



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto sinérgico de la casiopeina II gly con
drogas empleadas en el sector clínico sobre
la proliferación del cáncer cervicouterino
(CCU) de HeLa**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

DIANA XOCHIQUETZAL ROBLEDO CADENA

TUTOR:

Dra. Sara Rodríguez Enríquez



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2016



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.

Datos

1. Datos de la Alumna:

Robledo
Cadena
Diana Xochiquetzal
5514822470
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308203747

2. Datos de la tutora

Dra.
Sara
Rodríguez
Enríquez

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Rebeca
López
Marure

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Juan Carlos
Gallardo
Pérez

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Saúl
Gómez
Manzo

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Georgina
Nieto
Castañeda

7. Datos del trabajo escrito

Efecto sinérgico de la casiopeina II gly con drogas empleadas en el sector clínico sobre la proliferación del cáncer cervicouterino (CCU) de HeLa
76 p.
2016

A mi familia, gracias.

*“Dile que sí,
aunque te estés muriendo de miedo,
aunque después te arrepientas,
porque de todos modos te vas a arrepentir
toda la vida si le contestas que no”*

GGM

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi familia, gracias por apoyarme y motivarme en todo momento.

A mi tutora, la Dra. Sara Rodríguez Enríquez por las enseñanzas y todas las recomendaciones a los largo de este proyecto. Por demostrarme que tan lejos se puede llegar teniendo pasión por lo que uno hace.

Al Dr. Rafael Moreno Sánchez, por ser un gran ejemplo de investigador y maestro. Gracias por sus excelentes observaciones en todos mis seminarios.

Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez, gracias por darme la oportunidad de permanecer en este laboratorio y darme las bases suficientes para seguir aprendiendo. Como siempre he dicho: ¡Le debo mucho!

M. en C. Georgina Nieto Castañeda: Te debo muchas apuestas (sé que la mayoría fue por mí bien, a pesar de perder) y todas las ocasiones que me querías estrangular (es lo que más te agradezco: que no lo hayas hecho). Gracias por ayudarme en una de las etapas más difíciles de mi vida y darme ánimos para seguir adelante. Por ti me involucre en el mundo de la investigación y los laboratorios (¿Dónde estaría ahora?) me he divertido mucho y espero que continúe “La lógica molecular” (todo es lógica molecular... aunque no quieras, ja).

A todo el equipo que integra al laboratorio de tumores. Solo ustedes me pueden entender: ¿Estudias cáncer?... ¿Qué haces en “Cardio”? Me vieron crecer, tropezar y volver a tropezar les agradezco sus observaciones y estar conmigo en los buenos pero sobre todo en los malos momentos...hasta que un posgrado nos separé. Este camino hubiera sido difícil, oscuro y turbulento sin ustedes.

A TOD@S mis amig@s de la preparatoria 9 (por iniciar este camino universitario conmigo) y universidad (gracias por todas las aventuras en clases y prácticas de campo).

A las personas especiales que encontré en Ciencia en las Calles y UNIVERSUM, por ustedes reafirmó mi amor a la divulgación científica.

A mis sinodales, gracias por sus observaciones para mejorar este trabajo.

A Casiopea, tú me has enseñado la palabra responsabilidad y todo lo que conlleva.

GRACIAS.

Este trabajo de investigación fue apoyado por el donativo de CONACYT 239930 a nombre del Dr. Rafael Moreno Sánchez.

Índice

Abreviaturas	8
Resumen	11

CAPÍTULO I

1 Introducción.....	14
1.1 Epidemiología del cáncer cervicouterino.....	14
1.2 Características moleculares del cáncer.....	15
1.2.1 Metabolismo energético de la célula cancerosa.....	17
1.3 Terapias clínicas contra el cáncer.....	21
1.4 Estrategias experimentales actuales contra el CCU.....	26
1.4.1. Terapia anti-mitocondrial.....	29
1.4.1.1. El sinergismo experimental como estrategia terapéutica contra tumores malignos	30

CAPÍTULO II

2.1 Justificación.....	34
2.2 Hipótesis.....	35
2.3 Objetivos.....	36
2.3.1 Objetivo general.....	36
2.3.2 Objetivos particulares.....	36

CAPÍTULO III

3 Material y métodos.....	37
3.1 Proliferación de la línea celular de HeLa.....	37
3.2 Curva de crecimiento de la línea celular de HeLa.....	37
3.3 Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC ₅₀) de los diferentes fármacos sobre la proliferación tumoral.....	38
3.3.1 Determinación de la proliferación celular.....	38
3.4 Determinación de la citotoxicidad de los diferentes fármacos sobre la proliferación de HeLa por el ensayo de bromuro de 3-(4,5 dimetiltiliazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio (MTT).....	39
3.5 Analisis de la toxicidad de los fármacos utilizando el sinergismo tipo Bliss...	40

