



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EVALUACIÓN DE FÁRMACOS COMO CORRECTORES METABÓLICOS DEL CÁNCER

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MAURICIO CÁRDENAS RODRÍGUEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. CARLOS GUADALUPE PÉREZ PLASENCIA

FES IZTACALA, UNAM

MÉXICO, D.F. DICIEMBRE, 2014.



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.

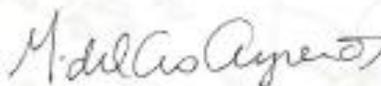
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 03 de noviembre de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **CÁRDENAS RODRÍGUEZ MAURICIO** con número de cuenta **304794892**, con la tesis titulada **"EVALUACIÓN DE FÁRMACOS COMO CORRECTORES METABÓLICOS DEL CÁNCER"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA**:

Presidente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Vocal: DRA. LORENZA DÍAZ NIETO
Secretario: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Suplente: DR. ADOLFO ANDRADE GETTO
Suplente: DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 21 de noviembre de 2014



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos académicos

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

A la Dra. Nadia Jacobo Herrera por su haberme aceptado como su estudiante y por el apoyo y asesoría durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Carlos Pérez Plasencia por su apoyo y los recursos brindados para la realización del presente trabajo.

Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa por haberme permitido trabajar en su laboratorio, por su ayuda y tiempo brindados durante el desarrollo de esta investigación y por ser un gran ejemplo.

Agradecimientos personales

A todos mis compañeros del laboratorio de genómica del cáncer de la Unidad de Biomedicina.

A mis compañeros y amigos de la Unidad de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Al M. en C. José Luis Ventura Gallegos por toda su ayuda, consejos y asesoría durante la realización del proyecto.

Al QBP Martin Gallardo por su ayuda, tiempo y sobre todo por su amistad.

Dedicatoria

A mi mamá.

A mi papá por el apoyo, enseñanzas, paciencia y formación en todos los aspectos de mi vida y sobre todo por el cariño que siempre me ha dado y demostrado.

A mis hermanos y cuñado por siempre estar ahí para apoyarme, quererme y por ser un buen ejemplo de lucha y crecimiento.

A Sylvia por todo el amor, amistad, ayuda y apoyo incondicional.

A Daniel Cano, Osvaldo Vera, Daniel Rivera, Daniel Salazar y Daniel Barajas por siempre estar y ser más que mis amigos, parte de mi familia.

A Yessica Rodríguez, Jorge Zamora, Rafael Rangel, Germain Chigo, Adriana Cario y David Zayas por su amistad, apoyo incondicional y ser ejemplos a seguir.

Índice

	Página
I. Lista de tablas y figuras	i
II. Abreviaturas	ii
III. Resumen	1
IV. Abstract	3
V. Introducción	5
1. Cáncer	5
1.1. Epidemiología	6
1.2 Características comunes de las células cancerosas	6
1.2.1 Señales proliferativas sostenidas	7
1.2.2 Evasión de supresores del crecimiento	8
1.2.3 Resistencia a muerte celular	9
1.2.3.1. Apoptosis	9
1.2.3.2. Autofagia	10
1.2.3.3. Necrosis	11
1.2.4 Inmortalidad replicativa	11
1.2.5 Inducción de angiogénesis	13
1.2.6 Invasión y metástasis	13
1.2.7 Evasión de la destrucción inmunitaria	14
1.2.8 Reprogramación del metabolismo	15
2. Metabolismo de las células cancerosas	15
3. Cáncer cervicouterino	19
3.1 Virus del papiloma humano (HPV)	20
3.2 Cáncer cervicouterino en México	20
3.2.1 Prevención y tratamiento del cáncer cervicouterino en México	22
3.2.2 Cisplatino	23
4. Metabolismo de la célula cancerosa como blanco terapéutico	24
4.1 Metformina	24
4.2 Oxamato	26
VI. Planteamiento del problema	28
VII. Hipótesis	28
VIII. Objetivos	29
IX. Antecedentes	30
X. Metodología	31
XI. Resultados	35
Determinación de la concentración inhibitoria (IC) 50	35
Determinación de la viabilidad celular tras el tratamiento con los diferentes fármacos y sus combinaciones	35
Evaluación de la presencia de marcadores de apoptosis	36
Evaluación del desarrollo tumoral en ratones desnudos inoculados con diferentes densidades celulares	39
Evaluación de los diferentes tratamientos sobre xenógrafos implantados en ratones desnudos	41

XII. Discusión	42
XIII. Conclusiones	46
XIV. Bibliografía	47
XV. Anexo	54

I. Lista de figuras y tablas

Figura	Página
FIG. 1. Características comunes de las células cancerosas.	7
FIG. 2. Vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis.	10
FIG. 3. Senescencia celular.	12
FIG. 4. Etapas de la interacción entre la respuesta inmunitaria y células malignas.	14
FIG. 5. Reprogramación metabólica de las células cancerosas.	18
FIG. 6. Proporción de incidencia del cáncer cérvico uterino.	19
FIG. 8. Mortalidad por cáncer cervicouterino en México.	21
FIG. 9. Estadificación del cáncer cervicouterino de acuerdo a la FIGO.	22
FIG. 10. Unión del cisplatino al ADN.	24
FIG. 11. Mecanismos de acción de la metformina.	26
FIG. 12. Estructuras del piruvato y el oxamato.	27
FIG. 13. Porcentaje de células vivas después de la exposición a los tratamientos.	36
FIG. 14. Western blot y densitometrías para PARP-1 y PARP-1 fragmento p86	37
FIG. 15. Western blot y densitometrías para pro-caspasa 3 y caspasa 3	38
FIG. 16. Cinética de crecimiento de tumor en ratones desnudos inoculados con diferentes densidades celulares.	39
FIG. 17. Crecimiento tumoral en ratones a los días 5, 10 y 15 después de haber iniciado los tratamientos.	41
Tablas	
TABLA 1	31
TABLA 2	32
TABLA 3	34
TABLA 4	35

II. Abreviaturas

α cetoglutarato	Akg
Acetil coenzima A carboxilasa	ACC
Ácido desoxirribonucleico	ADN
Ácido graso sintasa	FASN
Ácido ribonucleico	ARN
Ácido tricloro acético	TCA
ADN mitocondrial	mtADN
ADN nuclear	nADN
Amperes	A
Anticuerpo	Ab
ARN mensajero	mARN
ATP citrato liasa	ACL
Ayudante de mTOR insensible a rapamicina	RICTOR
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃
Blanco de rapamicina en mamíferos	mTOR
Buffer para ensayo de radio inmuno precipitación	RIPA
Buffer salino de Tris	TBS
Buffer salino de fosfatos	PBS
Cáncer cérvico uterino	CaCu
Catión Calcio 2+	Ca ²⁺
Catión Sodio +	Na ⁺
Centímetros	Cm
Ciclo de los ácidos tricarbóxicos	TCA
Cinasa de proteínas dependiente de calcio/calmodulina	CaMKK
Cinasa de hígado B1	LKB1
Cinasa de proteínas activada por TGF- β 1	TAK1
Cinasa de residuos de serina y treonina 11	STK11
Cisplatino	Cis
Cloruro de potasio	KCl
Cloruro de sodio	NaCl
Complejo 1 de mTOR	mTORC1

Complejo 2 de mTOR	mTORC2
Concentración inhibitoria	IC
Difosfato de adenosina	ADP
Dióxido de carbono	CO ₂
Dodecil sulfato de sodio	SDS
Especies reactivas de oxígeno	ROS
Factor de crecimiento endotelial vascular	VEGF
Factor de crecimiento parecido a insulina	IGF
Factor de crecimiento transformante β	TGF- β
Factor de necrosis tumoral	TNF
Factor de transcripción inducible por hipoxia	HIF
Federeación Internacional de Ginecología y Obstetricia	FIGO
Fluoruro de polivinilideno	PVDF
Fosfatidil inositol 3 cinasa	PI3K
Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄
Fosfato de sodio dibásico	Na ₂ HPO ₄
Fosfofructocinasa	PFK
Fosfoglicerato cinasa	PGK
Fosfoglicerato mutasa	PGAM
Fumarato hidratasa	FH
Gen mutado de ataxia telangiectasia	ATM
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	GAPDH
Glicógeno fosforilasa	PYGL
Glucosa	Glu
Glucosa 6-fosfato	G6P
Glutamato-amino liasa	GLUL
Glutamato deshidrogenasa	GLUD
Hexocinasa	HK
Hora	H
Instituto Nacional del Cáncer	NCI
Intraperitoneal	Ip
Kilo Dalton	kDa
Lactato deshidrogenasa	LDH

Litro	L
Matriz extracelular	MEC
Metformina	Met
Microgramos	μg
Microlitros	μl
Micromolar	μM
Mililitros	ml
Milimolar	mM
Monofosfato de adenosina	AMP
Minuto	M
mTOR fosforilado	pmTOR
Nanómetros	Nm
Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada	NADP ⁺
Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida	NADPH
Nicotinamida adenina dinucleótido oxidada	NAD ⁺
Nicotinamida adenina dinucleótido reducida	NADH
Óxido nítrico	NO
Óxido nítrico sintasa	NOS
Oxamato	Ox
Partícula parecidas a virus	VLP
Piruvato cinasa	PK
Piruvato	Pyr
Piruvato deshidrogenasa	PDH
Platino II	Pt(II)
Poli ADP ribosa polimerasa	PARP
Potencial de hidrógeno	pH
Proteína asociada a retinoblastoma	RB
Proteína cinasa activada por AMP	AMPK
Proteínas cinasas relacionadas a fosfoinositol 3 cinasa	PIKK
Proteína de esclerosis tuberosa	TSC
Proteína de interacción con el receptor de cinasas de residuos de serina/treonina	RIPK
Proteína p53	P53

Proteína reguladora asociada a mTOR	RAPTOR
Receptor de insulina	IR
Revoluciones por minuto	Rpm
Segundo	s
Succinato deshidrogenasa	SDH
Suero fetal bovino	SFB
Sulforrodamina B	SRB
Transportador de glucosa	GLUT
Trifosfato de adenosina	ATP
Ultravioleta	UV
Vía de las pentosas fosfato	ppp
Virus del papiloma humano	VPH
Volts	V

III. Resumen

El cáncer es un conjunto de diversas enfermedades con características específicas originadas en células normales y que han adquirido rasgos especiales. A pesar de su complejidad y diversidad, se han identificado ciertas características presentes en muchas células de todos los tipos de cáncer que permiten su establecimiento, desarrollo y diseminación, estas características son: señales proliferativas sostenidas, evasión de la respuesta inmunitaria, inhibición de supresores de crecimiento, inducción de angiogénesis, evasión de muerte celular, inmortalidad replicativa, activación de procesos de invasión y metástasis, y reprogramación del metabolismo celular. Esta última característica se consideró por mucho tiempo como secundario y no un causal de cáncer. Las células reprograman su metabolismo para aumentar su producción energética, regular su microambiente y dar abasto a su elevada demanda de biomoléculas como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos complejos, y de esta manera estar en constante división celular. Estas modificaciones son de gran relevancia para la supervivencia de la célula cancerosa y, para el desarrollo de terapias basadas en estas diferencias. Uno de los grandes problemas de los fármacos que se administran en terapias actuales son su alta toxicidad y su poca o nula especificidad, por lo que afectan también a las células no transformadas. Debido a lo anterior, la administración de fármacos que actúen sobre vías metabólicas de producción de energía e intermediarios de vías sintéticas podría aumentar la selectividad de los tratamientos y mejorar su efecto, lo que incluso podría llevar a la disminución de las dosis administradas.

La incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer varía dependiendo de la región, situación económica, geográfica y social. En nuestro país, un tipo de cáncer con alta incidencia en mujeres es el cérvico uterino, el cual está asociado hasta en un 99 % a la infección por virus del papiloma humano y aunque en los últimos años su mortalidad ha disminuido, sigue siendo un problema muy importante para el país. El tratamiento utilizado actualmente contra este padecimiento es principalmente a base de cisplatino, un compuesto derivado del platino que es altamente citotóxico.

En el presente trabajo se propone la administración de una terapia adyuvante de dos fármacos: la metformina, que afecta a la fosforilación oxidativa y algunas vías que participan en biosíntesis de proteínas y lípidos, y el oxamato, que es un inhibidor competitivo de la lactato deshidrogenasa, afectando así la glicólisis, en combinación con el cisplatino en modelos *in vivo* e *in vitro* de cáncer cérvico uterino utilizando la línea celular de carcinoma cervical HeLa. Para los estudios *in vitro*, primero se obtuvieron las concentraciones inhibitorias 50 (IC50) de los tres fármacos mediante el ensayo de sulforodamina B (SRB). Posteriormente, se

realizaron ensayos de proliferación celular por tinción con cristal violeta 12 h, 24 h y 48 h después de que las células fueron administradas con diferentes tratamientos. Después, mediante western blot se analizó la presencia de los marcadores de apoptosis pro-caspasa 3, caspasa 3, PARP-1 y fragmento p89 de PARP-1, en extractos obtenidos de células tratadas con cisplatino, metformina y oxamato y la combinación de los tres fármacos. Para los experimentos *in vivo* se utilizaron ratones desnudos (nu/nu) hembras de entre 4 y 6 semanas, en los cuales se estandarizó el número de células necesarias para el desarrollo tumoral. Para ello se inocularon 3, 5, 10 y 15 millones de células a grupos de 5 ratones y se evaluó el desarrollo tumoral diario, una vez detectado el tumor, éste fue medido diario con vernier para determinar su volumen, el seguimiento se hizo hasta 21 días después de la inoculación. Una vez determinada el número celular a inocular, 40 ratones fueron inoculados y el desarrollo tumoral fue evaluado hasta que alcanzaran un volumen de 0.2 ml. Los ratones fueron divididos en 8 grupos y diariamente por 15 días se les administraron diferentes tratamientos continuando con la evaluación del volumen tumoral.

La combinación de metformina y oxamato disminuyó el porcentaje de células vivas hasta más del 90 % con respecto al cultivo tratado con cisplatino, independiente de la concentración de cisplatino en la combinación y aún en su ausencia. Sin embargo, en el estudio *in vivo*, el tratamiento adyuvante de metformina y oxamato más cisplatino provocó la disminución del 20 % del tamaño tumoral inicial y fue el único tratamiento en el que se observaron diferencias estadísticas significativas con respecto al tratamiento con cisplatino.

IV. Abstract

Cancer comprises a set of pathologies with particular traits originated from normal cells that have acquired special features. Despite its complexity and differences, certain hallmarks have been identified in many of the cells within all types of cancer that allow its establishment, development and dissemination. These hallmarks are: sustained proliferative signaling, evasion of immune destruction, growth suppression inhibition, angiogenesis induction, cell death resistance, replicative immortality, invasion and metastasis activation and metabolic reprogramming. For so long, however, this feature was considered secondary, instead of a probable cause of cancer. Recently, there is a renewed interest in metabolic pathways reprogrammed and damaged in cancer cells. Cancer cells reprogram their metabolism to enhance their energy production, regulate their microenvironment and sustain the growing demand of biomolecules such as lipids, proteins, nucleic acids and complex carbohydrates for continued cell division. Some of the major alterations are enhanced glycolytic pathway flux, reflux of some of the intermediates generated in this pathway to the pentose phosphate or serine biosynthesis pathways, utilization of some alternative sources like glutamine and aminoacids transamination, as well as increased expression, activity or affinity of receptors, transporters and enzymes involved in those pathways. These modifications have become relevant, since they are vital for cancer cells and differentiated them from normal cells. In this line, the therapeutic strategies that target metabolic pathways involved in energy production, intermediates derivation and biosynthesis could increase the vulnerability of cancer cells to actual cytotoxic treatment, raising the possibility to improve their effects and decrease their doses in order to diminish the damage produced to normal cells.

Incidence and mortality of the different types of cancer varies depending on the geographic, economic and social context. In Mexico, cervix uteri cancer is one of the most frequent among women and it is associated in up to 99 % of cases with papilloma virus infection and albeit its mortality has decreased in recent years, it is still a major problem for the country. The current treatment for this disease is cisplatin, a platin derived complex highly cytotoxic.

In the present work we proposed an adjuvant treatment of two drugs: metformin, whose target is the oxidative phosphorylation respiratory chain and some protein and lipid biosynthetic pathways, and oxamate, a competitive inhibitor of lactate dehydrogenase targeting glycolysis, added to cisplatin treatment in cervix uteri *in vivo* and *in vitro* models, using the cervix uteri carcinoma cell line HeLa. For the *in vitro* experiments, we firstly determined the inhibitory concentration 50 (IC50) of the three drugs using the sulforodamine B assay (SRB). Subsequently, crystal violet staining proliferation assays were performed at 12 h, 24 h and 48 h after different

treatments were added. After that, western blot analyses of protein extracts derived from cells treated with cisplatin, metformin and oxamate and the combination of the three drugs were performed to determine the presence of apoptosis markers pro-caspase 3, caspase 3, PARP-1 and PARP-1 p89. For the *in vivo* assays, 4-6 weeks nude (nu/nu) female mice were used. Firstly, we determined the appropriate cell number in order to achieve the desire tumor development. So 3, 5, 10 and 15 million cells were inoculated to 5 mice groups and tumor development was daily evaluated, once a tumor was evident it was measured with Vernier to determine its volume. Tumor development was evaluated up to 21 day after cell inoculation. Once the cell number was stablished, 40 mice were inoculated and tumor development was evaluated until a 0.2 ml volume was reached. Mice were divided in 8 groups and different treatments were administered daily for 15 days continuing with the tumor volume measurement.

The treatment of cells with both metformin and oxamate decreased the living cells number more than 90 % compared with cisplatin treatment, and it was cisplatin independent. However, *in vivo*, adjuvant treatment of metformin and oxamate with cisplatin diminished in 20 % the initial tumor size and was the only with statistical differences compared with cisplatin treatment.

V. Introducción

1. Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades, cada una con características que la hacen única, que se desarrollan a partir de células normales las cuales han sufrido alteraciones que las hacen proliferar descontroladamente para un tejido normal. Las masas que se forman pueden invadir a los tejidos cercanos o migrar hacia tejidos distantes, procesos conocidos como migración y metástasis respectivamente [1]. Las alteraciones que sufren las células son a nivel genético y epigenético, además provocan cambios en el microambiente de la célula transformada, ayudando al desarrollo del tumor a través de la secreción de moléculas como factores de crecimiento y citocinas. Las alteraciones suceden principalmente en tres tipos de genes: los oncogenes, genes supresores de tumor y genes asociados a la reparación del ácido desoxiribonucleico (ADN) [2] [3].

Los oncogenes son derivados de protooncogenes, los cuales están implicados principalmente en la regulación de procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis en células normales [4]. Sus productos se clasifican en 6 grupos: factores de transcripción, remodeladores de cromatina, factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, transductores de señales y reguladores de apoptosis. Su activación se da por rearrreglos cromosómicos, mutaciones y amplificación, las tres causan alteraciones en la estructura de los oncogenes, incremento o deficiencias en la regulación de su expresión. Lo anterior da a la célula ventajas de crecimiento y/o supervivencia [5].

Los genes supresores de tumor codifican proteínas que controlan el crecimiento celular. En una célula normal, cuando ocurre daño al ADN, la célula detiene su maquinaria de crecimiento para arreglar ese daño, si los genes supresores de tumor están alterados, la célula no detendrá su división y la alteración en el ADN estará presente en las células hijas. Las mutaciones que sufren estos genes son de pérdida de función y necesita haber mutación en ambos alelos para que se den, excepto en el caso del supresor de tumor P53, que es dominante y sólo requiere mutación en un alelo para que afecte su función [2, 6].

