aerobic glycolysis by inhibitors of lactic dehydrogenase hinders the growth of human hepatocellular carcinoma cell lines. *Pharmacology*. 2010;86(3):157-62.
- Florez J. *Farmacologia humana*. Elsevier. 2004; pp.962.
- Foretz M, Hébrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, Sakamoto K, Andreelli F, Viollet B. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest*. 2010;120(7):2355-69.
- Frattoni MG, Laimins LA. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:12398-402.

- Fagundes H, Perez CA, Grigsby PW, et al.: Distant metastases after irradiation alone in carcinoma of the uterine cervix. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 1992;24(2): 197-204.
- Ganapathy V, Thangaraju M, Prasad PD. Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacol Ther.* 2009;121(1):29-40.
- Garber K. Energy deregulation: licensing tumors to grow. *Science* 2006;312: 1158–1159.
- Garcia EY. Flumamine, a new synthetic analgesic and anti-flu drug. *J Philipp Med Assoc.* 1950; 26 (7): 287-93.
- Gatenby RA, Gawlinski ET, Gmitro AF, Kaylor B, Gillies RJ. Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer Res.* 2006 ;66(10):5216-23.
- Gatenby, R. A. Gillies, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer.* 2004;891–899.
- Gatenby RA, Gillies RJ. Glycolysis in cancer: a potential target for therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39: 1358–1366.
- Gillies RJ. The tumour microenvironment: causes and consequences of hypoxia and acidity. Introduction. *Novartis Found Symp* 2001;240:1–6.
- Gillies RJ, Robey I, Gatenby RA. Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers. *J Nucl Med* 2008;49(Suppl 2):24S–42S.
- Gladden LB. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *J Physiol.* 2004;558(Pt 1):5-30.
- GLOBOCAN 2008: cancer incidence and mortality worldwide. International Agency for Research on Cancer, 2010.

- Goldberg EB, Colowick SP. The role of glycolysis in the growth of tumour cells, III. Lactic dehydrogenase as the site of action of oxamate on the growth of cultured cells. *J Biol Chem.* 1965; pp. 2786-90.
- Goodman y Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica.* Mc Graw Hill. 1996; pp. 1173,1606.
- Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, et al., Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet.* 2011; 50 (2):81-98.
- Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell.* 2007; 12:9–22.
- Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell.* 2008; 30: 214–26.
- Halestrap A., Price NT. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochemical Journal* 1999;343:281–299.
- Hammond EC. et al. Smoking and cancer in the United States. *Prev. Med.* 1980;9:169-174.
- Hardie D.G. and Hawley S.A., AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited, *Bioessays.* 2001, pp. 1112–1119.
- Hardie DG . AMPK and Raptor: matching cell growth to energy supply. *Mol Cell.* 2008;30:263–5.
- Harris TE, Lawrence JC Jr. TOR signaling. *Sci STKE.* 2003;(212):r15.
- Hattori Y, Suzuki K, Hattori S, Kasai K. Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor κ B activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. *Hypertension* 2006; 47: 1183–1188.

- Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM. et al. Calmodulin-dependent protein kinase kinase- β is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.* 2005; 2: 9–19.
- Heo MY, Salama SA, Khatoon N, Al-Hendy A, Au WW. Abrogation of estrogen receptor signaling augments cytotoxicity of anticancer drugs on CaSki cervical cancer cells. *Anticancer Res.* 2008;28(4B):2181-7.
- Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med.* 2008;359(13):1367-80.
- Higgins GD, Davy M, Roder D, Uzelin DM, Phillips GE, Burrell CJ. Increased age and mortality associated with cervical carcinomas negative for human papillomavirus RNA. *Lancet.* 1991 Oct 12;338(8772):910-3.
- Hinke SA, Martens GA, Cai Y, Finsi J, Heimberg H, Pipeleers D, Van de Casteele M. Methyl succinate antagonises biguanide-induced AMPK-activation and death of pancreatic beta-cells through restoration of mitochondrial electron transfer. *J Pharmacol.* 2007;150(8):1031-43.
- Hirsch HA, Iliopoulos D, Tschlis PN, Struhl K. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer Res.* 2009;69(19):7507-11.
- Hospers GA, Mulder NH, De Vries EG. Mechanisms of cellular resistance to cisplatin. *Med Oncol Tumor Pharmacother.* 1988; 5 (3):145-51.
- Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 2008;134: 703–707.
- Huang J., Manning B.D. The TSC1–TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem. J.* 2008; 412:179-190.

- Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ, Abraham RT. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol.* 2002; 22(20):7004-14.
- Hwang ES, Nottoli T, Dimaio D. The HPV16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virology.* 1995;211:227-33.
- Hwang SJ, Cheng LS, Lozano G, Amos CI, Gu X, Strong LC. Lung cancer risk in germline p53 mutation carriers: association between an inherited cancer predisposition, cigarette smoking, and cancer risk. *Hum Genet.* 2003;113:238-43.
- Im SS, Monk BJ. New developments in the treatment of invasive cervical cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2002;29(4):659-72.
- Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* 2003 Aug 1;17(15):1829-34.
- Isakovic A, Harhaji L, Stevanovic D, Markovic Z, Sumarac-Dumanovic M, Starcevic V, Micic D, Trajkovic V: Dual antiglioma action of metformin: cell cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 2007, 64:1290-1302.
- Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: A review. *Br J Cancer.* 1993; 67:1171–1176.
- Isoda K, Young JL, Zirlik A, MacFarlane LA, Tsuboi N, Gerdes N, Schönbeck U, Libby P. Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB in human vascular wall cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 ;26(3):611-7.
- Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, recognition, and processing of cisplatin–DNA adducts. *Chem.* 1999; 99: 2467–98.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer Statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008; 58:71–96.

JHPIEGO. McIntosh N, Blumenthal P, Blouse A, eds. Cervical Cancer Prevention Guidelines for Low-resource Settings. Baltimore, MD (EE. UU.): JHPIEGO Corporation, 2000.

Ji J, Zheng PS. Activation of mTOR signaling pathway contributes to survival of cervical cancer cells. *Gynecol Oncol*. 2010 Apr;117(1):103-8.

Jiralerspong S, Palla SL, Giordano SH, et al. Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27:3297–302.

Johnson BE: Second lung cancers in patients after treatment for an initial lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(18):1335-45.

Hakala, M. T., Glaid, A. J., and Schwert, G. W. Kinetics and Specificity of Lactic Dehydrogenase. *Federation Proc*.1953;12:213.

Kalender A, Selvaraj A, Kim SY, Gulati P, Brûlé S, Viollet B, Kemp BE, Bardeesy N. Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab*. 2010;11(5):390-401.

Krawczyk E., Supryniewicz FA., Liu X. Dai H, Dan P., Hanover J., Schlegel J. Koilocytosis: *A Cooperative Interaction between the Human Papillomavirus E5 and E6 Oncoproteins*. *The American journal of pathology*. 2008;173(3): 682-688.

Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol*. 2008; 10(8): 935-45.

Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 2006; 3:177–85.

Kim YD, Park KG, Lee YS, Park YY, Kim DK, Nedumaran B, Jang WG, Cho WJ, Ha J, Lee IK, Lee CH, Choi HS Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through

AMP-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP. *Diabetes*. 2008; pp. 306-14.

Kennedy KM, Dewhirst MW. Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Future Oncol*. 2010.6(1):127-48.

Khoury H, Collin F, Bonnefont-Rousselot D, Legrand A, Jore D, Gardes-Albert M. Radical-induced oxidation of metformin. *Eur J Biochem* 2004; 271:4745–52.

Koepsell, H., Lips, K. and Volk, C.: Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res*. 2007;24(7): 1227–51.

Koss LG, Durfee GR. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. *Ann N Y Acad Sci*. 1956;63(6):1245-61.

Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Winter S, Leek R, Sivridis E, Harris AL. Lactate dehydrogenase 5 expression in squamous cell head and neck cancer relates to prognosis following radical or postoperative radiotherapy. *Oncology*. 2009;77(5):285-92.