CAPITULO IV

4 Resultados.....	41
4.1 Crecimiento de la línea celular HeLa.....	41
4.2 Toxicidad de los fármacos antimitocondriales, canónicos y no canónicos sobre el crecimiento de HeLa.....	42
4.3 Efecto sinérgico de la Cas II-gly con drogas canónicas, no canónicas y antimitocondriales sobre la proliferación de HeLa.....	47
4.4 Efecto sinérgico de la Cas II gly sobre la proliferación de A549.....	51
4.5 Efecto sinérgico de la Cas II gly sobre la proliferación de 3T3.....	54
4.6 Evaluación del efecto de los fármacos canónicos sobre la concentración inhibitoria 50 de Cas II-gly.....	55

CAPITULO V

5 Discusión.....	57
5.1 Los cationes lipofílicos disminuyen la proliferación de HeLa en monoterapia..	58
5.2 Los fármacos no canónicos afecta la proliferación de HeLa en monoterapia. .	60
5.3 Los fármacos utilizados en la clínica no afectan importantemente la proliferación de HeLa en monoterapia.....	62
5.4 Sinergismo.....	64
Conclusión.....	66
Referencias.....	67
Anexo 1.....	76

Abreviaturas

2OGDH	2-oxoglutarato deshidrogenasa
α -TEA	α -tocoferol unido a un éter análogo de ácido acético
α -TOS	α –tocoferil succinato
ANT	Transportador de nucleótidos de adenina
ATB	Aditivismo Tipo Bliss
ATCC	American Type Culture Collection (Colección Americana de Tipos de Cultivo)
ATP	Adenosin trifosfato
AS30D	Hepatocarcinoma de rata
C-Myc	Factor de transcripción, relacionado con proliferación
Cas II-gly	Casiopeina II gly
Cas III-EA	Casiopeina III EA
CCU	Cáncer cervicouterino
CP	Cisplatino
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (receptor del factor de crecimiento epidérmico)

FNP	Fenazopiridina
FO	Fosforilación oxidativa
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
Gy	Gray (unidades de radioterapia)
HER-2	Human Epidermal Recepto-2 (Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano)
HPI	Hexosa Fosfato Isomerasa
IARC	Internacional Agency for Research on Cancer (Agencia internacional para la investigación en cáncer)
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria 50 en la proliferación celular
INK4	Proteína supresora de tumor
MCTS	Multi-cellular tumoral spheroid (Esferoide tumoral multicelular)
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolio
Nrf2	Factor de transcripción relacionada con la desintoxicación celular
P27	Proteína inhibidora de complejo ciclinas-cinasas
P53	Proteína supresora de tumor
PDH	Piruvato deshidrogenasa
ROS	Reactive oxygen species (especies reactivas de oxígeno)

RT	Radioterapia
SDH	Succinato deshidrogenasa
SFB	Suero Fetal de Bovino
Smad	Gen supresor de tumor
SubIC ₅₀	Concentración Inhibitoria menor al 50% en la proliferación celular

Resumen

Desde que Otto Warburg (1956) propuso que la glucólisis de tumores de rápido crecimiento está acelerada (10 veces) más que en tejidos no tumorales, se hipotetizó, sin haberse demostrado experimentalmente, que cualquier tumor dependía más de la glucólisis que de la fosforilación oxidativa (FO) para el suministro de ATP. Recientemente nuestro grupo de trabajo y otros han demostrado que aunque la glucólisis está acelerada, la mitocondria es funcional y provee en algunos casos más de 80% del ATP celular en tumores agresivos cultivados en monocapa. La alta funcionalidad mitocondrial está ligada a una diferencia de potencial mitocondrial de mayor magnitud que la mitocondrial, por lo tanto, los cationes lipofílicos (CL) pueden internalizarse con mayor eficacia y afectar la función mitocondrial tumoral.

La casiopeina II gly (CasII-gly) es un catión lipofílico que al internalizarse en mayor proporción en la matriz mitocondrial afecta enzimas importantes de la fosforilación oxidativa (FO) a concentraciones en las que la viabilidad y la proliferación tumoral se abate pero donde también se afectan órganos del hospedero. Por lo tanto, para disminuir el efecto tóxico de la Cas II-gly, se propone su utilización a dosis sub C_{50} (concentraciones menores de la concentración inhibitoria 50 sobre la proliferación celular) en combinación con bajas concentraciones de los fármacos convencionales para detener la progresión del tumor.