Los genes de reparación del ADN codifican enzimas que monitorean constantemente los cromosomas para corregir residuos de nucleótidos dañados. La reparación la realizan principalmente por tres diferentes formas: reparación por escisión de base, reparación por escisión de nucleótido y reparación por desajuste. El daño en estos genes provoca que la célula transmita alteraciones en el ADN a las células hijas, lo que a la larga provoca la acumulación de éstas [7].

Generalmente las alteraciones no ocurren en un solo tipo de genes y la suma de estas tienen como consecuencia modificaciones en diversas vías que controlan el proceso normal del desarrollo de la célula como proliferación, apoptosis, diferenciación, migración e invasión, metabolismo, entre otras [8].

Esta enfermedad se desarrolla principalmente en tejidos epiteliales, este tipo de cáncer se conoce como carcinoma y los tumores formados en estos tejidos causan hasta el 80% del total de muertes asociadas a cáncer en diferentes partes del mundo [9].

1.1. Epidemiología

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Aproximadamente 14.2 millones de nuevos casos de cáncer y cerca de 8.2 millones de muertes debido a esta enfermedad ocurrieron a nivel mundial en 2012 afectando a países desarrollados, en vías de desarrollo o países pobres, siendo diferentes los tipos predominantes de cáncer que ocurren en cada región [10].

En México el cáncer es la tercera causa de muerte y en 2012 se presentaron aproximadamente 148 mil casos nuevos de cáncer y cerca de 80 mil personas murieron a causa de esta enfermedad en ese año [10].

1.2. Características comunes de las células cancerosas

A pesar de su vasta complejidad y la gran diversidad entre un tipo de cáncer y otro, se han identificado hasta el momento 8 características compartidas en muchas de las células cancerosas de todos los tipos de cáncer que llevan a las células a desarrollarse como células malignas [11]. Estas características, que permiten el crecimiento y diseminación metastásica son: señales proliferativas sostenidas, resistencia a muerte celular, inducción de angiogénesis, inmortalidad replicativa, invasión y metástasis, evasión de supresores de crecimiento, evasión de la destrucción inmunitaria y reprogramación del metabolismo energético de la célula (Figura 1).

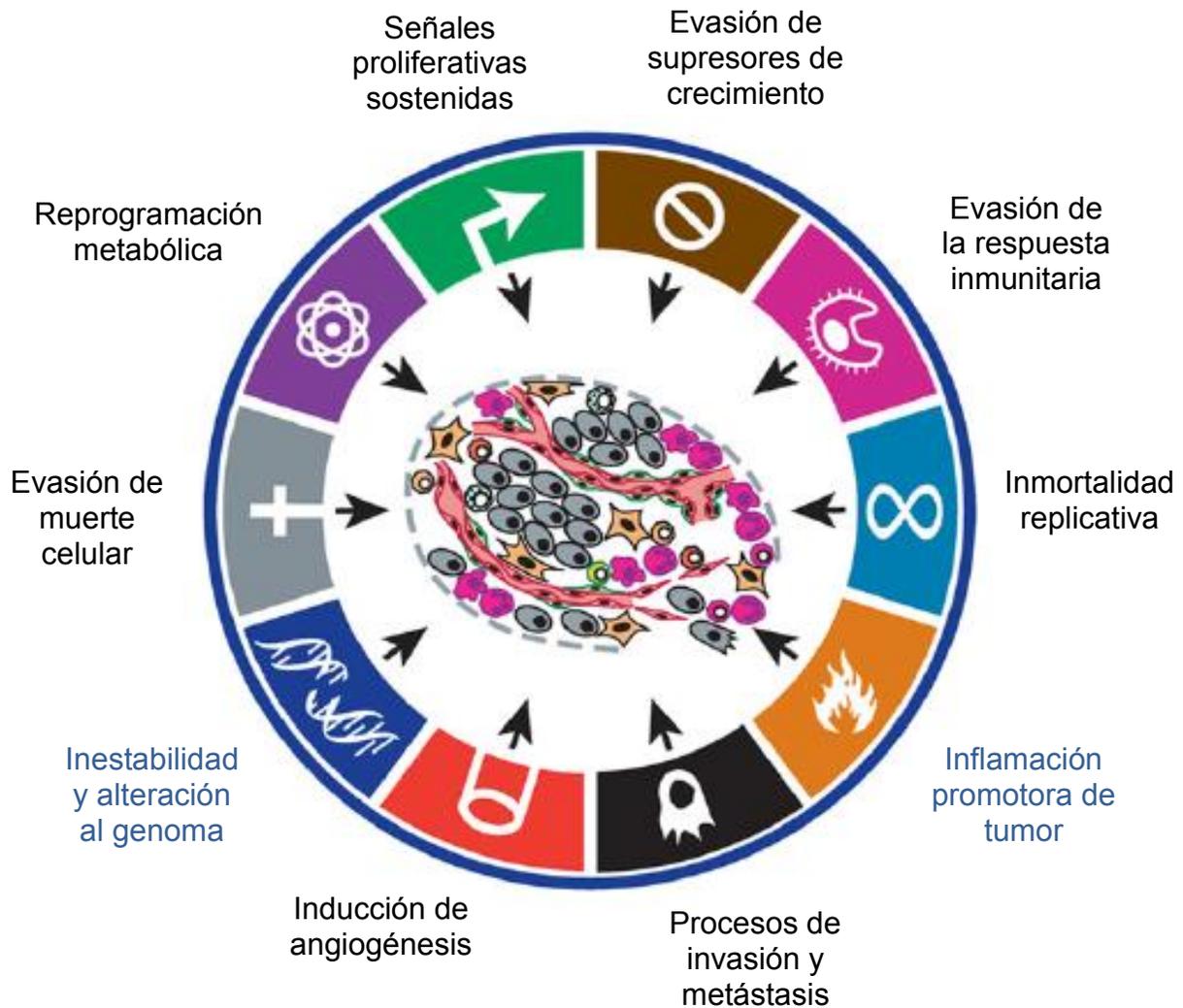


FIG. 1 Características comunes de las células cancerosas. A pesar de su inmensa diversidad, se han identificado 8 características comunes (negro) en muchas de las células cancerosas presentes en la mayoría de los tumores. Adicionalmente hay factores que ayudan al desarrollo tumoral pero que no se pueden considerar dentro de este grupo (azul). Modificado de Hanahan, D. y Weinberg, R. 2011 [12].

1.2.1. Señales proliferativas sostenidas

Es una característica fundamental que le confiere a la célula cancerosa la habilidad de sostener de manera crónica su proliferación. Las células normales necesitan diversas señales como factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular y moléculas de adhesión/interacción para poder pasar de un estado quiescente a uno proliferativo activo, la producción y liberación de estas señales están muy reguladas para guiar la entrada y progresión del ciclo de crecimiento y división celular y mantener así, la homeostasis en la célula. Se ha observado que las células cancerosas, además de recibir señales de su

microambiente, son capaces de generar sus propias señales de crecimiento, liberándose de la dependencia total sobre señales exógenas. Para lo anterior la célula cancerosa puede sobreexpresar receptores de superficie para diferentes factores de crecimiento, hacer un cambio en los receptores extracelulares de matriz que expresan dando preferencia a los que transmiten señales de crecimiento, o sufrir modificaciones en componentes río abajo de la vía de señalización, lo que permitiría que la respuesta se dé sin necesidad de gran cantidad de ligando, también hay daños en ciertas moléculas que participan en circuitos donde se producen señales inhibitorias que regulan la proliferación. A pesar de lo anterior, no se puede pasar por alto el hecho de que las señales producidas por otras células presentes en el tumor son muy importantes para este proceso proliferativo y que las células cancerosas, así como las normales tienen circuitos de comunicación con estas otras células [11, 13].

1.2.2. Evasión de supresores del crecimiento

En los tejidos normales hay muchas señales que funcionan para controlar la proliferación celular y mantener la homeostasis, estas señales son controladas principalmente por genes supresores de tumor, siendo los que codifican a la proteína asociada a retinoblastoma (PRB) y la proteína p53 (P53) los más conocidos [13]. Además de inducir y mantener señales proliferativas, los tumores evaden las señales antiproliferativas. Lo anterior principalmente evitando que la célula exprese un fenotipo diferenciado, esto debido a la sobreexpresión del oncogen *Myc* [11]. Otra manera de evasión antiproliferativa es mediante afectaciones a la vía de PRB, que en un estado hipofosforilado, está implicada en permitir o no el paso del ciclo celular de la fase G1 a la fase S. Lo anterior se da a través de diversos mecanismos, entre los cuales destacan:

- Mutaciones en distintas moléculas como TGF- β , que en un estado normal previene la fosforilación de PRB, la proteína smad 4, que transduce señales desde los receptores de TGF- β río abajo, o mutaciones sobre PRB que evitan su acción antiproliferativa [11].
- Alteraciones en la expresión de integrinas y otras moléculas de adhesión que envían señales antiproliferativas [11].

Además de estos factores intracelulares, las células del estroma del tumor ayudan a las células cancerosas a evadir la supresión del tumor, entre éstas células están los fibroblastos asociados a tumor y células inmunitarias que infiltran el tumor, las cuales producen enzimas proteolíticas como metaloproteinasas, proteinasas de residuos de cisteína y serina y la heparanasa, que escinden moléculas de adhesión que participan en interacciones célula-célula o célula-matriz extracelular (MEC), las cuales son importantes para suprimir la proliferación celular [14].

1.2.3. Resistencia a muerte celular

Bajo ciertas condiciones de estrés o daño celular irreparable o excesivo, la célula toma como destino la muerte mediante diferentes procesos como apoptosis, autofagia y necrosis, lo que controla la proliferación aberrante. Para la célula cancerosa, la cual presenta diversas alteraciones genéticas y epigenéticas, es muy importante evitar estos mecanismos de muerte para poder seguirse dividiendo y heredando las características especiales que han adquirido gracias a dichos cambios. Esta característica de evasión o atenuación de la muerte celular se ha observado en distintos tipos de células en gran variedad de tumores [13].

1.2.3.1. Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que está mediada principalmente por unas proteasas de residuos de cisteína llamadas caspasas, de las cuales hay iniciadoras y efectoras, y son activadas por dos vías: la vía del estrés o intrínseca y la vía extrínseca [15] (Figura 2).

- Vía intrínseca: Está regulada principalmente por la familia Bcl-2, cuyos miembros funcionan como interruptores de vida y muerte. En esta vía la activación de las caspasas está asociada con la permeabilización de la membrana mitocondrial externa con lo que se liberan componentes del espacio intermembranal como citocromo c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, AIF y la endonucleasa G, las cuales convergen en la activación de la caspasa 9. En cáncer hay mutaciones en genes que regulan esta vía que afectan la expresión de sus productos, un ejemplo de esto es la sobreexpresión de Bcl-2 tras la traslocación cromosomal del oncogen *bcl-2* [16].
- Vía extrínseca: En ella participan receptores de muerte, que son parte de la superfamilia del gen del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) y que incluye más de 20 proteínas que comparten dominios extracelulares ricos en cisteína. El dominio de muerte es un dominio citoplasmático de aproximadamente 80 aminoácidos, todos coinciden en la activación de las caspasas 8 o 10. En células cancerosas esta vía está disminuida principalmente por el incremento de moléculas antiapoptóticas o la disminución o mal función de las proteínas apoptóticas [16].

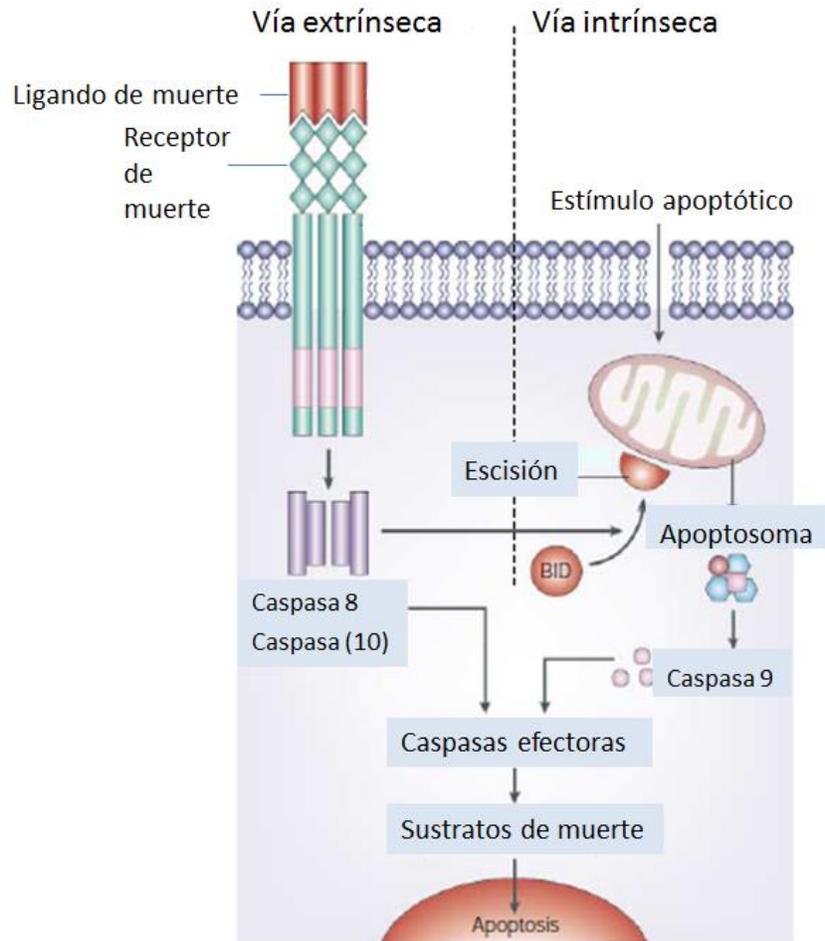


FIG. 2 Vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis. La vía intrínseca de la apoptosis inicia por la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, liberando diversos factores que activan caspasa 9. La vía extrínseca se activa por la unión de ligandos de muerte a sus receptores que poseen dominios de muerte, los cuales pueden activar caspasa 8 o 10. Modificado de Igney, F. H. y Krammer, P. H. 2002.

1.2.3.2. Autofagia

La autofagia es un proceso en el que organelos, proteínas o fragmentos del citoplasma son degradados y sus productos como macromoléculas o energía, son reutilizados posteriormente. Este proceso se da principalmente como protección en respuesta a condiciones no letales de falta de nutrientes, intermediarios metabólicos, alteraciones en la producción energética, mitocondrias con alteraciones de polaridad en sus membranas y cambios en el microambiente celular [17, 18]. Bajo ciertas circunstancias como estrés excesivo y daño al sistema apoptótico, la autofagia puede llevar a la célula a un destino de muerte. En cáncer se ha visto que la autofagia puede jugar papeles pro y en contra del desarrollo tumoral, dependiendo el tipo de cáncer. Existen tres tipos principales de autofagia:

- Macroautofagia: Hay formación de estructuras de doble membrana llamadas autofagosomas, que rodean los elementos o zona citoplásmica y posteriormente se unen con lisosomas, formando el autofagolisosoma, para su degradación [19].
- Microautofagia: La zona citoplasmática o elementos a degradarse son directamente envueltos por los lisosomas [19].
- Autofagia mediada por chaperonas: Proteínas con señales específicas son transportadas hacia los lisosomas por un proceso mediado por receptores [19].

1.2.3.3. Necrosis

La necrosis es otro proceso de muerte celular que en un principio se consideraba en cierto modo no regulado, sin embargo, se ha demostrado que puede ser un proceso regulado mediante la participación de diversas moléculas como las proteínas de interacción con el receptor de cinasa de residuos de serina/treonina (RIPK) 1 y 3, las cuales, en ausencia o mala señalización de apoptosis, interaccionan con enzimas metabólicas como la glicógeno fosforilasa (PYGL). Glutamato-amino ligasa (GLUL) y glutamato deshidrogenasa (GLUD) 1 para aumentar el flujo metabólico y con ello aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) para que finalmente esto tenga como consecuencia la permeabilización de la membrana mitocondrial, una característica importante para la muerte necrótica. Otro tipo importante de moléculas que participan son las calpaínas, que son cisteín proteasas intracelulares activadas por calcio (Ca^{2+}) tras lo cual, afectan al intercambiador sodio (Na^+)/ Ca^{2+} provocando una mayor concentración de Ca^{2+} dentro de la mitocondria, aumentando también la producción de ROS. Adicionalmente, el Ca^{2+} estimula la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) contribuyendo a una elevada producción de óxido nítrico (NO), el cual es un fuerte inhibidor del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial, provocando también un incremento en la producción de ROS [20, 21].

Cabe resaltar que estas vías interaccionan entre ellas y que diferentes vías de regulación activadas para una vía pueden tener consecuencias sobre la expresión o represión de otra vía de muerte celular. Otro punto importante a tener en cuenta es que el proceso de muerte celular es de suma importancia para mantener la homeostasis de células normales.

1.2.4. Inmortalidad replicativa

Las células somáticas normales sólo pueden atravesar por un limitado número de ciclos de crecimiento y división debido a dos importantes procesos: la senescencia

(Figura 3), que es la entrada de la célula a un estado viable no proliferativo irreversible, y la crisis, caracterizada por muerte celular masiva [13]. Esta limitación está asociada con la acción de al menos tres mecanismos: disminución en el tamaño de los telómeros en cada ciclo celular, sobreexpresión del locus CDKN2A que codifica INK4A, activador de la familia RB y ARF, que activa p53, y acumulación de daño al ADN [22].

En etapas premalignas de diversos tumores se observa la presencia de marcadores de senescencia, pero éstos están ausentes en sus etapas malignas, lo que nos indica que la senescencia es una barrera contra la progresión del tumor, la cual es evadida por la célula cancerosa [22]. Una característica que se observa en diversos tipos de tumor es la presencia de la enzima telomerasa, encargada de elongar y mantener a los telómeros, que se relaciona con resistencia a senescencia y crisis, haciendo que la célula adquiera la capacidad de replicarse sin límites [13].