Krause U, Bertrand L, Hue L. Control of p70 ribosomal protein S6 kinase and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein phosphatases in isolated hepatocytes. *Eur J Biochem*. 2002;269(15):3751-9.

Kroemer G., Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles Heel, *Cancer Cell* 2008;472–482.

Kukidome D, Nishikawa T, Sonoda K, Imoto K, Fujisawa K, Yano M, Motoshima H, Taguchi T, Matsumura T, Araki E. Activation of AMP-activated protein kinase reduces hyperglycemia-induced mitochondrial reactive oxygen species production and promotes mitochondrial biogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes*. 2006;55:120–127.

- Langer CJ, Leighton JC, Comis RL, et al. Paclitaxel and carboplatin in combination in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer: a phase II toxicity, response, and survival analysis. *J Clin Oncol.* 1995;13: 1860-70.
- Lam CK, Chari M, Wang PY, Lam TK. Central lactate metabolism regulates food intake. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; pp. 491-6.
- Landman GW, Kleefstra N, van Hateren KJ, Groenier KH, Gans RO, Bilo HJ. Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes (ZODIAC-16). *Diabetes Care* 2010; 33:322-6.
- Lau JK, Ensing B. Hydrolysis of cisplatin--a first-principles metadynamics study. *Phys Chem Chem Phys.* 2010; 21;12(35):10348-55
- Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, et al. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(5):2037-42.
- Lebwohl D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer.* 1998:1522-34.
- Libby G, Donnelly LA, Donnan PT, Alessi DR, Morris AD, Evans JM. New users of metformin are at low risk of incident cancer: A cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32:1620-5.
- López-Alarcón L, Eboli ML. Oxidation of reduced cytosolic nicotinamide adenine dinucleotide by the malate-aspartate shuttle in the K-562 human leukemia cell line. *Cancer Res.* 1986. 46(11):5589-91.
- Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol.* 1992; 79 (3): 328-37.

- Lustig V, Redman LW. Improved serum initiated aspartate aminotransferase assay by inhibition of lactate dehydrogenase with oxamate. *Clin Biochem.* 1979;12(6):254-5.
- Maitra, A., I. I. Wistuba, A. K. Virmani, M. Sakaguchi, I. Park, A. Stucky, et al. Enrichment of epithelial cells for molecular studies. *Nature Med.* 1999;5:459–463.
- Markert CL, Shaklee JB, Whitt GS: Evolution of a gene. Multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation. *Science* 1975;189:102-114.
- Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene.* 2001; 7874-87.
- Martin-Castillo B, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Menendez JA. Metformin and cancer: Doses, mechanisms and the dandelion and hormetic phenomena. *Cell Cycle.* 2010; 21;9(6).
- Martin, D.E. & Hall, M.N. 2005. The expanding TOR signaling network. *Curr Opin Cell Biol* 17, 158–166.
- Martin-Requero A, Ayuso MS, Parrilla R. Interaction of oxamate with the gluconeogenic pathway in rat liver. *Arch Biochem Biophys.* 1986;246(1):114-27.
- Matthaei, S., Reibold, J. P., Hamann A., Benecke, H. Haring, H.U., Greten, H. & Klein, H.H. In vivo metformin treatment ameliorates insulin resistance: Evidence for potentiation of insulin-induced translocation and increased functional activity of glucose transporters in obese (fa/fa) Zucker rat adipocytes. *Endocrinology*, 1993. 133, 304- 311.
- Meijer, A.J. Amino acids as regulators and components of nonproteinogenic pathways. *J Nutr* 2003; 133;2057S–2062S.