Se evaluó el efecto de 30 drogas en total (16 antineoplásicos convencionales, 5 anti-mitocondriales y 9 no-canónicos) en monoterapia y en combinación con Cas II-gly para determinar su efecto sinérgico sobre la proliferación del cáncer de cérvix HeLa (estadio IV). La mayoría de los antineoplásicos convencionales mostraron valores de IC_{50} en rango milimolar, excepto el paclitaxel ($IC_{50}=30 \pm 10 \mu M$, $n=4$). Por el contrario algunos fármacos no canónicos (benznidazol, jasmonato, alda-1 y cumarina) y anti-mitocondriales (Cas III-EA, mitoxitea, α -TOS y α -TEA) mostraron mayor potencia al abatir la proliferación de HeLa a dosis en el rango micromolar (1-5 μM).

Para evitar los efectos colaterales de Cas II-gly en células sanas, se realizó la administración de la Cas II-gly junto con otros compuestos químicos para explorar el efecto potenciador de dichas drogas sobre la Cas II-gly a dosis menores a su concentración inhibitoria 50. El efecto sinérgico se cuantificó con la ecuación de Bliss que permite evaluar la potencia de una droga o en combinación con otras.

En ensayos de combinación de fármacos se encontró que el paclitaxel (1.5 μM), cisplatino (50 μM), gemcitabina (0.5 mM), ciclofosfamida (0.25 mM) y carboplatino (10 mM) aumentaron la potencia de la Cas II-gly (40-50%) de manera supra aditiva. Estas mismas combinaciones se aplicaron al carcinoma de pulmón (A549) con resultados similares. En líneas no tumorales como fibroblastos de ratón 3T3 ninguno de los fármacos ensayados tuvo efecto sobre la proliferación celular. El resto de los fármacos evaluados no tuvieron efecto supra aditivo con Cas II-gly, por el

contrario se observó un aumento en la duplicación celular indicando un posible efecto infra aditivo.

En conclusión, la combinación de Cas II-gly con los fármacos canónicos (paclitaxel, cisplatino, carboplatino, ciclofosfamida y gemcitabina) disminuyeron la proliferación del cáncer cervicouterino (CCU) HeLa a dosis sub C_{50} , atractivas para el sector clínico, por lo tanto dichas combinaciones pueden ser un buen tratamiento para el cáncer cervicouterino.

CAPÍTULO I

1 Introducción

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracteriza por un aumento descontrolado en la velocidad de proliferación celular. Este proceso puede ser el resultado de varios procesos multifactoriales como son las mutaciones en genes que controlan la duplicación celular; el microambiente tumoral o la activación de factores transcripcionales [Beger et al., 2001; Siami et al., 2007; Chan et al., 2008; Zhao et al., 2008]. Esta transformación celular reprograma a la célula para impulsar la metástasis, es decir, procesos de invasión a órganos distantes en el cuerpo [Narumiya et al., 2009; Hellquist et al., 2016].

1.1 Epidemiología del cáncer cervicouterino

En 2012 se publicó que el cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial con 8.2 millones de muertes por año. El cáncer cervicouterino (CCU) ocupa el cuarto lugar en muertes por cáncer. En México, el CCU ocupa el segundo lugar después del cáncer de mama en mujeres de edad reproductiva (Figura 1) (GLOBOCAN, 2012).

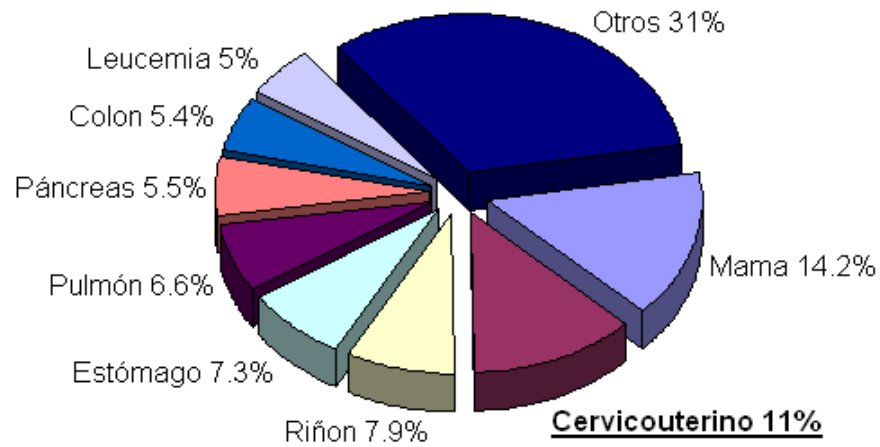


Figura 1. Gráfica que representa el porcentaje de mortalidad de la población femenina mexicana. Modificado de GLOBOCAN, 2012 (IARC).