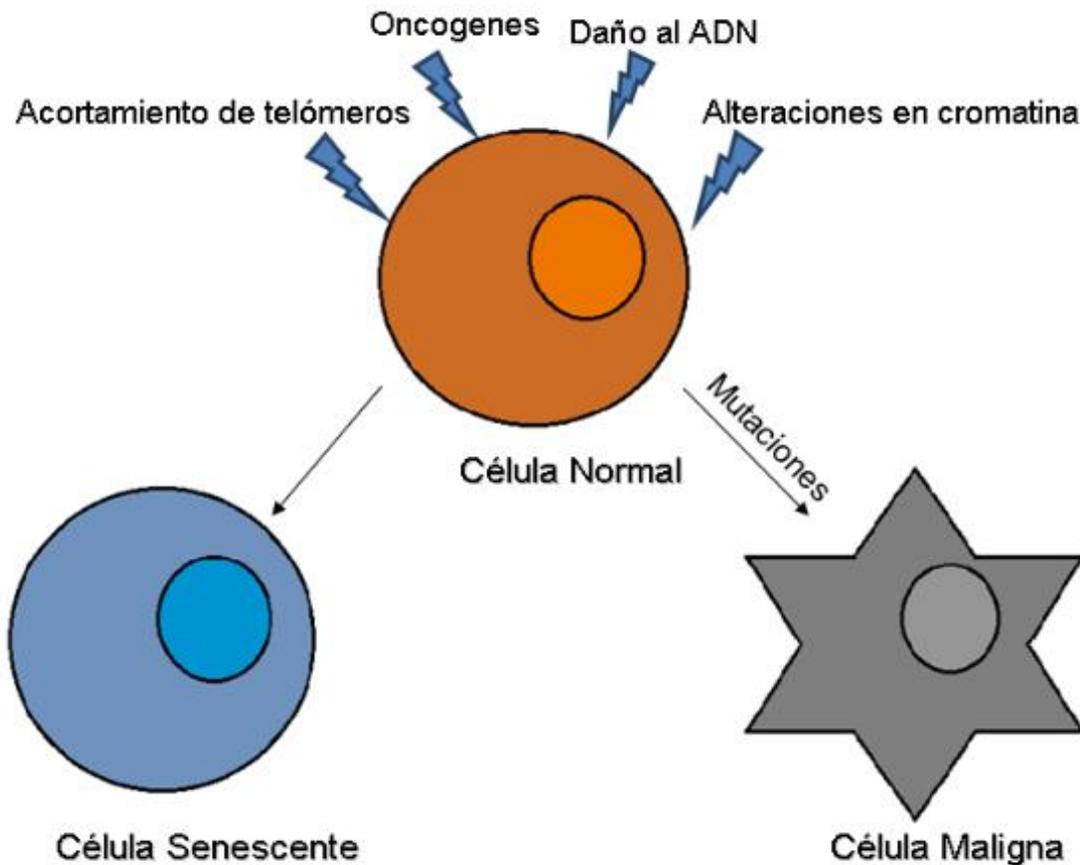


FIG. 3 Senescencia celular. La célula tiene un número finito de ciclos de crecimiento y división lo que la lleva a un estado no proliferativo, la senescencia. Cuando hay alteraciones en las vías que llevan a la senescencia, la célula puede volverse inmortal y adquirir capacidad replicativa indefinida.

1.2.5. Inducción de angiogénesis

Las células obtienen un suplemento constante de nutrimentos y un medio para eliminar productos de desecho mediante el intercambio de gases y moléculas gracias a que se ha desarrollado un sistema vascular y linfático que se extiende a todos los órganos y tejidos. La angiogénesis es el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y es esencial para el crecimiento de los órganos y su reparación, las fallas en su regulación están asociadas a diversas enfermedades, entre ellas el cáncer. La angiogénesis no inicia el desarrollo maligno, pero promueve la progresión del tumor y la metástasis [23].

Las células cancerosas necesitan un suplemento de nutrimentos suficiente para poder sostener la creciente actividad proliferativa, en muchos tumores se observa la formación de nuevos vasos sanguíneos que sirven para mantener este abasto de nutrimentos. Uno de los principales estímulos para que se lleve a cabo el proceso de angiogénesis es la hipoxia, cuando no hay suficiente difusión de oxígeno se promueve el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos mediante señalización a través de factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIFs), los cuales regulan la sobreexpresión de genes angiogénicos, siendo la inducción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) la más conocida [24].

La angiogénesis puede presentarse desde etapas tempranas del desarrollo del tumor y está asociada también a la presencia de células del sistema inmunitario innato, las cuales infiltran los tumores y liberan factores como VEGF-A que ayudan a encender la angiogénesis [13, 14].

1.2.6. Invasión y metástasis

La metástasis es un proceso característico de etapas avanzadas del cáncer donde células del tumor llegan a tejidos diferentes al tejido primario y se establecen en ellos, formando tumores secundarios. Para lo anterior, las células del tumor primario viajan a través de la circulación sanguínea hacia tejidos lejanos, algunos mecanismos mediante los cuales lo logran son: a través de la disminución o pérdida de la expresión de diversas moléculas como E-caderina, que es importante para la adhesión entre células, los genes ACTG2, MYLK y MT3, que codifican para actina γ , la cadena ligera de la miosina cinasa y metalotioneína 3, respectivamente [25].

En lo referente a la invasión, ésta se da de diversas formas, las cuales son características de diferentes tipos de cáncer, entre ellas están la invasión colectiva, donde un conjunto de células cancerosas avanzan en masa a los tejidos adyacentes y la ameboidea, donde células individuales pasan a través de los intersticios en la matriz extracelular [13].

1.2.7. Evasión de la destrucción inmunitaria

El sistema inmunitario se encarga de vigilar y proteger al organismo de factores reconocidos como extraños, estos pueden ser endógenos o exógenos. Cuando la célula normal se transforma en maligna, es reconocida por el sistema inmunitario y para sobrevivir, necesita evadir esta respuesta inmunitaria. La relevancia del sistema inmunitario en el control del cáncer se demuestra en la alta incidencia de la enfermedad en pacientes inmunocomprometidos.

Hay tres procesos principales en los que está involucrado el sistema inmunitario en relación a las células cancerosas (Figura 4):

- **Inmunovigilancia:** El sistema inmunitario reconoce a precursores de cáncer y los destruye, un proceso conocido como eliminación [26].
- **Inmunoedición:** Un estado de equilibrio donde no todas las células tumorales han sido eliminadas, pero no presentan afecciones a los órganos o tejidos. En este proceso se han seleccionado células tumorales poco inmunogénicas [26].
- **Inmunosubversión:** Las células tumorales poco inmunogénicas escapan de ese estado de equilibrio y se da la formación del tumor [26].

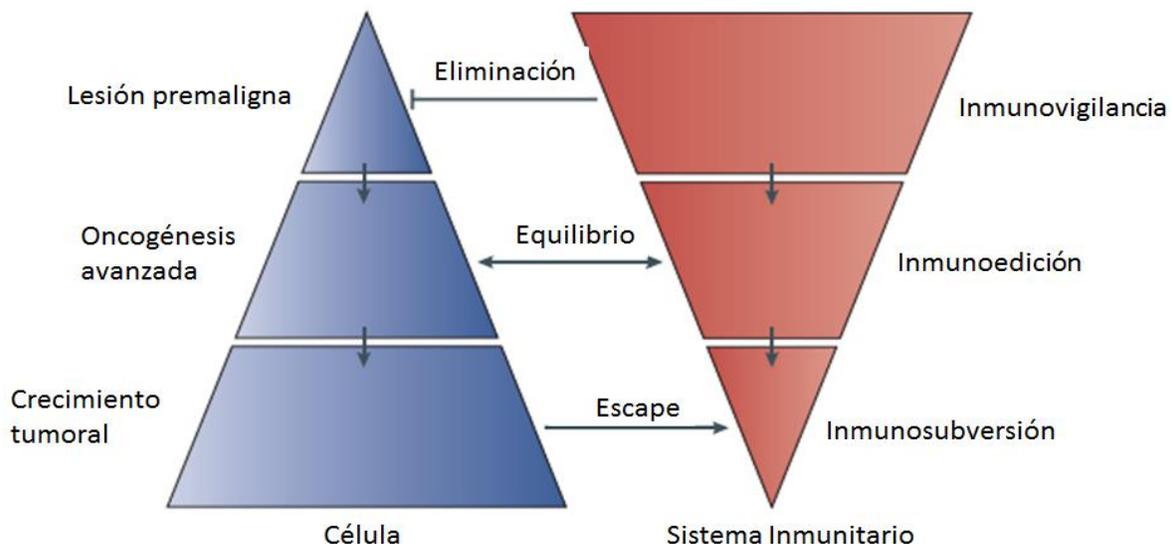


FIG. 4 Etapas de la interacción entre la respuesta inmunitaria y células malignas. El sistema inmunitario detecta a las células malignas en etapas tempranas y tras esta interacción inicial la célula puede pasar por tres etapas, la eliminación, la etapa de equilibrio o el escape del sistema inmunitario. Modificada de Zitvogel *et al.* 2006 [26].

1.2.8. Reprogramación del metabolismo

La célula cancerosa necesita ajustar su metabolismo debido a la creciente demanda energética para sostener los procesos de proliferación, crecimiento y angiogénesis y a la necesidad de diferentes intermediarios que participan en la síntesis de macromoléculas esenciales. En células normales y bajo condiciones aeróbicas, la glucosa es convertida en piruvato mediante el proceso de glicólisis y después se produce dióxido de carbono a través de su oxidación en la cadena respiratoria mitocondrial, sin embargo, bajo condiciones anaérobicas la vía glicolítica está favorecida sobre la respiración mitocondrial y el piruvato es transformado a lactato. Uno de los principales cambios metabólicos observados en las células cancerosas es el incremento en la expresión y actividad de algunas moléculas involucradas en el transporte de glucosa y la glicólisis [13].

Esta reprogramación se encuentra en todos los tumores, en muchos de los cuales hay principalmente dos subpoblaciones celulares que difieren en sus vías de generación de energía: una dependiente de glucosa y que secreta lactato y otra que importa y utiliza el lactato producido por células vecinas como fuente de energía [13, 27].

2. Metabolismo de las células cancerosas

Las primeras descripciones que hablaban sobre alteraciones en el metabolismo de células cancerosas fueron hechas por Otto Warburg, su equipo de trabajo y él compararon células cancerosas con células normales y observaron que tenían niveles similares de respiración mitocondrial, sin embargo, el sobrenadante de las células cancerosas tenía una elevada cantidad de lactato aún en presencia de oxígeno [28]. Esta glicólisis incrementada en las células cancerígenas con elevada producción de lactato aún es una de las alteraciones metabólicas más representativas de las células cancerosas y se conoce como efecto Warburg o glicólisis areóbica. Warburg también observó que la respiración mitocondrial estaba afectada en las células cancerosas y sugirió que la glicólisis incrementada era consecuencia de ello para poder sostener la elevada demanda energética de la célula tumoral y que este era el origen del cáncer [29]. Posteriormente se demostró que el metabolismo mitocondrial no presenta defectos en su habilidad para llevar a cabo la fosforilación oxidativa, sino que la célula reprograma el metabolismo para afrontar la incrementada síntesis de macromoléculas necesaria para aumentar su biomasa y poder dividirse [30].

Múltiples mecanismos son responsables del incremento de la glicólisis en cáncer, entre los principales están:

- **Mutaciones y deleciones en ADN mitocondrial (mtADN):** La mitocondria es un organelo celular semi-autónomo esencial en la producción de energía en forma de trifosfato de adenosina (ATP), generación de ROS, regulación de la apoptosis y conversión de diversos intermediarios metabólicos. Posee material genético propio, el ADN mitocondrial, el cual es una hélice de doble cadena de aproximadamente 16,550 pares de bases que codifica 13 proteínas que forman parte de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. En el cáncer se observan mutaciones en mtADN, las cuales son principalmente homoplásmicas; todas las células en un tumor tienen la misma mutación, y produce alteraciones en la cadena respiratoria, lo que puede afectar la producción neta de ATP, provocar incremento en ROS y cambiar la tasa de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) que conduce a la activación de la vía de supervivencia de Akt [29].
- **Expresión anormal y mutaciones en ADN nuclear (nADN):** La mayoría de las proteínas mitocondriales son codificadas por nADN, algunas de ellas son la succinato deshidrogenasa (SDH) y la fumarato hidratasa (FH), importantes en diversas vías de generación de energía e intermediarios metabólicos, y cuyas alteraciones están asociadas con diversos tipos de cáncer [31]. También, la participación de los oncogenes c-myc, src y ras es importante en el aumento de expresión y actividad de enzimas glicolíticas [32].
- **Microambiente:** Sin cambios estructurales en la mitocondria, la cadena respiratoria mitocondrial puede verse afectada por factores provenientes del ambiente que rodea al tumor como la limitación de la disponibilidad de oxígeno, característica de muchos tumores, lo que activa la glicólisis e incrementa la producción de lactato [29]. Otro factor proveniente del microambiente son las ROS, las cuales también afectan la respiración mitocondrial y provocan la activación de la glicólisis, y el potencial de hidrógeno (pH), que puede provocar depolarización de la membrana mitocondrial.

Cuando se habla de cáncer, la atención se centra principalmente en las señales proliferativas y de supervivencia, y la manera en que los oncogenes y los genes supresores de tumor participan en estos procesos y se considera al metabolismo alterado de la célula como un fenómeno derivado de estos otros procesos, sin embargo, esta característica de la célula cancerosa está siendo más valorada como un causal del cáncer en vez de una consecuencia de las demás

características, e incluso se ha reportado que los oncogenes y genes supresores de crecimiento contribuyen con la reprogramación del metabolismo [30].

Los cambios en el flujo metabólico (Figura 5) ocurren en respuesta a la señalización por factores de crecimiento, independientemente de cambios en la producción de ATP, y estos cambios son necesarios para abastecer la necesidad de nucleótidos, proteínas y lípidos que se utilizan para la división celular constante. Contrario al metabolismo catabólico, este metabolismo anabólico no se basa en aumentar la producción de ATP, sino en obtener carbón y nitrógeno reducidos, así como NADPH para las reacciones biosintéticas de reducción [30]. Como respuesta a la señalización por factores de crecimiento, aumentan tanto la transcripción de genes que codifican enzimas y transportadores que participan en la vía glicolítica, como la síntesis de proteínas y la actividad de algunas de ellas. Algunas de las enzimas más importantes de las que se ha observado expresión o actividad elevadas son diferentes isoformas del transportador de glucosa (GLUT), hexocinasa (HK), fosfofructocinasa (PFK), aldolasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), fosfoglicerato cinasa (PGK), fosfoglicerato mutasa (PGAM), enolasa, piruvato cinasa (PK), piruvato deshidrogenasa (PDH) y lactato deshidrogenasa (LDH) [33]. En células cancerosas el factor inducible por hipoxia 1α (HIF- 1α) es el factor de transcripción que regula la sobreexpresión de isoformas específicas de dichas moléculas independientemente de los niveles de oxígeno, lo que tiene como resultado el incremento del flujo glicolítico y los niveles de diversos intermediarios [27]. La sobreexpresión de PDH cinasa 1 inhibe mediante fosforilación, al complejo PDH, el encargado de la conversión de piruvato a acetil coenzima A (coA), lo que tiene como consecuencia la disminución de la oxidación del piruvato a través del ciclo del ácido cítrico. Lo anterior no significa la disminución de la actividad mitocondrial puesto que la mitocondria es capaz de oxidar otros sustratos como glutamato, ácidos grasos, cuerpos cetónicos y glutamina, sustrato exclusivo de la mitocondria, pero si está asociado a cáncer [33, 34]. La oncoproteína c-Myc es otro factor de transcripción que también activa la expresión de GLUT1, HK mitocondrial (HKm), PFK-1, GAPDH, PGK, enolasa, PK y LDH y ayuda al incremento de la glicólisis bajo condiciones anaeróbicas. En condiciones no hipóxicas promueve la biogénesis mitocondrial [33]. Las isoformas de las enzimas presentan localización, así como propiedades cinéticas y de regulación distintas a las expresadas constitutivamente, esta expresión diferencial es importante dado que diferencia a las células cancerígenas de las normales [34].

La toma de glucosa y la glicólisis también aumentan debido a la activación de la vía fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K)/Akt como consecuencia de la sobreexpresión de transportadores de glucosa, HK, PFK, además esta vía promueve el flujo de carbonos provenientes de la glucosa a vías biosintéticas que se llevan a cabo en la mitocondria. En este organelo, Akt facilita la desviación del citrato mitocondrial

del ciclo de los ácidos tricarbóxicos hacia la producción de acetil coA por fosforilación y activación de ATP-citrato liasa (ACL) [30, 35].

Se ha observado en diversas líneas celulares asociadas a diferentes tipos de cáncer que, contrario a la hipótesis inicial planteada por Warburg, el consumo de glucosa mediante glicólisis y el consumo de glutamina, sustrato oxidable exclusivo de la mitocondria por fosforilación oxidativa, son esenciales para la producción de ATP y que en muchas de estas líneas celulares, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos es completamente funcional, además se demostró que los niveles de oxígeno presente en células, incluso en estados de hipoxia, no son tan bajos como para comprometer a la fosforilación oxidativa [33, 36]. Así, la reprogramación del metabolismo energético tiene como características principales el aumento de la toma de glucosa y de la glicólisis, y el ajuste del metabolismo mitocondrial, contribuyendo ambos a la producción de ATP en diferentes maneras según el tumor o desviando los flujos hacia vías anabólicas.

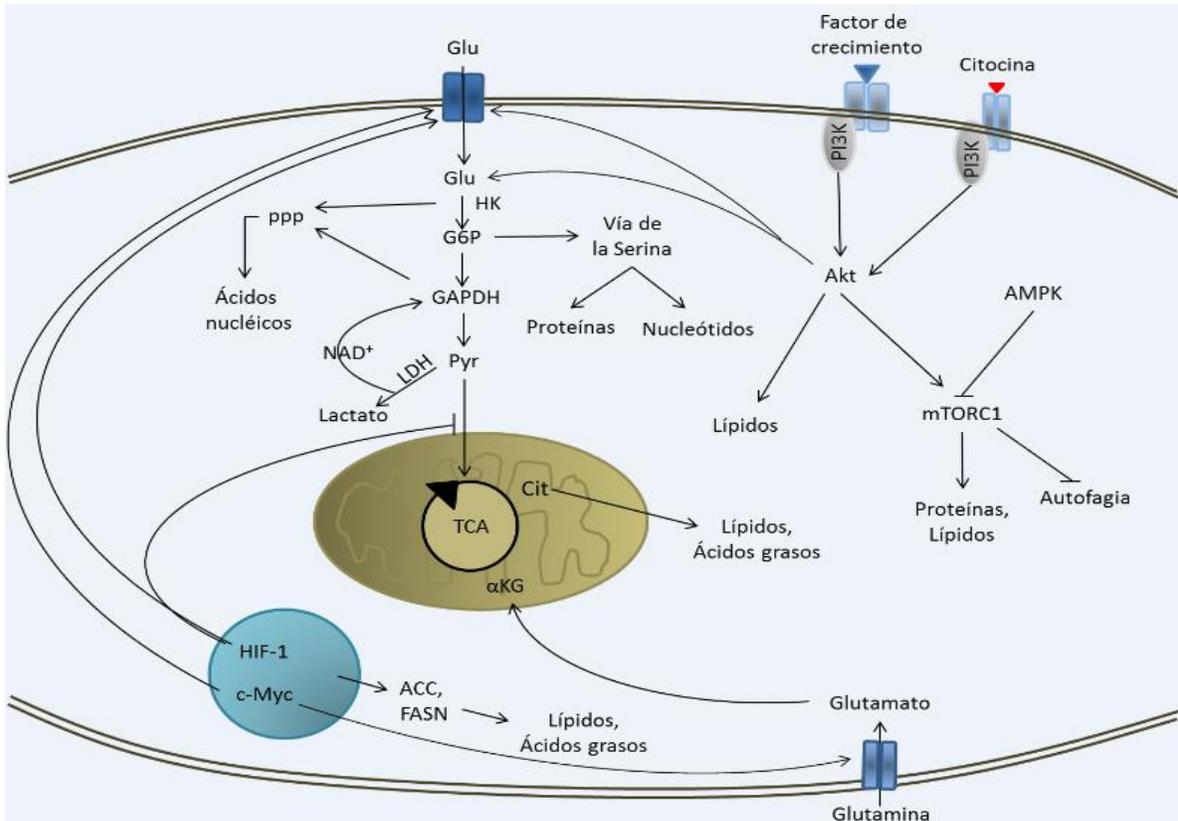


FIG. 5 Reprogramación metabólica de las células cancerosas. Las células cancerosas reprograman su metabolismo para aumentar la producción energética y de biomoléculas necesarias para poder mantenerse en constante división. Algunas de las vías alteradas son la glicólisis, vía de las pentosas fosfato, la vía de biosíntesis de serina y el ciclo TCA, además la célula se vuelve adicta a nuevas fuentes como la glutamina.