- Mellstedt, H. Cancer initiatives in developing countries. *Annals of Oncology* 17 (Supplement 8). 2006. viii24–viii31.
- Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21(14):2787–2799.
- Memmott RM, Dennis PA. LKB1 and mammalian target of rapamycin as predictive factors for the anticancer efficacy of metformin. *J Clin Oncol.* 2009;27(34):e226.
- Miller. C. W., Simon, K., Aslo, A., Kok, K., Yakota, J., Buys, C. H. C. M., Terada, M., and Koeffler, H. P. p53 mutations in human lung tumors. *Cancer Res.*1992;52: 1695-1698.
- Monk BJ, Tewari KS, Koh WJ: Multimodality therapy for locally advanced cervical carcinoma: State of the art and future directions. *J Clin Oncol* 2007: 2952-2965.
- Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 2007;274(6):1393-418.
- Moscatello DK: Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* 1995;55:5536–5539.
- Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine.* 2006;24(3):S3/42–S3/51.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 1983;65, 55–63.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(6):518-27.

National Institutes of Health Consensus. National Institutes of Health Consensus Development Conference statement on cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 1997;66(3):351-61.

Nath N, Khan M, Paintlia MK, Singh I, Hoda MN, Giri S; Dandona P, Aljada A, Ghanim H, Mohanty P, Tripathy C, Hofmeyer D, Chaudhuri A. Metformin attenuated the autoimmune disease of the central nervous system in animal models of multiple sclerosis. *J Immunol.* 2009; 182(12):8005-14.

Neshat MS, Mellinshoff IK, Tran C, et al. Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98: 10314–9.

Novoa WB, Winer AD, Glaid AJ, Schwert GW. Lactic dehydrogenase, V. Inhibition by oxamate and oxalate. *J Biol Chem.* 1959; 1143-8.

Ohe Y, Ohashi Y, Kubota K, Tamura T, Nakagawa K, et al. Randomized phase III study of cisplatin plus irinotecan versus carboplatin plus paclitaxel, cisplatin plus gemcitabine, and cisplatin plus vinorelbine for advanced non-small-cell lung cancer: Four-Arm Cooperative Study in Japan. *Ann Oncol* 2007; 18:317–23.

Ortega AD, Sánchez-Aragó M, Giner-Sánchez D, Sánchez-Cenizo L, Willers I, Cuezva JM. Glucose avidity of carcinomas. *Cancer Lett.* 2009;276(2):125-35.

Orth G, Favre M. Human papillomaviruses. Biochemical and biologic properties. *Clin Dermatol.* 1985;3:27–42.

Ouslimani N, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Legrand A, Beaudoux JL. Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. *Metabolism.* 2005;54:829–834.

Otterson K, Kesselheim A. Market-based licensing for HPV vaccines in developing countries. *Health Aff.* 2008. 130–39.

- Ouyang J, Parakhia RA, Ochs RS. Metformin activates AMP kinase through inhibition of AMP deaminase. *J Biol Chem.* 2011 Jan 7; 286(1):1-11.
- Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J* 2000; 348: 607–614.
- Papaconstantinou J. Colowick SP. The role of glycolysis in the growth of tumor cells. I. Effects of oxamic acid on the metabolism of Ehrlich ascites tumor cells in vitro. *J Biol Chem.* 1961a; 236: 278-84.
- Papaconstantinou J. Colowick SP. The role of glycolysis in the growth of tumor cells. II. The effect of oxamic acid on the growth of HeLa cells in tissue culture. *J Biol Chem.* 196b1; 236: 285-88.
- Pearce EL, Walsh MC, Cejas PJ, Harms GM, Shen H, Wang LS, Jones RG, Choi Y. Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature.* 2009; 460 (7251):103-7.
- Peedell C. *Concise Clinical Oncology.* Elsevier. Philadelphia USA. 2005. p. 3-5.
- Pérez RP. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur J Cancer.*1998; 34:1535–1544.
- Petroulakis E, Mamane Y, Le Bacquer O, Shahbazian D, Sonenberg N. mTOR signaling: implications for cancer and anticancer therapy. *Br J Cancer.* 2006; 94: 195–9.
- Pirozynski M. 100 years of lung cancer. *Respir Med.* 2006;100(12):2073-84.
- Piulats JM, Jiménez L, García del Muro X, Villanueva A, Viñals F, Germà-Lluch JR. Molecular mechanisms behind the resistance of cisplatin in germ cell tumours. *Clin Transl Oncol.* 2009 ;11(12):780-6.