1.2 Características moleculares del cáncer

Las células cancerígenas mantienen un acelerado crecimiento e invasión comparado con las células no tumorales. Entre las causas del descontrol en la velocidad de crecimiento se encuentra la elevada incidencia de mutaciones en el DNA que favorecen la proliferación celular, existiendo un aumento en la expresión de factores de transcripción involucrados con el ciclo celular, como NRF2, Sox4 o PGC1 α [Karin et al., 2016; Li et al., 2016; Tan et al., 2016] la sobre-expresión de oncogenes como c-myc, HRAS y K-Ras [Vogelstein et al., 2004] y la disminución de genes supresores (p53, PTEN, Rb, INK4), [Geoffrey et al., 2000; Sun et al., 2010, Aschauer et al., 2016]. Lo anterior contribuye a una reprogramación celular que da lugar a varios procesos como son la angiogénesis, la resistencia a la

muerte celular, la señalización de la proliferación, la evasión del sistema inmune, y la inmortalidad [Hanahan y Weinberg, 2011] (Figura 2).



Figura 2. Características metabólicas atípicas de las células de cáncer (modificado de Hanahan y Weinberg, 2011).

Estas características, se han propuesto como *hallmarks* (marcadores) en el cáncer, ya que la combinación de estos procesos celulares se encuentra en la mayoría de los tumores [Greenhough et al., 2009; Pietras y Ostman, 2010; Hanahan y Weinberg, 2011; Gutschnert y Diederichs, 2012]. Actualmente existen fármacos en la clínica contra la mayoría de estos *hallmarks*. Uno de ellos es el cisplatino cuyo efecto es la intercalación en el DNA para detener el crecimiento tumoral [Siddik 2003; Jordan et al. 2000], otros son los inhibidores de receptores para los factores de crecimiento (EGFR y HER2), como Lapatinib y Traztuzumab que evitan que la célula proliferen [Garnock-Jones y Scott, 2010], aun así se han observado efectos secundarios, asociados a la toxicidad de órganos sanos del

paciente desde trastornos cardíacos, neurotoxicidad, insuficiencia renal y toxicidad pulmonar, en el paciente asociados con las altas dosis empleadas, además de una recurrencia del cáncer en la mayoría de los casos [Medina y Goodin, 2008]. Por ello, se ha tenido que buscar nuevos blancos terapéuticos contra esta enfermedad sin afectar a las células sanas. Recientemente se ha demostrado que aunque la glucólisis está acelerada, la mitocondria es funcional [Zu y Guppy, 2004; Moreno-Sánchez et al., 2007; Rodríguez-Enríquez et al., 2009] y provee en algunos casos más del 80% del ATP celular en tumores agresivos (Tabla 1), [Rodríguez-Enríquez et al., 2010]. Con ello el metabolismo energético se ha considerado como blanco estratégico para una terapia alternativa anti-tumoral [Moreno-Sánchez et al., 2007].

1.2.1 Metabolismo energético de la célula cancerosa

La reprogramación y aceleración del tumor demanda una gran cantidad de energía. En 1956, Otto Warburg demostró que los tumores malignos mantienen una alta glucólisis (10 veces) comparada con las células normales. De lo anterior se propuso que la glucólisis abastecía la alta demanda de ATP requerida para sostener las funciones metabólicas del tumor, ya que la mitocondria se consideró aparentemente disfuncional, sin haberse demostrado experimentalmente hasta entonces (Warburg, 1956). En las últimas décadas se ha documentado experimentalmente que la mitocondria es funcional en diversas líneas celulares tumorales [Zu y Guppy, 2004; Brandon et al., 2006; Marin-Hernández et al., 2006; Moreno-Sánchez et al., 2007; Rodríguez-Enríquez et al., 2009]. Por ejemplo, la