3. Cáncer Cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCu) es el cuarto tipo de cáncer con mayor incidencia en las mujeres y la cuarta causa de muerte por enfermedades oncológicas en ese género. A nivel mundial se presentaron aproximadamente 528000 nuevos casos y alrededor de 266000 defunciones por CaCu en 2012, representando el 7.9% del total de incidencia por esta enfermedad y el 7.5% de muertes asociadas a todos los tipos de cáncer en mujeres [10]. Es una enfermedad que afecta principalmente a mujeres que viven en países pobres o en vías de desarrollo en los cuales ocurren aproximadamente el 87% de las muertes por este padecimiento (Figura 6). Lo anterior se debe a que en países industrializados hay mayor presencia de programas de detección efectivos, el manejo adecuado de los casos positivos y la disponibilidad de tratamientos de vanguardia [10, 37] [10, 38].

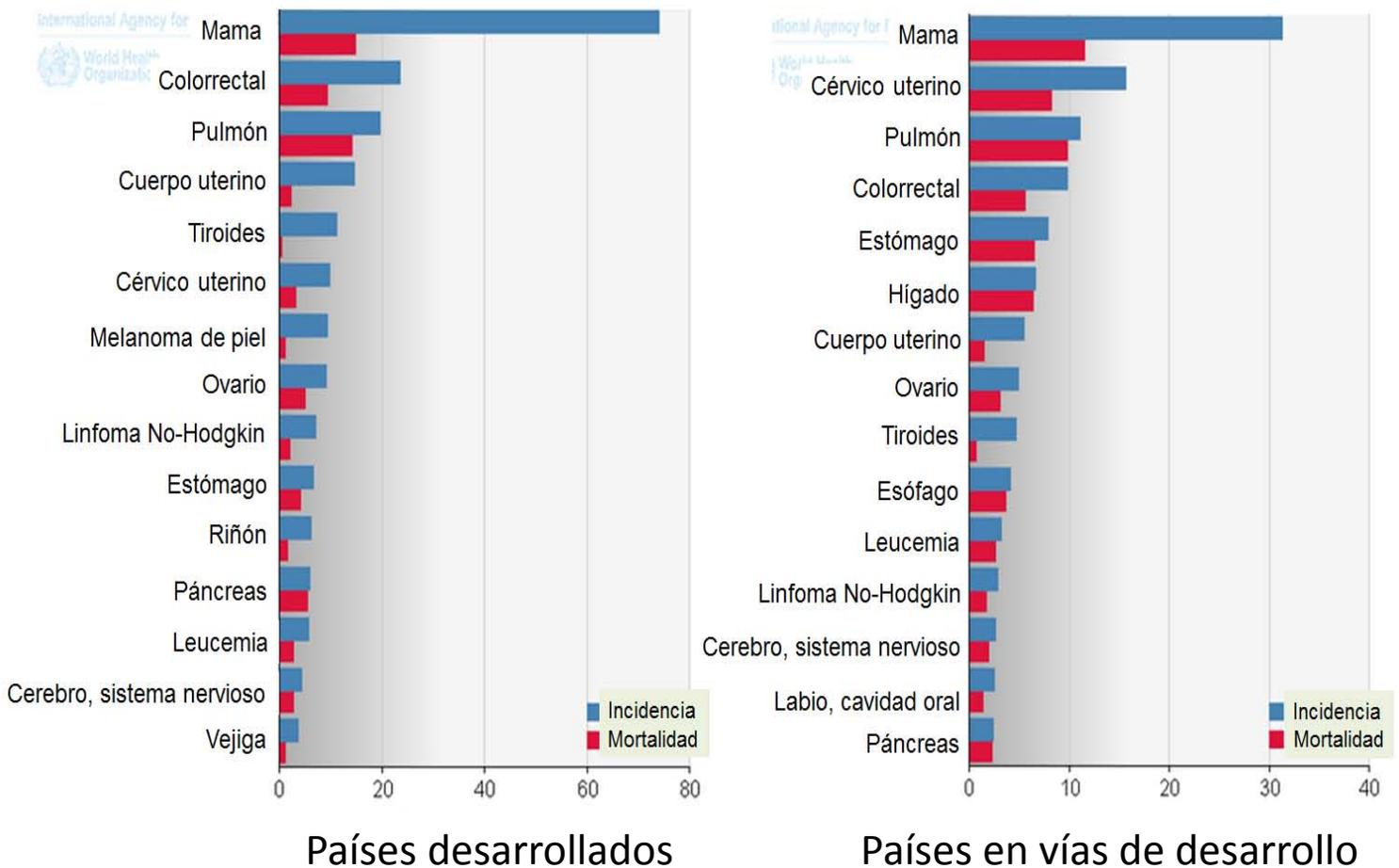


FIG. 6 Proporción de incidencia del cáncer cérvico uterino. El cáncer cervicouterino tiene una mayor incidencia y de muerte en países en vías de desarrollo que en países desarrollados. Modificado de globocan, 2012.

Los principales sitios a los que se propaga el cáncer cervicouterino son los nódulos aórticos y mediastinales, los pulmones y los huesos [38].

3.1. Virus del papiloma humano (HPV)

El cáncer cervicouterino es causado principalmente por el virus del papiloma humano (HPV). Los virus del papiloma humano son pequeños virus de ADN que muestran tropismo por epitelio escamoso y pueden ser transmitidos por vía sexual. Se han identificado más de 120 tipos de HPV y aproximadamente el 30% de estos infectan el epitelio escamoso del tracto genital. De éstos, 15 son considerados de alto riesgo y causantes de la mayoría de los casos de CaCu, con cerca del 99% de los casos. De entre ellos, HPV 16 y 18 son responsables de aproximadamente el 70% de los casos [39].

No todas las personas infectadas con HPV desarrollan cáncer, por lo que también se necesitan alteraciones genéticas adicionales y la participación de oncoproteínas como E5, E6 y E7 que evaden a supresores del crecimiento e inducen inestabilidad en el genoma de queratinocitos. E6 y E7 son pequeñas proteínas de aproximadamente 18 y 13 kDa localizadas en el núcleo principalmente y la expresión de estas dos oncoproteínas puede immortalizar a los queratinocitos mediante una función conjunta donde E7 genera hiperproliferación, sin embargo, esto dispara la apoptosis, la cual es bloqueada por E6. La actividad de ambas moléculas se ve aumentada por la acción de E5 [39].

Es la acción coordinada de estas oncoproteínas la que ayuda a una replicación sostenida del virus y a la transformación maligna de las células normales debido a que el genoma viral se establece en el núcleo como episomas y se expresan genes virales primarios. El ADN viral se replica en sincronía con el ADN celular, después de la división alguna de las células hijas migra y se diferencia, siendo HPV positiva que induce la fase productiva del ciclo de vida viral [39].

3.2. Cáncer Cervicouterino en México

Como se mencionó anteriormente, el CaCu es una enfermedad asociada a los países en desarrollo y México no es la excepción en ese sentido. CaCu en México es el segundo cáncer con mayor incidencia y la segunda causa de muerte por esta enfermedad en mujeres. En 2012 se presentaron casi 14000 nuevos casos (Figura 7) y poco menos de 5000 muertes por esta causa (Figura 8) [10].

En 1974 se estableció en el país el programa nacional para la detección de cáncer cérvico uterino, observándose una disminución de la mortalidad por esta enfermedad a partir de 1992, sin embargo, es muy discreta y los índices continúan siendo muy elevados [40].

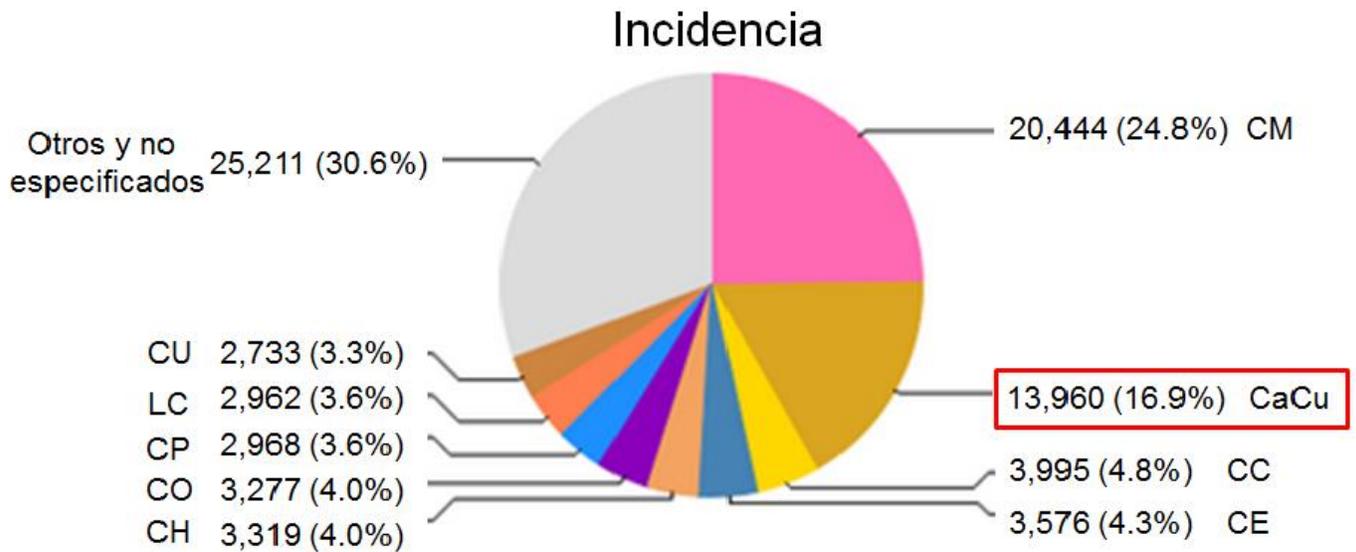


FIG. 7 Incidencia de cáncer cervicouterino en México. Porcentajes de la incidencia de los distintos tipos de cáncer en México. El cáncer cervicouterino es el segundo cáncer con mayor incidencia de todas las enfermedades oncológicas en mujeres. CM: Cáncer de mama, CaCu: Cáncer cérvico uterino, CC: Cáncer colorrectal, CE: Cáncer de estómago, CH: Cáncer de hígado, CO: Cáncer de ovario, CP: Cáncer de pulmón, LC: Leucemia, CU: Cáncer de cuello uterino. Tomado de http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx, 2012.

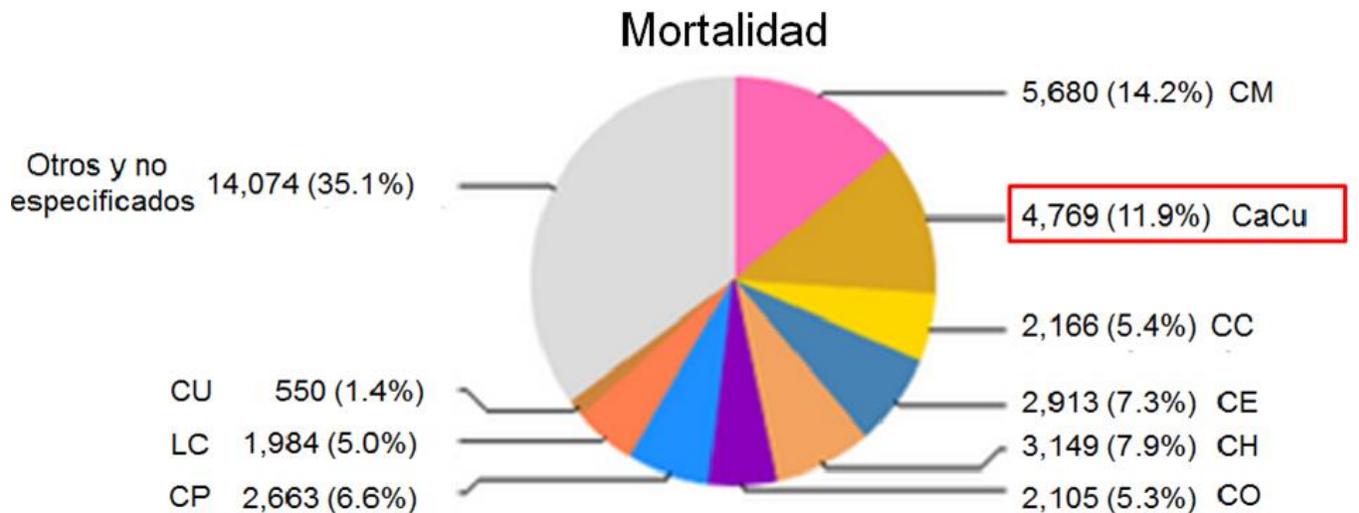


FIG. 8 Mortalidad de cáncer cervicouterino en México. Porcentajes de la mortalidad de los distintos tipos de cáncer en México. El cáncer cervicouterino es la segunda causa de muerte por enfermedades oncológicas. CM: Cáncer de mama, CaCu: Cáncer cérvico uterino, CC: Cáncer colorrectal, CE: Cáncer de estómago, CH: Cáncer de hígado, CO: Cáncer de ovario, CP: Cáncer de pulmón, LC: Leucemia, CU: Cáncer de cuello uterino. Tomado de http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx, 2012.

El diagnóstico de este padecimiento se basa en estudios histopatológicos mediante una biopsia dirigida, mediante colposcopia o toma directa del tumor visible en caso de haberlo. La clasificación es clínica y se utiliza la descripción en la última modificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO).

Etapas	Descripción
I	Tumor confinado al cuello uterino.
IA	Tumor con invasión diagnosticado por Patología con una profundidad máx. de 5 mm medida desde la capa basal y una extensión horizontal menor o igual a 7 mm
IA1	Invasión estromal menor o igual a 3 mm y extensión horizontal menor o igual a 7 mm.
IA2	Invasión estromal mayor de 3 mm pero menor 5 mm, y extensión horizontal menor o igual a 7 mm.
IB	Tumor clínicamente visible confinado al cérvix o etapas pre-clínicas mayores al estadio IA.
IB1	Lesión clínicamente visible menor o igual a 4cm en su dimensión mayor.
IB2	Lesión clínicamente visible mayor de 4 cm en su dimensión mayor.
II	Tumor que se extiende mas allá del cuello uterino sin llegar a la pared pélvica o el tercio inferior de la vagina.
IIA	Tumor que invade fondos de saco vaginal sin invasión parametrial.
IIA1	Tumor menor de 4 cm.
IIA2	Tumor mayor de 4 cm.
IIB	Tumor con invasión parametrial, sin llegar a la pared pélvica.
III	El tumor se extiende a la pared pélvica y/o involucra el tercio inferior de vagina y/o causa hidronefrosis, riñón excluido o disfunción renal.
IIIA	El tumor involucra el tercio inferior de la vagina y no se extiende a la pared pélvica.
IIIB	El tumor se extiende a la pared pélvica y/o causa hidronefrosis, riñón excluido o disfunción renal.
IV	El tumor se extiende fuera de la pelvis o presente involucro comprobado por biopsia de la mucosa vesical o rectal. El edema buloso no se considera enfermedad metastásica.
IVA	El tumor invade a la mucosa de la vejiga o recto y/o se extiende más allá de la pelvis verdadera.
IVB	Metástasis a distancia.

FIG. 9 Estadificación del cáncer cervicouterino de acuerdo a la FIGO.

3.2.1. Prevención y tratamiento del cáncer cervicouterino en México

La Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994 para la prevención, tratamiento y control de cáncer del cuello del útero y de la mama en la atención primaria establece como medidas de prevención primaria la difusión de información

enfocada principalmente a mujeres, sobre las técnicas y programas de detección, los principales factores de riesgo y la importancia del conocimiento de este tema por parte de los hombres a quienes también se incita a que hagan campaña en favor de esta información con sus parejas. Entre los factores de riesgo están ser mayores de 25 años, el inicio temprano de relaciones sexuales (antes de 19 años), la promiscuidad de la pareja, multiparidad (más de cuatro partos), embarazo temprano (antes de los 18 años), infección cervical por virus del papiloma humano, antecedentes de enfermedades de transmisión sexual, deficiencias en vitaminas A, C y E y tabaquismo. Como prevención secundaria se establece el estudio citológico de Papanicolau, debiendo realizarse de manera anual después del inicio de las relaciones sexuales [41].

Actualmente están disponibles vacunas basadas en partículas parecidas a virus (VLP) que protegen contra diversos subtipos de HPV. Merck® produce una vacuna que protege contra HPV 6, 11, 16 y 18 mientras que GlaxoSmithKline® produce una que protege contra HPV 16 y 18.

Los tratamientos dependen del estadio en que se encuentre la enfermedad, las pacientes en estadio IA1 pueden ser sometidas desde conización cervical hasta histerectomía de tipo I, obteniendo porcentajes de curación de entre 99% y 100%, pacientes en estadio IA2 a IB1, en el Instituto Nacional de Cancerología de México se les realiza histerectomía radical tipo III con porcentajes de curación de entre 85% y 90% y recurrencias del 10% al 25%, pero la histerectomía tipo III es el tratamiento de elección hasta el estadio IIA1. El tratamiento con radioterapia se puede utilizar en etapas tempranas pero tiene como efecto secundario importante la pérdida de la función ovárica. El tratamiento para etapas localmente avanzadas es la quimio-radioterapia concomitante, siendo el cisplatino el agente radiosensibilizador más utilizado, con supervivencia a cinco años de entre 60% y 70% para los estadios IIB a IVA, en enfermedad metastásica, estadio IVB, el tratamiento con quimioterapia sistémica es la combinación de cisplatino o carboplatino más paclitaxel, o cisplatino más vinorelbine [42].

3.2.2. Cisplatino

Es un complejo neutro del platino II (Pt(II)) en configuración *cis*, unido a dos grupos amino y dos átomos aniónicos, fue el primer anticancerígeno derivado de platino que se identificó [43].

El cisplatino atraviesa la membrana celular y se vuelve activo intracelularmente por la acuación de uno de los cloruros, que es la incorporación de moléculas de agua en un compuesto, y posteriormente se une covalentemente al ADN preferentemente con el nitrógeno en posición 7 de la guanina, formando aductos de ADN (Figura 10), los cuales causan alteraciones en la molécula de ADN como

desenrollamiento de la doble hélice o doblamiento de la molécula teniendo generalmente como desenlace final la muerte por apoptosis. Los aductos formados impiden la replicación y transcripción del ADN [44].