- Powell JD, Delgoffe GM. The mammalian target of rapamycin: linking T cell differentiation, function, and metabolism. *Immunity*. 2010;33(3):301-11.
- Prlic M, Bevan MJ. Immunology: A metabolic switch to memory. *Nature*. 2009;460(7251):41-2.
- Rao RD, Buckner JC, Sarkaria JN. Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors as anti-cancer agents. *Curr Cancer Drug Targets*. 2004;4(8):621-35.
- Rastogi T, Hildesheim A, Sinha R. Opportunities for cancer epidemiology in developing countries. *Nat Rev Cancer*. 2004. 4: 909–917.
- Repasky GA, Chenette EJ, Der CJ: Renewing the conspiracy theory debate: Does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol* 2004;14:639-647.
- Ries F, Klastersky J: Nephrotoxicity induced by cancer chemotherapy with special emphasis on cisplatin toxicity. *Am J Kidney Dis*. 1986; 8: 368–379.
- Ries L, Eisner M, Kosary C, et al., eds.: *Cancer Statistics Review, 1975-2002*. Bethesda, Md: National Cancer Institute, 2005.
- Riou G, Favre M, Jeannel D, Bourhis J, Le Doussal V, Orth G. Association between poor prognosis in early-stage invasive cervical carcinomas and non-detection of HPV DNA. *Lancet*. 1990; 335 (8699): 1171-4.
- Roberts EM. Non-ocular cancer in relatives of retinoblastoma patients. *Br J Cancer* 1989; 60:358-65.
- Roberts PJ, Der CJ: Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 2007;26:3291-3310.
- Roberts S, Ashmole I, Gibson LJ, Rookes SM, Barton GJ, Gallimore PH. Mutational analysis of human papillomavirus E4 proteins: identification of structural features

important in the formation of cytoplasmic E4/cytokeratin networks in epithelial cells. *J Virol* 1994;68:6432–45.

Rodríguez-Enríquez S, Vital-González PA, Flores-Rodríguez FL, Marín-Hernández A, Ruiz-Azuara L, Moreno-Sánchez R. Control of cellular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast-growing tumor cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006; 215(2):208-17.

Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*. 1965; 205: 698-9.

Rudin CM, Avila-Tang E, Harris CC, Herman JG, Hirsch FR, Pao W, Schwartz AG, Vahakangas KH, Samet JM. Lung cancer in never smokers: molecular profiles and therapeutic implications. *Clin Cancer Res*. 2009;15(18):5646-61.

Rusch VW. Lung metastases. In: Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG. *Abeloff's Clinical Oncology*. 4th ed. Philadelphia, Pa: Churchill Livingstone Elsevier; 2008:chap 58.

Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, Sabatini DM. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*. 2008;320(5882):1496-501.

Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, et al. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell*. 2007; 25: 903–15.

Sanchez-Cespedes M. A role for LKB1 gene in human cancer beyond the Peutz-Jeghers syndrome. *Oncogene*. 2007; 26:7825–32.

Sandler AB, Ansari R, McClean J, Fisher W, Dorr A, Einhorn LH. A Hoosier Oncology Group phase II study of gemcitabine plus cisplatin in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Prog Proc Am Soc Clin Oncol* 1995; 14:357.

- Sander V, Luchetti CG, Solano ME *et al.* Role of the N,N'-dimethylbiguanide metformin in the treatment of female prepuberal BALB/c mice hyperandrogenized with dehydroepiandrosterone. *Reproduction* 2006; 131:591–602.
- Sanders MJ, Grondin PO, Hegarty BD, Snowden MA, Carling D. Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J.* 2007; 403: 139–148.
- Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol.* 2005 Dec;17(6):596-603.
- Schäfer G. Biguanides. A review of history, pharmacodynamics and therapy. *Diabetes Metab.* 1983; 9(2):148-63.
- Scheffner M, Romanczuk H, Munger K, Huibregtse JM, Mietz JA, Howley PM. Functions of human papillomavirus proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;186:83–96.
- Schneider-Maunoury S, Croissant O, Orth G. Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors. *J Virol.* 1987;61:3295-8.
- Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002;346:92–8.
- Slate TF, Sawyer B, Straeuli U. Studies on succinato-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim Biophys Acta.* 1963;77:383-93.
- Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, et al. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem.* 1996; 271(51):32529-37.