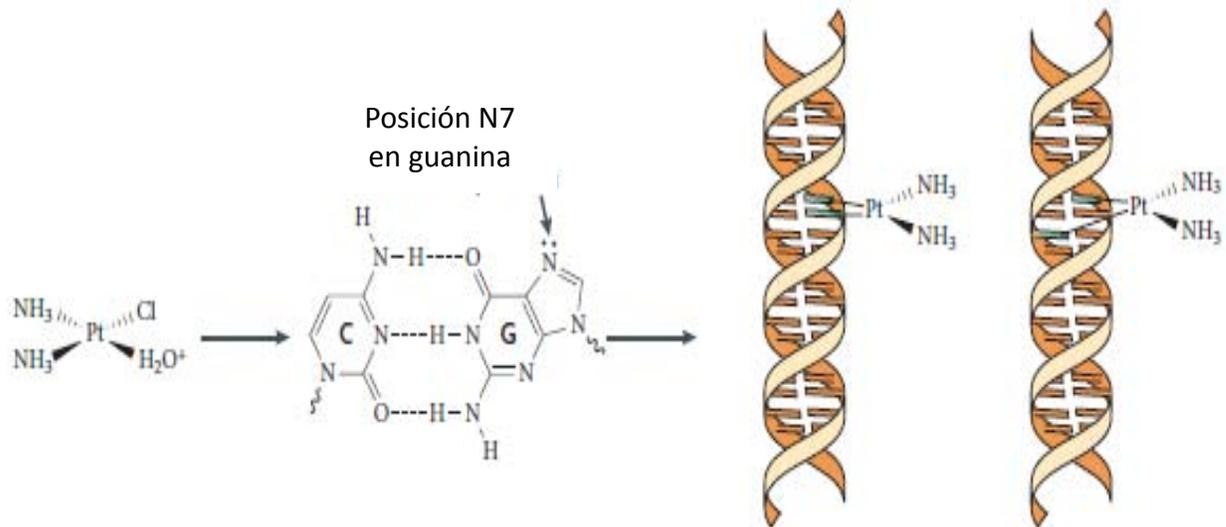


FIG. 10 Unión del cisplatino al ADN. El cisplatino se vuelve activo después de la acuación que sufre en el interior de la célula y se une principalmente de forma covalentemente a la guanina en el nitrógeno en posición 7 en la molécula de ADN. Modificado de Kelland, L. 2007 [44].

4. Metabolismo de la célula cancerosa como blanco terapéutico

La reprogramación del metabolismo energético de la célula es una característica fundamental de gran parte de las células presentes en muchos tipos de tumores. Por lo tanto, algunos intermediarios de las vías involucradas son blancos potenciales para una terapia adyuvante dirigida contra células susceptibles, que junto a la terapia administrada actualmente, podría ayudar incluso a disminuir las dosis de esta última y lograr menor citotoxicidad hacia las células normales.

4.1. Metformina

La N',N'-dimetilbiguanida o metformina es un compuesto semisintético derivado de la gualina y pertenece a la clase de biguanidas orales que actúan como agentes hipoglucémicos. Es el fármaco más ampliamente usado para el tratamiento de la diabetes tipo II, es muy segura pues sólo se asocia a baja incidencia de acidosis láctica, principalmente en pacientes con mala función renal o mayores de 80 años y sólo el 5% de pacientes son intolerantes a ella [45]. En pacientes diabéticos también confiere protección cardiovascular debido a su acción favorable sobre el

metabolismo de lípidos. El efecto que tiene sobre la concentración de glucosa se debe principalmente a que reduce la producción hepática de glucosa y su absorción en el intestino. En este proceso se encuentran involucradas LKB1/cinasa de residuos de serina y treonina (STK) 11, que controlan la vía de la proteína cinasa activada por monofosfato de adenosina (AMP) (AMPK)/ blanco de rapamicina en mamífero (mTOR) y genes neoglucogénicos. Su acción sobre el metabolismo de lípidos se debe a que incrementa la oxidación de ácidos grasos mediante la fosforilación de acetil CoA carboxilasa por AMPK, además aumenta la afinidad del receptor de insulina (IR) por la insulina [45, 46]. Mediante estudios retrospectivos en pacientes con diabetes tipo II que tomaban metformina se estableció una relación entre ésta y menor incidencia y mortalidad de diversos tipos de cáncer, por lo que se generó interés sobre el posible efecto terapéutico del fármaco [47, 48]. Adicionalmente se ha observado que la metformina presenta efecto antiproliferativo sobre diversas líneas celulares de cánceres humanos y de ratones. El mecanismo mediante el cual ejerce estos efectos no se conoce con claridad, sin embargo, se ha visto que aumenta la actividad de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4, lo que eleva la entrada de glucosa a la célula, además provoca inhibición dependiente de dosis y tiempo del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial y altera la expresión de diversas enzimas que participan en la vía glicolítica [49]. La acción de la metformina sobre la proliferación celular y síntesis de proteínas se da mediante la activación de AMPK, posiblemente por la inhibición que ejerce sobre el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, o como se mencionó anteriormente mediante la activación de LKB1, sin embargo, algunas células como HeLa, expresan LKB1 mutada por lo que se ha propuesto la acción independiente de AMPK en la que la inhibición de mTOR ocurre de manera dependiente de la GTPasa Rag [50, 51]. También se ha observado que la merformina activa AMPK independiente de LKB1 mediante la activación del gen mutado de ataxia telangiectasia (ATM) [52].

mTOR es una molécula involucrada en el crecimiento de la célula, promueve la traducción de ácido ribonucleico mensajero (mARN) e inhibe autofagia, integra señales de nutrientes generadas por aminoácidos, factores de crecimiento como el factor de crecimiento parecido insulina (IGF), señales energéticas que actúan a través de AMPK y diversas señales de estrés como hipoxia y daño al ADN, y promueve supervivencia celular mediante la activación de Akt. Pertenece a la familia de proteínas cinasas relacionadas a fosfoinositol 3 cinasa (PIKK) [53].

mTOR es la subunidad catalítica de dos complejos: complejo mTOR 1 (mTORC1) y complejo mTOR 2 (mTORC2), los cuales se distinguen por proteínas accesorias únicas a cada uno, siendo la proteína reguladora asociada a mTOR (RAPTOR) característica de mTORC1 y el ayudante de mTOR insensible a rapamicina (RICTOR) de mTORC2. Ambos funcionan como andamios para ensamblar los

complejos y unir sustratos y reguladores. mTORC2 está implicado principalmente en la promoción de la supervivencia celular y mTORC1 con las demás funciones [35]. Esta vía está regulada por AMPK, la cual inhibe a mTOR en respuesta a disminución de ATP y otros factores (Figura 11). La vía AMPK/mTOR está bajo el control de LKB1, que es una cinasa de residuos de serina/treonina que actúa como supresor de tumor y que una vez activada fosforila y activa AMPK, la cual inhibe mTOR vía la proteína de esclerosis tuberosa 2 (TSC-2) [46].

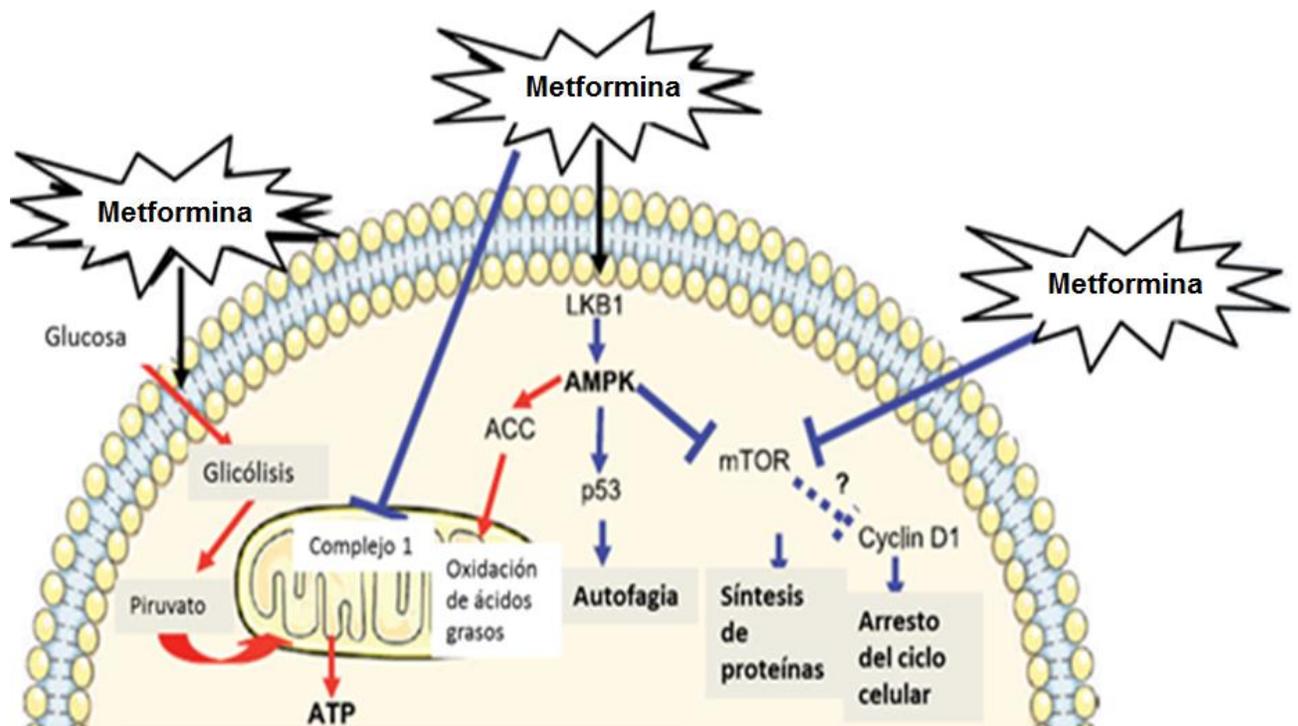


FIG. 11 Mecanismos de acción de la metformina. La metformina mejora la toma de glucosa por parte de la célula, inhibe el complejo 1 en mitocondria e inhibe mTOR mediante la activación de AMPK, además también regula la autofagia por esta misma activación. Modificado de Sahra, E. 2010 [46].

4.2. Oxamato

El oxamato es la sal de la media-amida de ácido oxálico que se caracteriza por inhibir la enzima lactato deshidrogenasa debido a que es un homólogo isostérico e isoelectrónico del piruvato [54–56].

LDH es una enzima tetramérica que contiene dos subunidades principales, la A y la B que resultan en cinco isoenzimas que catalizan la conversión en ambos sentidos entre piruvato y lactato. LDHA predomina en músculo esquelético y

favorece la conversión de piruvato a lactato acoplada a la oxidación de NADH a NAD⁺, importante para mantener la glicólisis debido a que es necesario para el paso catalizado por GADPH, mientras que LDHB participa en la conversión de lactato a piruvato para ser posteriormente oxidado [57, 58].

Se ha observado aumento en la expresión de LDHA en diversos tipos de tumor y que el oxamato inhibe preferentemente esta isoforma [59].

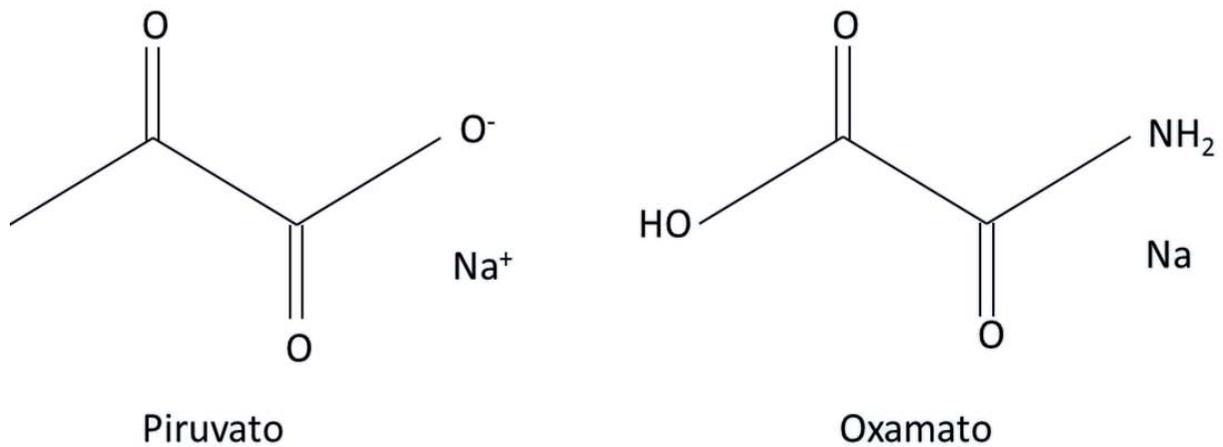


FIG. 12 Estructuras del piruvato y el oxamato. El oxamato es homólogo isoelectrico e isostérico del piruvato, por lo que compite con él inhibiendo la actividad de LDH sobre el piruvato.

VI. Planteamiento del problema

El cáncer cérvico uterino es la cuarta causa de muerte en mujeres a nivel mundial por enfermedades oncológicas, afectando principalmente a países en vías de desarrollo como el nuestro. Lo anterior debido a que se detectan las pacientes en estados avanzados y a que los tratamientos quimioterapéuticos actuales son agresivos, no muy efectivos y con gran porcentaje de recurrencia de enfermedad, es por esto que son necesarias otras alternativas más efectivas y seguras para su tratamiento. Se conoce que la célula tumoral hace modificaciones a su metabolismo, caracterizadas por un incremento considerable en la actividad glicolítica para proveerse de energía e intermediarios necesarios para la síntesis de macromoléculas, siendo la vía glicolítica un blanco potencial para la destrucción de una población de células tumorales. La metformina, un fármaco utilizado para el tratamiento de la diabetes tipo II, actúa principalmente sobre la producción de glucosa hepática, y el oxamato, un inhibidor de la lactato deshidrogenasa, han demostrado que junto con fármacos utilizados actualmente, disminuyen considerablemente el crecimiento y la proliferación de células tumorales en diversos tipos de cáncer.

VII. Hipótesis

Considerando que la metformina y el oxamato participan en la inhibición de vías bioquímicas de generación de energía e intermediarios de la célula tumoral, su empleo como terapia adyuvante en un modelo *in vivo*, potenciará el efecto del tratamiento con cisplatino en la reducción de la masa tumoral de cáncer cervicouterino.

VIII. Objetivos

-Objetivo general

Determinar el efecto adyuvante de la metformina y el oxamato con cisplatino en la inhibición del crecimiento tumoral con una línea celular de cáncer cérvico uterino, en comparación con el tratamiento convencional con cisplatino en un modelo *in vivo* de ratón.

-Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de los tres fármacos sobre la inhibición de la proliferación celular *in vitro* de la línea celular HeLa derivada de cáncer cérvico uterino, mediante el ensayo de la sulfurodamida B.
2. Determinar la viabilidad celular a diferentes tiempos después de someter a las células a tratamientos con los fármacos individuales y sus diferentes combinaciones.
3. Determinar la presencia de marcadores de apoptosis inducida por el tratamiento con cisplatino y los tratamientos conjuntos de metformina/oxamato y metformina/oxamato y cisplatino.
4. Estandarizar en un modelo *in vivo* con ratones hembras desnudos la cantidad de células necesarias para el desarrollo tumoral generado por la línea celular HeLa.
5. Probar el efecto de los diferentes tratamientos administrados en un modelo *in vivo* de ratón hembra desnudo en la inhibición de la proliferación celular y crecimiento tumoral y compararlos con el tratamiento convencional con cisplatino.

IX. Antecedentes

La relación entre pacientes con diabetes y el cáncer ha sido del interés de investigadores por más de 100 años, incluso se llegó a pensar en los niveles de glucosa circulante como un tipo de marcador para el cáncer [60, 61]. En un inicio, los estudios que se realizaron fueron retrospectivos y se observó mayor incidencia de cáncer en pacientes diabéticos, de hecho, entre el 8-18% de nuevos diagnósticos de cáncer se da en pacientes con diabetes *mellitus* tipo 2 [62]. Dichos estudios llevaron a la evaluación de las distintas terapias administradas a los pacientes diabéticos donde se observó menor mortalidad por cáncer en los pacientes que habían recibido metformina en comparación con aquellos tratados con sulfonilureas o terapias basadas en insulina e incluso dentro del grupo de pacientes tratados con metformina se reportó menor mortalidad en aquellos tratados con dosis mayores del fármaco, demostrando también su relación dosis-respuesta [47, 62–64].

Desde 1970 se propusieron a las biguanidas, en especial a la fenformina, como posible tratamiento contra el cáncer y se observó reincidencia retardada de la enfermedad en pacientes de cáncer de mama y colon tratados con este fármaco e incluso, disminución del tamaño tumoral en modelos de ratón [65]. Posteriormente, estudios clínicos y preclínicos utilizando metformina como agente anticanceroso han demostrado reducir la incidencia o la masa tumoral en modelos de ratón de cáncer de mama [66]

Como se mencionó anteriormente, el mecanismo exacto mediante el cual ejerce su función la metformina no está del todo esclarecido, sin embargo, se sabe que inhibe al complejo I de la cadena respiratoria, afecta vías relacionadas con la síntesis de lípidos, proteínas y con la progresión del ciclo celular.

A pesar del potencial de la metformina como agente contra el cáncer, se ha demostrado la alta capacidad adaptativa de las células cancerosas, por lo que atacar una vía de producción energética puede provocar un cambio y subsecuente polarización hacia otra vía, por lo que varios investigadores han propuesto atacar ambas vías de producción energética: fosforilación oxidativa y glicólisis. Sobre esta última, un paso importante para la célula cancerosa es la conversión de piruvato en lactato y el reciclaje de NAD⁺, importante para que continúe el flujo glicolítico, que a su vez diverge en varias vías biosintéticas [57, 58].

Una terapia utilizando ambos fármacos junto con el tratamiento convencional con cisplatino afectaría selectivamente a la célula cancerosa y mejoraría el efecto del fármaco citotóxico.

X. Metodología

Cultivo celular

Se cultivó la línea celular HeLa de cáncer cérvico uterino en cajas Petri de 10 cm de diámetro con medio RPMI enriquecido con suero fetal bovino (SFB) al 5%. Las células se mantuvieron en un incubador Thermo a 37 °C, con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad.

Determinación de la concentración inhibitoria (IC) 50 por sulforodamina B (SRB)

Se sembraron 3 cajas de 96 pozos de fondo plano 2000 células por pozo por 48 h. Transcurrido este tiempo se administraron diferentes concentraciones de los fármacos: cisplatino, metformina y oxamato (tabla 1) y se incubó por 48 h. Transcurridas las 48 h, las células fueron fijadas con ácido tricloroacético (TCA) al 10 %, se incubó cada caja por 1 h a 4 °C, después se realizaron 4 lavados con agua corriente y se dejaron secar las cajas. Posteriormente, se adicionaron 100 µl de SRB 0.057 % en ácido acético 1 % a cada pozo y se dejó en reposo a temperatura ambiente por 30 m, inmediatamente después se enjuagaron las cajas 4 veces con ácido acético al 1 % y se dejaron secar. Por último, se adicionaron 200 µl de Tris base (10 mM, pH 10.5) y se agitó por 10 m a temperatura ambiente, después se midió la densidad óptica a 490 nm en un espectrofotómetro (Dy nex technologies) y se calculó el porcentaje de inhibición para después graficar el porcentaje de inhibición vs concentración, obteniendo así, las curvas patrón a las cuales se les hizo regresión lineal para obtener el valor de la IC50.

De forma simultánea se sembró una caja de tiempo 0, donde se sembraron 2000 células por pozo, las cuales se dejaron incubando a 37 °C y 5 % de CO₂ por 48 h, al mismo tiempo en que las demás placas recibieron tratamiento, ésta se fijó con 100 µl de TCA 10 % por 1 h a 4 °C y posteriormente se le realizó el mismo procedimiento que a las demás cajas.

TABLA 1. Concentraciones de metformina, cisplatino y oxamato. Concentraciones administradas de los fármacos para la obtención de curvas patrón para determinar la IC50 de cada uno.

Fármaco	Concentración (µM)					
Cisplatino	0.1	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
	Concentración (mM)					
Metformina	25	35	45	55	65	75
Oxamato	10	20	30	40	50	60

Evaluación de la viabilidad celular por tinción con cristal violeta.

Se sembraron 5000 células en 3 cajas de 48 pozos y se dejaron en cultivo 48 h, después de ese tiempo las células fueron tratadas con las IC50 de los fármacos individuales (excepto donde se indica) y las diferentes combinaciones entre ellos (tabla 2). Posterior a la exposición a los distintos tratamientos por 12 h, 24 h y 48 h se adicionaron a cada pozo 200 µl de medio-glutaraldehído (Anexo) y se dejaron fijando por 10 m a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se extrajo el sobrenadante, se lavó 3 veces con agua y se dejaron secar las cajas. Una vez secas, se agregaron 200 µl de cristal violeta y se incubaron por 10 m a temperatura ambiente en agitación, después de la incubación los pozos se lavaron con agua corriente y se dejaron secar. Para la lectura de las cajas se añadieron 400 µl de ácido acético 10 % y se resuspendió el colorante con una micropipeta de 1 ml, posteriormente, 200 µl de la disolución resuspendida se colocaron en cajas de 96 pozos para su lectura a 595 nm en un micro lector de placas.

Se obtuvieron los porcentajes de viabilidad celular tomando como 100% de viabilidad a las células control que no recibieron ningún tratamiento y se graficó el porcentaje de viabilidad contra el tiempo en horas.

TABLA 2. Tratamientos administrados para la determinación de viabilidad celular por cristal violeta. Lista de los diez diferentes tratamientos que se administraron a las células para determinar el porcentaje de viabilidad por tinción con cristal violeta.

Grupo	Tratamiento
1	Sin tratamiento
2	Cisplatino
3	Metformina
4	Oxamato
5	Cis+Met
6	Cis+Ox
7	Met+Ox
8	Cis+Met+Ox
9	Cis(IC25)+Met+Ox
10	Cis(IC25)+Met(IC25)+Ox

Determinación de la presencia de marcadores de apoptosis

Se determinó la presencia de los marcadores de apoptosis: PARP-1 y caspasa 3, mediante la técnica de Western Blot. Para ello se cultivaron células en cajas Petri de 10 cm de diámetro hasta obtener una confluencia de 70-80 %. Posteriormente,

los cultivos fueron tratados con cisplatino, metformina/oxamato o cisplatino (IC25)/metformina/oxamato, o no recibieron tratamiento y se extrajeron proteínas a 3 h, 6 h, 12 h y 24 h posteriores al tratamiento. Adicionalmente un cultivo se expuso a UV por 10 m y 3 h, para inducir apoptosis y después se extrajeron las proteínas.

Para la extracción de proteína se decantó el medio de cultivo, a partir de ese punto se trabajó en hielo, posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS frío (Anexo) y una tercera vez con PBS+inhibidores de proteasas (fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM). Posteriormente se raspó la caja Petri con un gendarme, se realizaron dos lavados adicionales con PBS+PMSF y se recolectó en un tubo cónico. La muestra se centrifugó a 2000 rpm por 5 m y el botón se lisó con buffer de lisis (Anexo) a una concentración de 150 mil células/ 20 μ l. Finalmente, se sonicó la muestra en hielo por 60 s.

Tras la extracción se realizó una electroforesis SDS-poliacrilamida. Primero, se prepararon geles de poliácridamida al 8 % para PARP-1 y al 14 % para caspasa 3 y se cargaron 20 μ l del extracto de proteína en cada pozo. La electroforesis se corrió a 90 V por 2 h aproximadamente. Transcurrido ese tiempo se realizó una transferencia húmeda a una membrana de transferencia de fluoruro de polivinilideno (PVDF) a 45 V por 12 h. La membrana transferida se bloqueó por 1 h con leche al 5 % en TBS Tween y se incubó toda la noche con el anticuerpo (Ab) primario correspondiente a los marcadores de apoptosis mencionados y se co-incubaron con Ab anti- β -actina en albúmina al 1 % en TBS Tween. A la mañana siguiente la membrana se lavó con TBS Tween y se incubó por 1 h con el Ab secundario. Transcurrida la incubación la membrana se lavó con TBS Tween por y un lavado final con TBS, después se agregó el sustrato de detección Supersignal WestPico (Thermo) y se adquirió la imagen de la membrana en cuarto oscuro. Finalmente, se utilizó el programa Image J, para realizar la densitometría de las imágenes.

Experimentación *in vivo*

La experimentación *in vivo* se llevó a cabo con ratones hembras atímicos (*Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}*). Primero, se estandarizó el número de células a inocular y el tiempo óptimo para la generación del tumor con la línea celular HeLa. Para ello se inyectaron 100 μ l de una suspensión de células en solución salina en diferentes concentraciones: 3, 5, 10 y 15 millones de células vía subcutánea. Las células a inocular se mantuvieron en condiciones estériles y fueron preparadas el mismo día que se inculó. El desarrollo del tumor se evaluó durante un periodo de 21 días. A los animales se les midió la masa diariamente y fueron revisados hasta que se detectaron la aparición de masas tumorales visibles. Después de la detección del

tumor, éste midió con vernier para establecer su tasa de crecimiento. El volumen del tumor fue determinado con la fórmula: $(0.52)(\text{ancho}^2)(\text{largo})$ [67].

Una vez conocidos el tiempo para el desarrollo de tumor y la cantidad de células necesarias, se procedió a la inoculación de la cantidad celular determinada. A los ratones les fue medida la masa y el tamaño del tumor diariamente. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 0.2 cm^3 se procedió a la administración de los fármacos vía intra-peritoneal (ip). Los grupos experimentales (tabla 3) estuvieron conformados por 5 animales cada uno y la administración de los fármacos se realizó cada 24 h por 15 días.

TABLA 3. Esquema de tratamiento para la experimentación *in vivo*. Tratamiento administrado a los distintos grupos de ratones. Los fármacos se administraron, dependiendo la masa de los ratones, en base a las siguientes dosis: cisplatino (2 mg/kg), metformina (200 mg/kg) y oxamato (15 mg/kg). Se administró la mitad de la dosis señalada donde se indica ($\frac{1}{2}$).

Grupo	Tratamiento
1	Cisplatino
2	Cis/Met
3	Cis/Ox
4	Cis/Met/Ox
5	Cis $\frac{1}{2}$ /Met/Ox
6	Cis $\frac{1}{2}$ /Met $\frac{1}{2}$ /Ox
7	Met/Ox
8	Sin tratamiento

XI. Resultados

Determinación de la concentración inhibitoria (IC) 50

Se determinó la concentración inhibitoria del 50% de crecimiento de la línea celular HeLa tras la exposición a cada fármaco por 48 h mediante la técnica de SRB. En la tabla 4 se muestran los valores de IC50 obtenidos para los tres fármacos. Para ello, se obtuvieron curvas patrón donde se graficó % de inhibición de crecimiento contra concentración de fármaco administrada y se obtuvo la ecuación de la recta de cada una mediante regresión lineal, para posteriormente calcular la concentración de fármaco que inhibe el 50 % de crecimiento.

TABLA 4. Valores de IC50 para cisplatino, metformina y oxamato a 48 h en la línea celular HeLa. Los valores son presentados como el promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Fármaco	IC50
Cisplatino	2.57 \pm 0.81 μ M
Metformina	41.79 \pm 0.59 mM
Oxamato	28.91 \pm 3.76 mM

Determinación de la viabilidad celular tras el tratamiento con los diferentes fármacos y sus combinaciones.

La viabilidad celular medida como el porcentaje de células vivas con respecto a un grupo control sin tratamiento se midió mediante la tinción con cristal violeta. El cultivo celular se expuso a tratamientos con los fármacos individuales y diferentes combinaciones de los fármacos por 12 h, 24 h y 48 h. En la figura 13 se observa que los grupos tratados individualmente con metformina y oxamato y aquellos con la combinación cis+met no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de viabilidad celular con respecto al control positivo, tratado únicamente con cisplatino (barra negra). También muestra que el grupo tratado con la combinación cis+ox mostró menor viabilidad 24 h después del tratamiento y que en los cultivos tratados con: met/ox, cis+met+ox, cis (IC25)+met+ox y cis

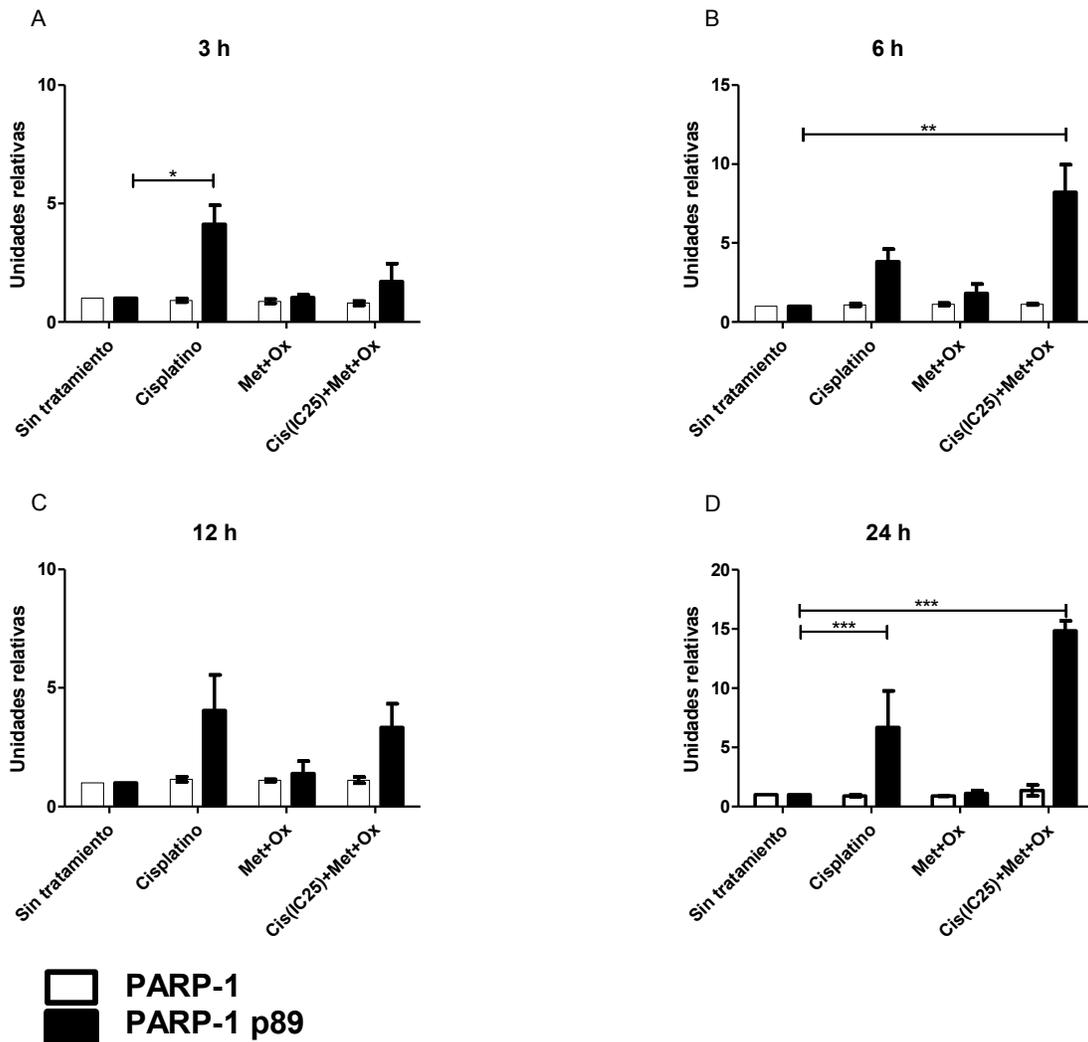
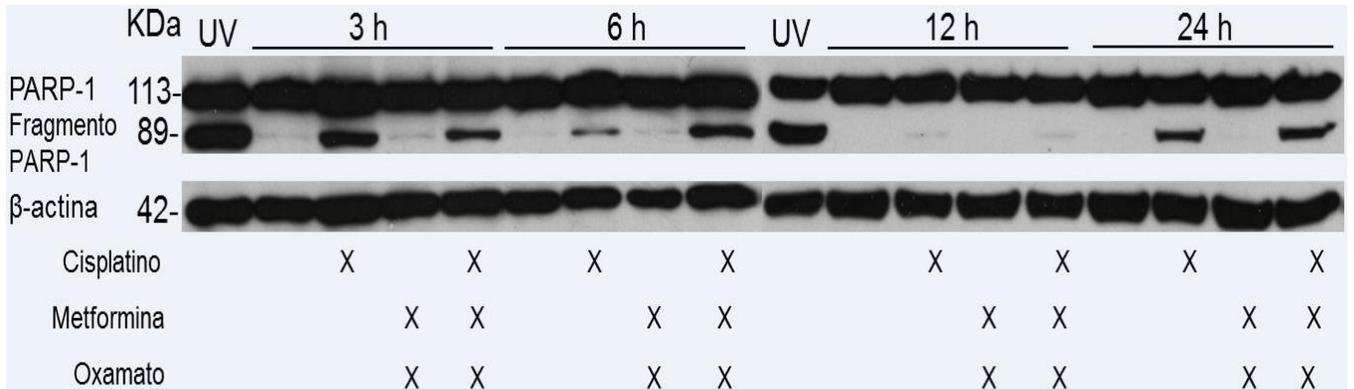


FIG. 14. Western blot y densitometrías para PARP-1 y PARP-1 fragmento p89. Detección por western blot de la presencia de PARP-1 y el fragmento escindido de 89 kDa de PARP-1 después recibir tratamiento por 3 h (panel A), 6 h (panel B), 12 h (panel C) y 24 h (panel D) con cisplatino, met+ox, cis(IC50)+met+ox, o no recibir tratamiento alguno (superior). Densitometría de los resultados de la presencia de PARP-1 y el fragmento escindido de 86 kDa de PARP-1 tras recibir los tratamientos ya mencionados. Los resultados se expresan como el promedio de tres experimentos independientes \pm la SD. Prueba de ANOVA de un factor con comparación Bonferroni *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

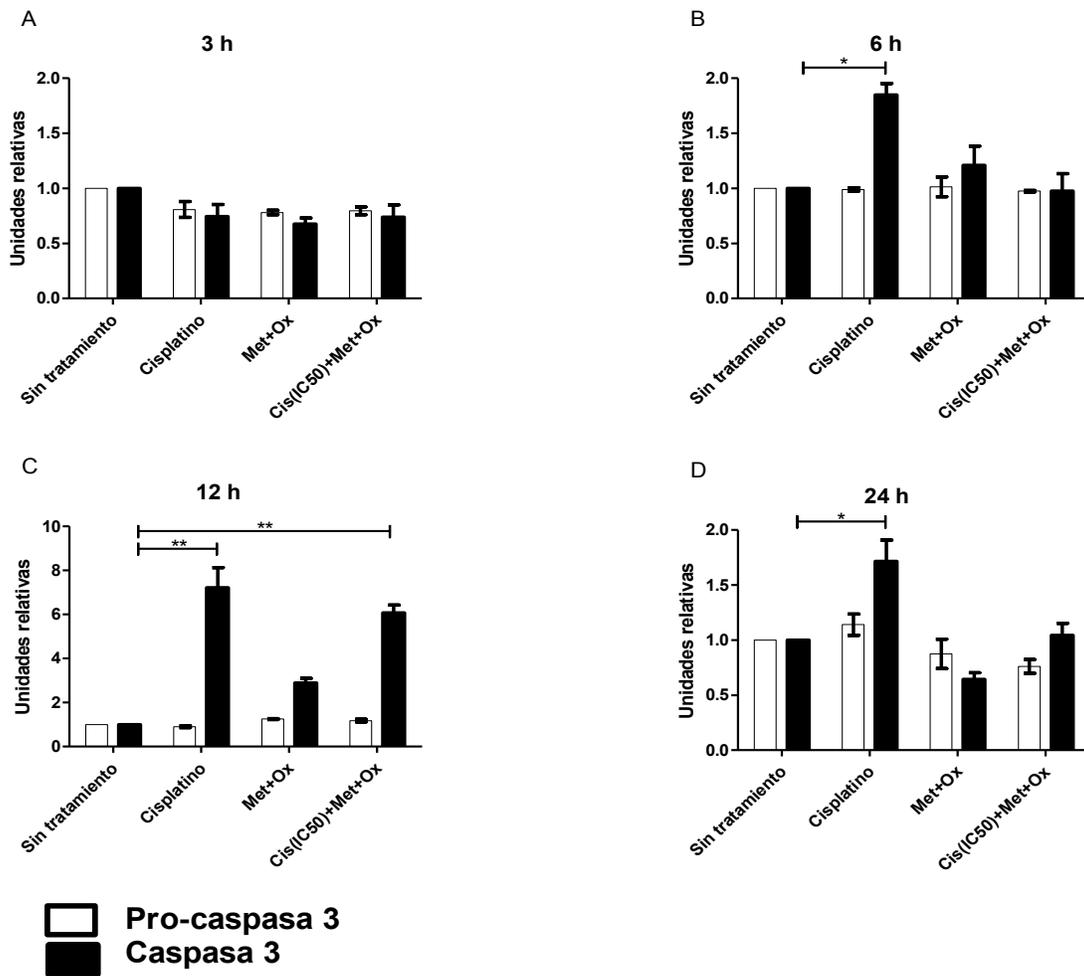
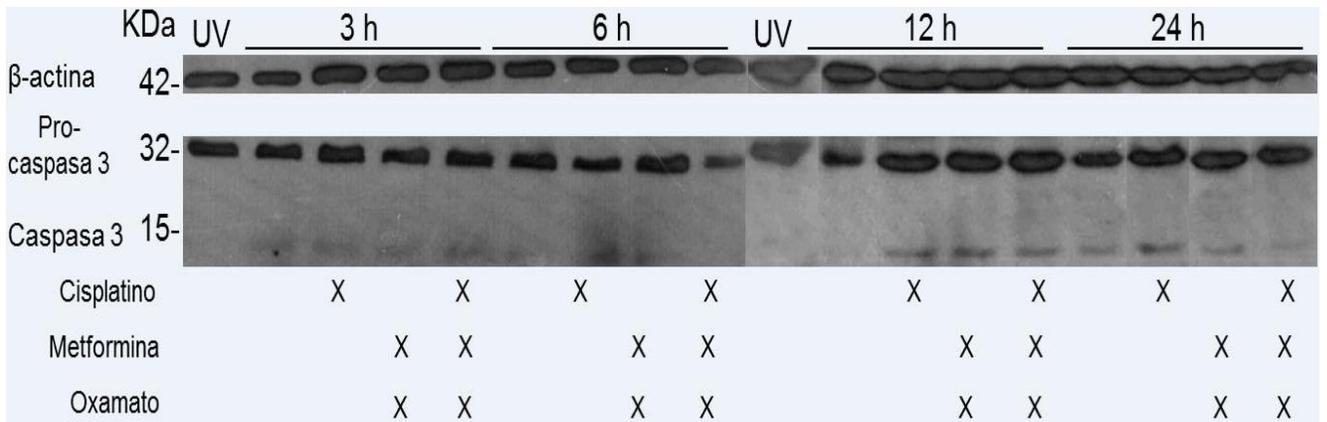


FIG. 15. Western blot y densitometrías para pro-caspasa 3 y caspasa 3. Detección por western blot de la presencia de pro-caspasa 3 y caspasa 3 después recibir tratamiento por 3 h (panel A), 6 h (panel B), 12 h (panel C) y 24 h (panel D) con cisplatino, met+ox, cis(IC50)+met+ox, o no recibir tratamiento alguno (superior). Densitometría de los resultados de la presencia de pro-caspasa 3 y caspasa 3 de PARP-1 tras recibir los tratamientos ya mencionados. Los resultados se expresan como el promedio de tres experimentos independientes \pm la SD. Prueba de ANOVA de un factor con comparación Bonferroni *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

Evaluación del desarrollo tumoral en ratones desnudos inoculados con diferentes densidades celulares.