- Sierra I, Pérez D, Gómez S, Morante S. *Analítica instrumental*. Netbiblo, 2010; 42-47.
- Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science*. 2005;310:1642–6.
- Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 2006;441:424–30.
- Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungmann RA, Dalla-Favera R, Dang CV. c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94 (13): 6658-63.
- Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004;18:1926–45.
- Spitz MR, Wei Q, Dong Q, Amos CI, Wu X. Genetic susceptibility to lung cancer: the role of DNA damage and repair. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12:689-98.
- Srividhya S, Ravichandran MK, Anuradha CV. Metformin attenuates blood lipid peroxidation and potentiates antioxidant defense in high fructose-fed rats. *J Biochem Mol Biol Biophys*. 2002;6:379–385.
- Stein SC, Woods A, Jones NA, Davison MD, Carling D. The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem J*. 2000; 345 Pt 3:437–43.
- Sterne J. *Pharmacology and mode of action of hypoglycaemic guanidine derivatives*. London: Academic, 1969:193-245.
- Stevens A, Lowe J. *Anatomía patológica*. Edit. Harcourt. 2001.pp. 88-91.
- Stevenson M, Hudson LC, Burns JE, Stewart RL, Wells M, Maitland NJ. Inverse relationship between the expression of the human papillomavirus type 16 transcription factor E2 and virus DNA copy number during the progression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Gen Virol*. 2000;81:1825-32.

Stewart BW, Kleihues P, eds. World cancer report. Lyon: IARC Press, 2003. pp. 203-206.

Tanner NT, Silvestri GA. An up to date look at lung cancer screening. *Cell Adh Migr.* 2010;4(1):96-9.

Tewari KS, Monk BJ: Gynecologic Oncology Group trials of chemotherapy for metastatic and recurrent cervical cancer. *Curr Oncol Rep.* 2005;7:419-434.

The Health's Professional's HPV HANDBOOK.I: Human papillomavirus and cervical cancer. The European Consortium for cervical Cancer education.2004.

Thornburg JM, Nelson KK, Clem BF, Lane AN, Arumugam S, Simmons A, Eaton JW, Telang S, Chesney J. Targeting aspartate aminotransferase in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2008; pp.1-12.

Tiainen M, Ylikorkala A, Makela TP. Growth suppression by Lkb1 is mediated by a G(1) cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:9248–9251.

Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res.* 2008; 100: 328–341.

Toyama K, Yonezawa A, Tsuda M, Masuda S, et al., Heterozygous variants of multidrug and toxin extrusions (MATE1 and MATE2-K) have little influence on the disposition of metformin in diabetic patients. *Pharmacogenet Genomics.* 2010;20(2):135-8.

Varella-Garcia M. Chromosomal and genomic changes in lung cancer. *Cell Adh Migr.* 2010;4(1):100-6.

Vander Haar E, Lee S-I, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim D-H. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol.* 2007; 9: 316–23.

- Vázquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, del Barco S., Martin-Castillo B., Menéndez JA. The antidiabetic drug metformin: a pharmaceutical AMPK activator to overcome breast cancer resistance to HER2 inhibitors while decreasing risk of cardiomyopathy. *Ann Oncol.* 2009; pp. 592-5.
- Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Menendez JA. The antidiabetic drug metformin suppresses HER2 (erbB-2) oncoprotein overexpression via inhibition of the mTOR effector p70S6K1 in human breast carcinoma cells. *Cell Cycle* 2009a; 8:88-96.
- Veech RL, Chance B, Kashiwaya Y, Lardy HA, Cahill GF Jr. Ketone bodies, potential therapeutic uses. *IUBMB Life.* 2001; 51:241-247.
- Viollet B, et al. Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. *J Physiol.* 2006;574(pt 1):41–53.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189(1):12-9.
- Wallace DC. Mitochondria and cancer: Warburg addressed. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2005; 70:363-74).
- Wang X, Christiani DC, Wiencke JK, Fischbein M, Xu X, Cheng TJ, Mark E, Wain JC, Kelsey KT. Mutations in the p53 gene in lung cancer are associated with cigarette smoking and asbestos exposure. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1995;4(5):543-8.
- Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956, 123:309-314.
- Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995;81:323–330.
- Werness, B. A., Levine, A. J. & Howley, P. M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* 1990; 248, 76–79.