En la figura 16 se muestra la cinética del crecimiento tumoral por 21 días de grupos de ratones inoculados con diferentes densidades celulares. Brevemente, se inocularon vía subcutánea ratones desnudos hembras con 3, 5, 10 y 15 millones de células, los tumores fueron medidos con vernier a diferentes días después de que el tumor fuera detectable a simple vista y su volumen fue determinado como se describió previamente. Lo anterior fue para determinar la densidad celular a inocular y conocer el tiempo óptimo de desarrollo del tumor para poder iniciar la administración de los diversos tratamientos (tabla 3) a los ratones. Los tratamientos iniciaron cuando el tumor alcanzó un volumen de aproximadamente 0.2 cm³.

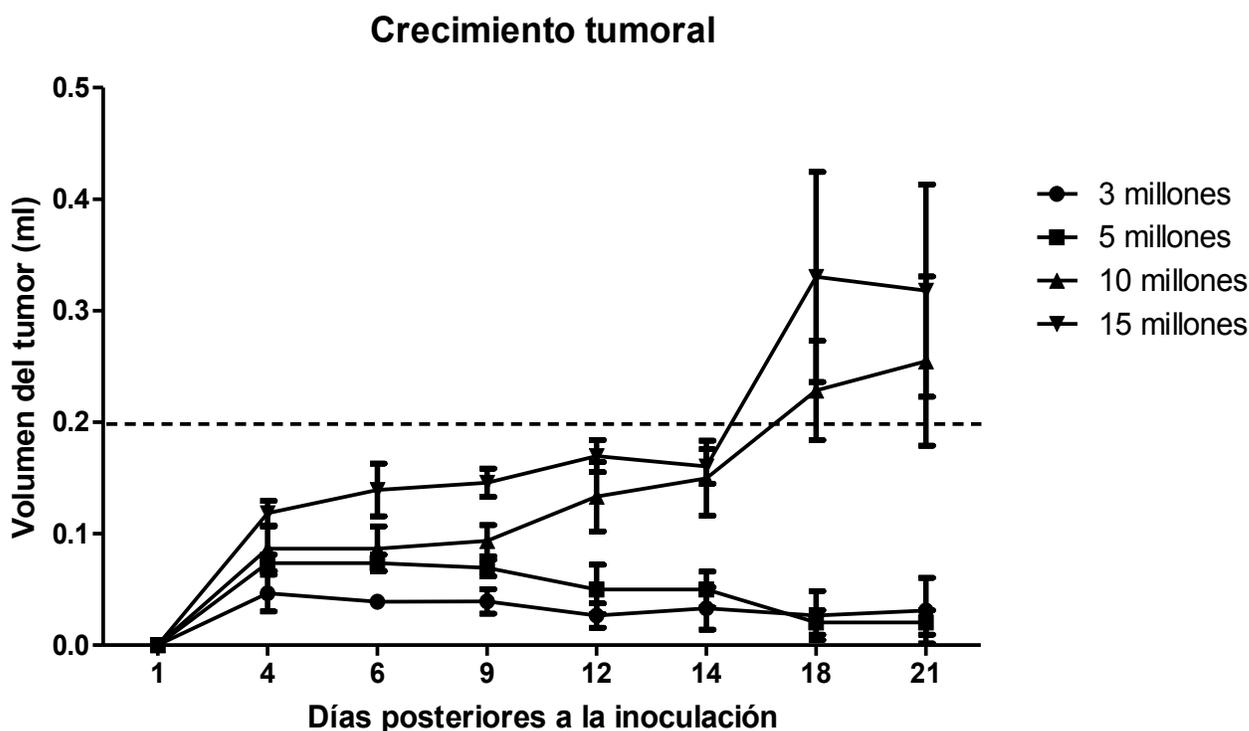


FIG. 16. Cinética de crecimiento de tumor en ratones desnudos inoculados con diferentes densidades celulares. Cinética del crecimiento tumoral en ratones hembra desnudos inoculados con 3, 5, 10 y 15 millones de células. El volumen deseado es de aproximadamente 0.2 ml (mostrado con línea punteada). Los resultados se expresan como el promedio \pm la SD de al menos tres ratones.

Cuando los ratones fueron inoculados con 10 y 15 millones de células, la detección de tumores visibles se presentó a partir del cuarto día. Aproximadamente dos semanas después de la inoculación los tumores triplicaron su tamaño y alrededor de los días 15 y 17, los ratones inoculados con 15 y 10

millones respectivamente, alcanzaron el tamaño deseado de 0.2 cm^3 . En el último día de medición, los ratones inoculados con 15 millones había alcanzado un volumen aproximado de 0.3 cm^3 , mientras que los ratones inoculados con 10 millones de células presentaban tumores con un volumen aproximado de 0.25 cm^3 .

Evaluación del efecto de los diferentes tratamientos sobre xenógrafos implantados en ratones desnudos.

Se inocularon vía subcutánea 10 millones de células HeLa en el flanco derecho de ratones hembras desnudos. El crecimiento tumoral se determinó cada día como se describió previamente y una vez que el tumor alcanzó un volumen de aproximadamente 0.2 ml se inició la administración de los diferentes tratamientos. Los resultados fueron normalizados tomando como 0 al tamaño inicial del tumor, es decir, el tamaño que tenía cuando se inició el tratamiento de cada ratón.

En la figura 18 se muestra que después de 5 días de iniciado el tratamiento los grupos administrados con cis+met, cis+met+ox, cis $^{1/2}$ +met $^{1/2}$ +ox y cis $^{1/2}$ +met+ox mostraron tendencias a la baja con respecto al tamaño inicial del tumor, pero transcurridos 10 días de tratamiento sólo los tratados con cis+met+ox y cis $^{1/2}$ +met+ox mantuvieron esa tendencia. Los ratones tratados con cis+ox y met+ox mostraron crecimiento similar a los que no recibieron tratamiento después de 5 días de haber iniciado la administración, mientras que 10 días después los ratones tratados con cis+ox detuvieron su crecimiento acelerado y aquellos con met+ox presentaban tumores incluso de mayor tamaño que los ratones no tratados. Por otro lado, los ratones que recibieron cisplatino como tratamiento mostraron un promedio de tamaño tumoral similar al inicial a los 5 días de tratamiento, sin embargo, 10 días después del inicio los tumores crecieron a la mitad del tamaño de los no tratados y en la última medición el tamaño de los tumores prácticamente no varió.

Finalmente, 15 días después del inicio del tratamiento, sólo los grupos tratados con cis+met y cis+met+ox mostraron tendencias de crecimiento tumoral a la baja con respecto al tamaño inicial y de éstos, sólo el tratamiento con cis+met+ox presentó diferencias estadísticas significativas al compararlo con el tratamiento con cisplatino.

Volumen tumoral

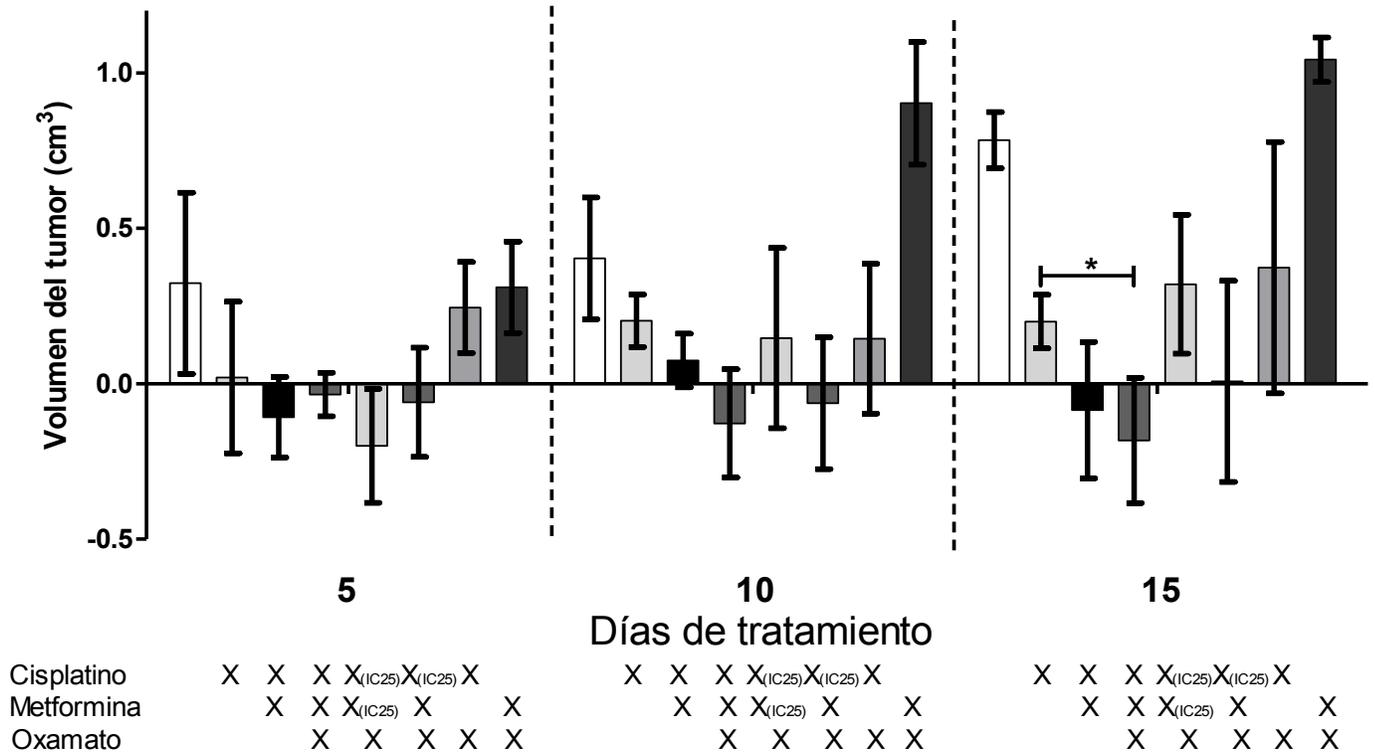


FIG 17. Crecimiento tumoral en ratones a los días 5, 10 y 15 después de haber iniciado los tratamientos. Se midió el crecimiento en volumen (cm^3) que tuvieron los tumores a los días 5, 10 y 15 después de haber iniciado los 8 diferentes tratamientos. Los grupos tratados con las combinaciones: cis+met, cis+met+ox y cis $\frac{1}{2}$ +met+ox mostraron disminución del volumen tumoral inicial, sin embargo, el grupo tratado con cis+met+ox es el único que muestra diferencia estadísticamente significativa con respecto al tratamiento convencional con cisplatino. Los resultados se expresan como el promedio \pm la SD de al menos cuatro ratones. Prueba de ANOVA de dos factores con comparación Bonferroni * $P < 0.05$.

XII. Discusión

Las alteraciones y adaptaciones metabólicas de la célula cancerosa son fundamentales para el desarrollo de la misma y el establecimiento del tumor en cualquier tejido [30–33]. Las primeras descripciones sobre este tema fueron hechas por Otto Warburg donde se reportó mayor presencia de ácido láctico en el medio celular de células cancerosas aún en condiciones aeróbicas y por lo tanto mayor actividad glicolítica [28]. Esta característica continúa siendo considerada como una de las principales modificaciones metabólicas de la célula y ha sido propuesta como blanco terapéutico contra del crecimiento tumoral por diversos autores [58, 68, 69], sin embargo, dado la alta capacidad adaptativa de las células cancerosas, éstas podrían volver a reprogramar su metabolismo y polarizarlo hacia la respiración oxidativa, haciendo necesario el diseño de terapias combinadas que actúen sobre ambas vías para realmente afectar el abasto energético en forma de ATP, la producción de macromoléculas utilizadas para la génesis de nuevas células, la generación de intermediarios y poder reductor como NADH y NADPH, y el desvío del flujo de ambas vías hacia vías anabólicas [27, 32–34, 36, 70] y hacer a las células cancerosas más sensibles a fármacos citotóxicos. Lo anterior es de gran importancia para el tratamiento del cáncer debido a que la terapia actual es muy agresiva y poco o nada selectiva contra las células cancerosas, afectando también a las células no transformadas. En el presente trabajo se probó el efecto de dos fármacos: la metformina, que disminuye los niveles de glucosa, afecta el metabolismo de lípidos [46] y la respiración mitocondrial entre otras mecanismos, mediante la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial [49] y el oxamato, un homólogo isoeléctrico e isostérico del piruvato que actúa como inhibidor competitivo del mismo y bloquea a la enzima LDH, afectando así a la vía glicolítica [55, 56, 71], en un modelo de cáncer cervicouterino, cuyo tratamiento convencional es la administración de cisplatino [42]. La IC50 de los tres fármacos fue determinada 48h después de la exposición mediante la técnica de SRB para obtener resultados comparables con aquellos del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (NCI).

La prevalencia de alguna vía para la generación de energía ha sido medida en líneas celulares de diversos orígenes, en específico, HeLa produce hasta 90% de su ATP mediante la vía oxidativa [33]. La metformina fue asociada a la disminución del riesgo de padecer distintos tipos de cáncer en pacientes con diabetes tipo II tratados con este fármaco en comparación a otros tratamientos, mediante estudios retrospectivos llevados a cabo en diferentes partes del mundo [62, 72], así como a una menor mortalidad por este padecimiento [47]. Dichos efectos han sido relacionados a la acción positiva sobre la activación de AMPK, una molécula que detecta cambios energéticos en la célula principalmente cuando hay modificación en la relación AMP/ATP y favorece el metabolismo catabólico productor de energía sobre el metabolismo anabólico. Dicha activación se da mediante la cinasa de proteínas dependiente de calcio/calmodulina

(CaMKK), la cinasa de proteínas activada por el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) 1 (TAK1) y LKB1, sin embargo, líneas celulares como HeLa presentan mutaciones en esta última cinasa por lo que se ha observado que esta acción favorable de la metformina se da mediante la activación de ATM y ciertas GTPasas como Rag [45, 50–52, 73]. Esta activación de AMPK inhibe la acción de mTOR, implicado en la síntesis de proteínas y lípidos y en la progresión de la células en el ciclo celular [73, 74]. Adicionalmente, se sabe que la metformina es un inhibidor directo e indirecto del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial y que tiene efecto sobre la producción *de novo* de ácidos grasos debido a que bloquea la activación y/o expresión de enzimas como acetil coenzima A carboxilasa (ACC) y ácido graso sintasa (FASN) [45, 46, 74].

Por su parte, el oxamato, inhibidor competitivo de la LDH afecta el flujo de la vía glicolítica tanto aerobia como anaerobia, debido a que no permite la conversión del piruvato en lactato por dicha enzima. Lo anterior tiene como consecuencia la alteración del estado redox, pues afecta la producción de NADH y NADPH, necesarios para otras vías, además todo lo anterior afecta el flujo de la vía glicolítica hacia la vía de las pentosas fosfato, importante para la producción de ácidos nucleicos, e incluso la disminución de intermediarios que participan en ella [75–77]. También fue reportado que el oxamato afecta a la enzima HK, importante para el inicio de la vía glicolítica [77].

Después de la exposición de la línea celular HeLa, a distintos tratamientos (tabla 2) por 12h, el tratamiento con cisplatino presentó entre 80-100% de células vivas con respecto al control sin tratamiento, mientras que las combinaciones de met+ox, cis+met+ox y cis $\frac{1}{2}$ +met+ox disminuyeron en más de 80% el porcentaje de células vivas y la combinación cis $\frac{1}{2}$ +met $\frac{1}{2}$ +ox disminuyó aproximadamente a la mitad el porcentaje de células vivas presentes en el cultivo. Cuando las células fueron expuestas por 24h a los tratamientos, el tratamiento con cisplatino presentó aproximadamente la misma cantidad de células vivas en cultivo que el control sin tratamiento y las combinaciones ya mencionadas inhibieron entre 80% y 90% de células vivas. Finalmente, 48h después de la exposición a los fármacos con el tratamiento con cisplatino se obtuvieron aproximadamente 60% de células vivas, mientras que las combinaciones met+ox, cis+met+ox, cis $\frac{1}{2}$ +met $\frac{1}{2}$ +ox y cis $\frac{1}{2}$ +met+ox sólo entre el 1% y 3% de células estaban vivas. Los grupos que recibieron las combinaciones en donde estaban presentes los fármacos que inhiben tanto la vía glicolítica, como la fosforilación oxidativa fueron los que presentaron mayor efecto sobre la viabilidad celular, independientemente de la concentración de cisplatino administrada e incluso en ausencia de éste. Es importante notar también que, dicho efecto se presentó en el tratamiento con la combinación de fármacos donde se administró la IC25 de metformina. Estos resultados (fig. 13) corresponden con los efectos descritos de ambos fármacos sobre el metabolismo de la célula cancerosa y remarcan la importancia de ser administrados al mismo tiempo pues se demuestra que la administración individual de los fármacos o cada uno en combinación con el cisplatino, a pesar de inhibir la viabilidad celular más que el

tratamiento individual con cisplatino, son menos efectivos que cuando está presente la combinación de ambos fármacos. Es importante subrayar el hecho de que los fármacos actúan principalmente sobre el metabolismo anabólico, el cual es una de las características principales y primordiales de las células tumorales para poderse dividir e incluso para llevar a cabo procesos de invasión y metástasis.

Se considera a la apoptosis como el principal tipo de muerte celular inducida por cisplatino, sin embargo, el tratamiento con cisplatino genera resistencia y se considera el defecto del proceso apoptótico como una de las causas [78, 79], dicha resistencia provoca menor efecto anticanceroso, lo que se suma al elevado daño celular indiscriminado que produce este fármaco [80]. En la determinación de la presencia de los marcadores de apoptosis PARP-1, su fragmento p86, pro-caspasa 3 y caspasa 3 [81–84] se observaron niveles similares cuando los cultivos celulares fueron tratados con cisplatino o la combinación cis(IC25)+met+ox, lo cual sugiere que el tratamiento adyuvante potencia el efecto apoptótico del cisplatino, dado que en el grupo combinado se administró la mitad de la concentración del grupo individual.

A diferencia de lo observado en la experimentación *in vitro*, en los resultados de los experimentos *in vivo* (fig 21), el grupo tratado sólo con met+ox presentó crecimiento tumoral similar al grupo que no recibió ningún tratamiento e incluso se observó un crecimiento más acelerado dentro de los primeros 10 días de haber iniciado la administración de los tratamientos. Por su parte, los grupos a los que se les administraron cisplatino y metformina en cualquier dosis mostraron disminución del tamaño tumoral inicial después de 5 días de tratamiento, pero posteriormente, sólo los grupos tratados con cis+met, cis+met+ox y cis $\frac{1}{2}$ +met+ox mostraron esa tendencia de disminución del tamaño tumoral, siendo el tratamiento propuesto de cis+met+ox el único que siempre mostró disminución del volumen tumoral e incluso diferencias estadísticas significativas con respecto al tratamiento convencional de cisplatino. Importante es resaltar el efecto observado en el grupo administrado con cis+met, debido a que presentó niveles de disminución del tamaño tumoral similares a los del tratamiento triple, lo cual se puede explicar tomando en cuenta lo anteriormente mencionado que la línea celular HeLa basa su producción energética principalmente en la fosforilación oxidativa, por lo que el bloqueo de la vía glicolítica puede no ser tan necesario para afectar células con estas características en tiempos cortos. Por otro lado, el cisplatino, que no mostró efecto importante en los estudios *in vitro*, si demostró que *in vivo* es esencial para la posible eliminación del tumor. Esta marcada diferencia puede deberse a que la acción del cisplatino es mediante alteraciones en el ADN, lo que impide la replicación adecuada, por lo tanto, si las células entran en un estado de menor proliferación, no se puede observar el efecto citotóxico completo del fármaco, pero en un microambiente no controlado como el presente en el estudio *in vivo*, la célula necesita estar activa para no ser eliminada por el organismo que la hospeda y el efecto del cisplatino se vuelve evidente. El efecto de la combinación de los tres

fármacos de disminuir el volumen tumoral se debe a la suma de los efectos individuales de los fármacos que se describió previamente, los cuales afectan la señalización en vías que están involucradas en los tres principios básicos que necesitan las células para dividirse: rápida producción energética, aumento en la síntesis macromolecular y un estado redox adecuado [85], todas las cuales están afectadas en las células cancerosas. Otra característica de la reprogramación metabólica de la célula es que puede consumir fuentes diferentes a la glucosa como la glutamina, glicina y serina para generar intermediarios o precursores de la síntesis macromolecular [86–88], pero el efecto de la acción de los fármacos propuestos como correctores metabólicos de inhibición de vías biosintéticas evita su uso, a pesar de que pudieran ser introducidas a la célula estas fuentes diversas.

A pesar de las importantes diferencias que hay en las condiciones cuando se realizan ensayos *in vitro* o *in vivo*, como los realizados en el presente trabajo, se demostró que la administración combinada de los fármacos que actúan sobre vías metabólicas importantes para el desarrollo de muchas características malignas de la célula cancerosa, disminuye considerablemente el número de células vivas en cultivo en monocapa, mientras que en un modelo de implantación de tumor en ratón, ayudó no sólo a detener el crecimiento, sino a disminuir significativamente su tamaño en comparación con el tratamiento que se administra actualmente de cisplatino.

Se han realizado ya estudios clínicos sobre el uso de la metformina como terapia profiláctica o adyuvante en diferentes tipos de cáncer como el de colon, mama y pulmón [47, 48, 62, 63, 72, 89], sin embargo, pocas pruebas se han hecho utilizando la metformina y un inhibidor de la glicólisis como lo es el oxamato, por lo que será importante realizar este tipo de estudios para comprobar la valía de este tratamiento y determinar el o los tipos de cáncer en los que pueda ser más útil tanto para eliminar al tumor primario, como para evitar la recurrencia de la enfermedad. El uso de este tipo de tratamientos es de suma importancia pues además de los efectos previamente mencionados, los efectos adversos que cada uno de los dos fármacos propuestos como adyuvantes presentan, no son muy frecuentes y son poco severos.

En resumen, el desarrollo de estrategias terapéuticas que afecten diversas moléculas que han sido reprogramadas por las células cancerosas para adquirir muchas de sus características malignas es necesario para ayudar a eliminar los tumores, evitar la recurrencia de la enfermedad y mejorar la calidad de vida del paciente durante la enfermedad y el tratamiento. El tratamiento propuesto en el presente trabajo es un buen candidato, aunque pruebas escaladas en organismos superiores y posteriormente a humanos deberán llevarse a cabo, considerando siempre que dada la heterogeneidad de la enfermedad, se deben conocer las características de cada tipo de cáncer para poder diseñar una estrategia terapéutica exitosa.

XIII. Conclusiones

La administración de las IC50 obtenidas (Tabla 4) de la combinación de los fármacos propuestos como correctores metabólicos disminuyó la viabilidad celular hasta menos del 10 % después de 48 h de exposición, inclusive cuando se administró la mitad de la concentración obtenida de metformina (IC25) independientemente de la presencia o no del cisplatino.

El tratamiento combinado de metformina y oxamato junto con la IC25 de cisplatino mostró niveles similares de PARP-1, PARP-1 fragmento p86, pro-caspasa 3 y caspasa 3 comparados con el tratamiento individual con la IC50 de cisplatino.

La inoculación de 10 millones de células fue suficiente para desarrollar tumores con un volumen de 0.2 ml en aproximadamente dos semanas.

El tratamiento adyuvante propuesto de metformina con oxamato, junto con cisplatino detuvo el crecimiento y disminuyó el tamaño inicial de los tumores y tuvo mayor efecto que la administración del cisplatino de forma individual.

XIV. Bibliografía

1. <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>
2. Longe J: *The Gale Encyclopedia of Cancer: A Guide to Cancer and Its Treatments*. 2005.
3. Greaves M, Maley CC: **Clonal evolution in cancer**. *Nature* 2012, **481**:306–13.
4. Mayr C, Bartel DP: **Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells**. *Cell* 2009, **138**:673–84.
5. Croce CM: **Oncogenes and cancer**. *N Engl J Med* 2008, **358**:502–11.
6. Macleod K: **Tumor suppressor genes**. *Curr Opin Genet Dev* 2000, **10**:81–93.
7. Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T: **Human DNA repair genes**. *Science* 2001, **291**:1284–9.
8. DeVita V, Lawrence T RS: *Cancer, Principles & Practice of Oncology*. 8a edition. Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
9. Weinberg RA: *The Biology of Cancer*. Garland Science, Taylor & Francis Group; 2007.
10. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx
11. Hanahan D, Weinberg RA, Francisco S: **The Hallmarks of Cancer**. 2000, **100**:57–70.
12. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: The next generation**. *Cell* 2011:646–74.
13. Hanahan D, Weinberg R a.: **Hallmarks of cancer: The next generation**. *Cell* 2011, **144**:646–74.
14. Hanahan D, Coussens LM: **Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment**. *Cancer Cell* 2012, **21**:309–22.
15. Adams JM, Cory S: **The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy**. *Oncogene* 2007, **26**:1324–37.
16. Fulda S, Debatin K-M: **Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy**. *Oncogene* 2006, **25**:4798–811.

17. Kroemer G, Mariño G, Levine B: **Autophagy and the integrated stress response.** *Mol Cell* 2010, **40**:280–93.
18. Devenish RJ KD: **Autophagy: mechanism and physiological relevance “brewed” from yeast studies.** *Front Biosci* 2012, **4**:1354–63.
19. Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G: **Does Autophagy Contribute to Cell Death ?** 2005, **1**:66–74.
20. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang F-T, Zhou T-T, Liu B, Bao J-K: **Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis.** *Cell Prolif* 2012, **45**:487–98.
21. Chaabane W, User SD, El-Gazzah M, Jaksik R, Sajjadi E, Rzeszowska-Wolny J, Los MJ: **Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer.** *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2013, **61**:43–58.
22. Collado M, Serrano M: **Senescence in tumours: evidence from mice and humans.** *Nat Rev Cancer* 2010, **10**:51–7.
23. Carmeliet P: **Angiogenesis in life, disease and medicine.** *Nature* 2005, **438**:932–6.
24. Carmeliet P: **Angiogenesis in health and disease.** *Nat Med* 2003, **9**:653–60.
25. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR: **A molecular signature of metastasis in primary solid tumors.** *Nat Genet* 2003, **33**:49–54.
26. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G: **Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion.** *Nat Rev Immunol* 2006, **6**:715–27.
27. Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Rodríguez-Enríquez S, Encalada R, Moreno-Sánchez R, Saavedra E: **Modeling cancer glycolysis.** *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 2011, **1807**:755–67.
28. Warburg O: **On the Origin of Cancer Cells.** 1956, **123**:309–14.
29. Chen Z, Lu W, Garcia-Prieto C, Huang P: **The Warburg effect and its cancer therapeutic implications.** *J Bioenerg Biomembr* 2007, **39**:267–74.
30. Ward PS, Thompson CB: **Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate.** *Cancer Cell* 2012, **21**:297–308.
31. Gottlieb E, Tomlinson IPM: **Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update.** *Nat Rev Cancer* 2005, **5**:857–66.

32. Marín-Hernández A, Rodríguez-Enríquez S, Vital-González P a., Flores-Rodríguez FL, Macías-Silva M, Sosa-Garrocho M, Moreno-Sánchez R: **Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells: Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase.** *FEBS J* 2006, **273**:1975–88.
33. Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Saavedra E, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC: **The bioenergetics of cancer: Is glycolysis the main ATP supplier in all tumor cells?** *BioFactors* 2009, **35**:209–25.
34. Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E: **Energy metabolism in tumor cells.** *FEBS J* 2007, **274**:1393–418.
35. Cantor JR, Sabatini DM: **Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces.** *Cancer Discov* 2012, **2**:881–98.
36. Moreno-Sánchez R, Marín-Hernández A, Saavedra E, Pardo JP, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S: **Who controls the ATP supply in cancer cells? Biochemistry lessons to understand cancer energy metabolism.** *Int J Biochem Cell Biol* 2014, **50**:10–23.
37. Denny L., Bhatla N. WS: **Human papillomavirus and cervical cancer: prevention and treatment with emphasis on low-resource settings.** *UICC World Cancer Campaign* 2010:18–25.
38. Quinn MA, Benedet JL, Odicino F, Maisonneuve P, Beller U, Creasman WT, Heintz APM: **Carcinoma of the Cervix Uteri.** 2006, **95**:S43–S103.
39. Moody C a, Laimins L a: **Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation.** *Nat Rev Cancer* 2010, **10**:550–60.
40. Sánchez-barriga JJ: **Tendencias de mortalidad por cáncer cervicouterino en las siete regiones socioeconómicas y en las 32 entidades federativas de México en los años 2000-2008.** *Gac Med Mex* 2012, **148**:42–51.
41. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/014ssa24.html>
42. Gonzalo Montalvo Esquivel, Jaime Alberto Coronel Martínez, Adriana Alvarado Zermeño, David F. Cantú de León, Daniel Flores Alatraste, Andrea Ortega Rojo, Aarón González Enciso, David Isla Ortíz, David E. Muñoz González, Juan U. Robles Flores, Gilberto Sol MLCP y ÁHG: **Cáncer Cervicouterino.** *Cancerologia* 2011, **6**.
43. Jamieson ER, Lippard SJ: **Structure , Recognition , and Processing of Cisplatin – DNA Adducts.** *Chem Rev* 1999, **99**:2467–98.

44. Kelland L: **The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy.** *Nat Rev Cancer* 2007, **7**:573–84.
45. Barco S Del, Vazquez-martin A, Cufí S, Oliveras- C, Bosch-barrera J, Joven J, Martin-castillo B: **Metformin : Multi-faceted protection against cancer.** 2011, **2**:896–17.
46. Ben Sahra I, Le Marchand-Brustel Y, Tanti J-F, Bost F: **Metformin in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug?** *Mol Cancer Ther* 2010, **9**:1092–9.
47. Landman GWD, Kleefstra N, van Hateren KJJ, Groenier KH, Gans ROB, Bilo HJG: **Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes: ZODIAC-16.** *Diabetes Care* 2010, **33**:322–6.
48. Bowker SL, Majumdar SR, Veugelers P, Johnson J a.: **Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin.** *Diabetes Care* 2006, **29**:254–8.
49. 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**:607–14.
50. Kalender A, Selvaraj A, Kim SY, Gulati P, Brûlé S, Viollet B, Kemp BE, Bardeesy N, Dennis P, Schlager JJ, Marette A, Kozma SC, Thomas G: **Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner.** *Cell Metab* 2010, **11**:390–401.
51. Kristensen JM, Larsen S, Helge JW, Dela F, Wojtaszewski JFP: **Two weeks of metformin treatment enhances mitochondrial respiration in skeletal muscle of AMPK kinase dead but not wild type mice.** *PLoS One* 2013, **8**:e53533.
52. Glazer NL: **Variation in the ATM gene may alter glycemic response to metformin.** *Circ Cardiovasc Genet* 2011, **4**:210–1.
53. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM: **mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011, **12**:21–35.
54. Novoa WB, Winer AD, Glaid J, Schwert GW: **Lactic Dehydrogenase: V. INHIBITION BY OXAMATE AND BY OXALATE.** *J Biol Chem* 1959, **234**:1143–8.
55. Papaconstantinou J, Sidney P: **The Role of Glycolysis in the Growth of Tumor Cells.** *J Biol Chem* 1961, **236**:285–8.
56. Gawlita E, Paneth P, Anderson VE: **Equilibrium isotope effect on ternary complex formation of [1-18O]oxamate with NADH and lactate dehydrogenase.** *Biochemistry* 1995, **34**:6050–8.

57. Le A, Cooper CR, Gouw a M, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, Royer RE, Vander Jagt DL, Semenza GL, Dang C V: **Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:2037–42.
58. Pelicano H, Martin DS, Xu R-H, Huang P: **Glycolysis inhibition for anticancer treatment.** *Oncogene* 2006, **25**:4633–46.
59. 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**:425–34.
60. Shaw RJ: **Glucose metabolism and cancer.** *Curr Opin Cell Biol* 2006, **18**:598–08.
61. Kessler II: **Cancer mortality among diabetics.** *J Natl Cancer Inst* 1970, **44**:673–86.
62. Currie C, Poole C, Gale E: **The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes.** *Diabetologia* 2009, **52**:1766–77.
63. Jalving M, Gietema J a., Lefrandt JD, Jong S De, Reyners AKL, Gans ROB, Vries EGE De: **Metformin: Taking away the candy for cancer?** *Eur J Cancer* 2010, **46**:2369–80.
64. Decensi A, Puntoni M, Goodwin P, Cazzaniga M, Gennari A, Bonanni B, Gandini S: **Metformin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis.** *Cancer Prev Res (Phila)* 2010, **3**:1451–61.
65. Martin-Castillo B, Vazquez-martin A, Oliveras-ferraros C, Menendez J a: **Metformin and cancer.** *Cell Cycle* 2010, **9**:1057–64.
66. Anisimov VN, Berstein LM, Egormin P a, Piskunova TS, Popovich IG, Zabezhinski M a, Kovalenko IG, Poroshina TE, Semenchenko A V, Provinciali M, Re F, Franceschi C: **Effect of metformin on life span and on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice.** *Exp Gerontol* 2005, **40**:685–93.
67. Hedley BD, Chu JE, Ormond DG, Beausoleil MS, Boasie A, Allan AL, Xenocostas A: **Recombinant human erythropoietin in combination with chemotherapy increases breast cancer metastasis in preclinical mouse models.** *Clin Cancer Res* 2011, **17**:6151–62.
68. Gold J: **Inhibition of Walker 256 intramuscular carcinoma in rats by administration of hydrazine sulfate.** *Oncology* 1971, **25**:66–71.

69. Fanciulli M, Valentini A, Bruno T, Citro G, Zupi G F: **Effect of the antitumor drug lonidamine on glucose metabolism of adriamycin-sensitive and -resistant human breast cancer cells.** *Oncol Res* 1996, **8**:111–20.
70. Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Moreno-Sánchez R: **Kinetics of transport and phosphorylation of glucose in cancer cells.** *J Cell Physiol* 2009, **221**:552–9.
71. Novoa WB, Winer AD, Glaid J, Schwert GW: **No Title.** 1959.
72. Monami M, Colombi C, Balzi D, Dicembrini I, Giannini S, Melani C, Vitale V, Romano D, Barchielli A, Marchionni N, Rotella CM, Mannucci E: **Metformin and cancer occurrence in insulin-treated type 2 diabetic patients.** *Diabetes Care* 2011, **34**:129–31.
73. Lage R, Diéguez C, Vidal-Puig A, López M: **AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis.** *Trends Mol Med* 2008, **14**:539–49.
74. 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**:10269–73.
75. Coe, E. y Strunk R: **The effect of oxamate on glycolysis in intact ascites tumor cells.** *Biochim Biophys Acta* 1970, **208**:189–02.
76. Zhou M et al.: **Warburg effect in chemosensitivity: Targeting lactate dehydrogenase-A re-sensitizes taxol-resistant cancer cells to taxol.** *Mol Cancer* 2010, **33**:1–12.
77. Gumma, K. y McLean P: **Effect of oxamate, pyruvate, nicotinamide and streptozotocin on the pentose phosphate pathway intermediates in ascites tumor cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 1969, **35**:86–93.
78. Delmastro DA, Li J, Vaisman A, Solle M, Chaney SG: **Received: 28 November 1995 / Accepted: 17 May 1996.** *Cancer Chemother Pharmacol* 1997, **39**:245–53.
79. Barry M a., Behnke C a., Eastman A: **Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia.** *Biochem Pharmacol* 1990, **40**:2353–62.
80. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM: **Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis ?** 2001, **59**:657–63.
81. Bröker LE, Kruyt F a E, Giaccone G: **Cell death independent of caspases: a review.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**:3155–62.

82. Jacobson MD, Weil M, Raff MC: **Programmed Cell Death in Animal Development.** 1997, **88**:347–54.
83. Elmore S: **Apoptosis: a review of programmed cell death.** *Toxicol Pathol* 2007, **35**:495–16.
84. Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacroce R, Corcia MGDI, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, Farber E: **Cell death : Apoptosis versus necrosis.** *Int J Oncol* 2002, **21**:165–70.
85. Cairns R, Harris I, Mak T: **Regulation of cancer cell metabolism.** *Nat Rev Cancer* 2011, **11**:85–95.
86. Dang C V: **Links between metabolism and cancer.** *Genes Dev* 2012, **26**:877–90.
87. Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G: **Targeting mitochondria for cancer therapy.** *Nat Rev Drug Discov* 2010, **9**:447–64.
88. Galluzzi L, Kepp O, Vander Heiden MG, Kroemer G: **Metabolic targets for cancer therapy.** *Nat Rev Drug Discov* 2013, **12**:829–46.
89. Iliopoulos D, Hirsch H a., Struhl K: **Metformin decreases the dose of chemotherapy for prolonging tumor remission in mouse xenografts involving multiple cancer cell types.** *Cancer Res* 2011, **71**:3196–01.

XV. Anexo

1. Cultivo celular

- Medio de cultivo celular RPMI (Gibco).

-En 800 ml de agua millipore:

-2 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3).

-5 ml de antimicótico-antibiótico.

-Aforar a 1 l de agua millipore.

-Establecer un pH de 7.0-7.1

-Filtrar

- Tripsina 0.05 %

-En 1 l de verseno.

-0.5 g de tripsina.

-Filtrar

- PBS (1x)

-En 800 ml de agua millipore:

-Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4).....1.42 g

-Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4).....0.245 g

-Cloruro de sodio (NaCl).....8.00 g

-Cloruro de Potasio (KCl).....0.201 g

-Aforar a 1 l de agua millipore

-Ajustar pH a 7.4

2. Fijación de células para Cristal Violeta

- Disolución fijadora:

-Para 25 ml de disolución:

En medio de cultivo celular con SFB al 2 %:

-Glutaraldehído.....1.1 ml

3. Extracción de proteínas

- Buffer de lisis

-Tris pH 6.8.....	6 M
-Glicerol.....	10 %
-SDS.....	2 %
-Azul de bromofenol.....	0.003 %
-2-β mercaptoetanol (adicionado en fresco)	5 %

4. Electroforesis

- Buffer de corrida (10x)

-En 800 ml de agua desionizada:

-Tris-Base.....	30.2 g
-Glicina.....	144.0 g
-SDS.....	10.0 g

-Aforar a 1 l

-Establecer pH de 8.3

- Buffer de transferencia (1x)

-Para un litro:

-Tris-Base (25 mM).....	3.0 g
-Glicina (190 mM).....	14.5 g
-Metanol (10 %).....	100 ml

-Aforar con agua desionizada.