- Wheate NJ, Walker S, Craig GE, Oun R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans.* 2010; 39(35):8113-27.
- Winehouse S. Glycolysis, respiration and anomalous gene expression in experimental hepatomas: G. H. A. Clawes memorial lecture. *Cancer Res.* 1972;2007–2016.
- Wingo SN, Gallardo TD, Akbay EA, Liang MC, Contreras CM, et al. Somatic LKB1 mutations promote cervical cancer progression. *PLoS One.* 2009;4(4):e5137.
- Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7(1):11-22.
- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell.* 2006;124(3):471-84.
- Xie H, Valera VA, Merino MJ, Amato AM, Signoretti S, Linehan WM, Sukhatme VP, Seth P. LDH-A inhibition, a therapeutic strategy for treatment of hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer. *Mol Cancer* 2009:626–635.
- Yasmeen A, Beauchamp MC, Piura E, Segal E, Pollak M, Gotlieb WH. Induction of apoptosis by metformin in epithelial ovarian cancer: Involvement of the Bcl-2 family proteins. *Gynecol Oncol.* 2011.
- Yonezawa A, Masuda S, Nishihara K, Yano I, Katsura T, Inui K. Association between tubular toxicity of cisplatin and expression of organic cation transporter rOCT2 (Slc22a2) in the rat. *Biochem Pharmacol.* 2005;70(12):1823-31.
- Yu Y, Deck JA, Hunsaker LA, Deck LM, Royer RE, Goldberg E, Vander Jagt DL. Selective active site inhibitors of human lactate dehydrogenases A4, B4, and C4. *Biochem Pharmacol.* 2001; 62(1):81-9.
- Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, Sonenberg N, Pollak M: Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res* 2006, 66:10269-10273.

- Zhou G, Myers R, Li Y, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 2001;108:1167–74.
- Zhou M, Zhao Y, Ding Y, Liu H, Liu Z, Fodstad O, Riker AI, Kamarajugadda S, Lu J, Owen LB, Ledoux SP, Tan M. Warburg effect in chemosensitivity: targeting lactate dehydrogenase-A re-sensitizes taxol-resistant cancer cells to taxol. *Mol Cancer*. 2010; 9:33.
- Zhou H, Huang S. mTOR signaling in cancer cell motility and tumor metastasis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2010; 20(1):1-16. Huang J., Manning B.D. The TSC1–TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem. J*. 2008; 412:179-190.
- Zhong XH, Howard BD. Phosphotyrosine-containing lactate dehydrogenase is restricted to the nuclei of PC12 pheochromocytoma cells. *Mol Cell Biol*. 1990;10(2):770-6.).
- Zhuang Y, Miskimins WK. Cell cycle arrest in Metformin treated breast cancer cells involves activation of AMPK, downregulation of cyclin D1, and requires p27Kip1 or p21Cip1. *J Mol Signal*. 2008;3:18.
- Zhuang L, Scolyer RA, Murali R, McCarthy SW, Zhang XD, Thompson JF, Hersey P. Lactate dehydrogenase 5 expression in melanoma increases with disease progression and is associated with expression of Bcl-XL and Mcl-1, but not Bcl-2 proteins. *Mod Pathol*. 2010;23(1):45-53.
- Zu XL, Guppy M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;313(3):459-65.
- zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(9):690-8.
- zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2:342–50.