línea celular de cáncer de cervix (HeLa), cultivado bidimensionalmente la fosforilación oxidativa (FO) depende principalmente para la síntesis de ATP (79%) [Rodríguez-Enríquez et al., 2010]. En modelos más fisiológicos como el de los esferoides multicelulares de HeLa, la proliferación y crecimiento inicial del esferoide depende principalmente de la FO (60%). Por el contrario, una vez que el esferoide alcanza la madurez y genera un centro necrótico la glucólisis es la que abastece mayormente la demanda de ATP (80%). Sin embargo, a pesar de que los esferoides tumorales multicelulares (MCTS) maduros dependen mayormente de la glucólisis, el empleo de inhibidores glucolíticos como gossypol (inhibidor de GAPDH, con una IC_{50} 70 μ M) [Weiner, et al., 1996] y 2-desoxiglucosa (análogo de la glucosa que Inhibe a las enzimas HK y HPI) [Zhong et al., 2009], para inhibir el crecimiento tumoral, no se afectó importantemente (la proliferación disminuyó 50-60%), sugiriendo que el aporte de ATP por parte de la mitocondria también es esencial para el crecimiento y maduración del esferoide [Rodríguez-Enríquez et al., 2008], lo anterior también se observa en otras líneas celulares en monocapa y en esferoides en crecimiento (Tabla 1) [Rodríguez-Enríquez et al., 2008; Rodríguez-Enríquez et al., 2010; Mandujano-Tinoco et al., 2013].

Tabla 1. Aporte de ATP de la glucólisis y FO en diferentes tipos de células tumorales agresivas.

Modelo Bidimensional		Aporte de ATP %		Referencias
		Glucólisis	FO	
HeLa	Cáncer cervicouterino	21	79	Rodríguez-Enríquez et al., 2010
MCF7	Cáncer de mama	8	92	Mandujano-Tinoco et al., 2013
Hek243	Células epiteliales embrionarias de riñón, transformadas	14	82	Rodríguez-Enríquez et al., 2008
Modelo Tridimensional				
HeLa	Jóvenes	37	63	Rodríguez-Enríquez et al., 2010
	Maduro	83	17	
MCF7	Jóvenes	7	93	Mandujano-Tinoco et al., 2013
	Maduro	93	2	
Hek293	Jóvenes	42	58	Rodríguez-Enríquez et al., 2008
	Maduro	80	20	

Los cultivos en monocapa, se realizaron en DMEM 25 mM de glucosa a 37°C, 5% CO₂ y 95% aire. Los esferoides jóvenes tienen un diámetro menor de 0.5 mm mientras que los esferoides maduros tienen un diámetro de 0.75 mm o mayor. Modificado de Moreno-Sánchez et al., 2014.

El análisis anterior sugiere que la mitocondria funcional del tumor podría ser un blanco terapéutico potencial para disminuir el crecimiento del tumor, ya que éste depende principalmente de la FO para el aporte de ATP; además, la mitocondria desencadena procesos apoptóticos en la célula tumoral (liberación de citocromo C, Bcl-2, activación de caspasas) [Moreno-Sánchez et al., 2009]. Aunque es posible considerar que la inhibición de la mitocondria pueda tener repercusión en los tejidos altamente aeróbicos como corazón o cerebro, el uso de compuestos altamente especializados y a bajas dosis podría no afectar tejidos y órganos sanos.

Se ha reportado que las mitocondrias de células tumorales desarrollan un pH más alcalino (pH 7.5) y un potencial transmembranal más electronegativo ($\Delta\psi_m$ 180mV), [Nicholls et al., 1999] mayor que el reportado en mitocondrias no tumorales. El aumentado $\Delta\psi_m$ del tumor está relacionado con un aumento en el contenido de cardiolipina (lípidos exclusivos de la membrana interna mitocondrial) y de colesterol, impidiendo la correcta difusión pasiva de protones a través de la membrana [Perdersen, 1978] que provoca un mayor número de cargas electronegativas en la matriz mitocondrial. En consecuencia, existe una mayor acumulación de cationes lipofílicos (más de 68%) que en tejido sano [Dietzen y Davis, 1994] favoreciendo la inhibición del metabolismo mitocondrial [Davis et al., 1985]. En las últimas décadas se han analizado y estudiado algunos cationes lipofílicos en búsqueda de compuestos con mayor especificidad; es decir, compuestos que a bajas dosis inhiba el crecimiento tumoral (Tabla 2) sin afectar al hospedero. A pesar de que las dosis empleadas para disminuir la viabilidad de las células tumorales son en el rango micromolar (3 – 15 μ M) aún no se han realizado los estudios pertinentes sobre las líneas humanas normales para comprobar su eficacia y especificidad.

Tabla 2. Cationes lipofílicos como anticancerígenos contra diferentes líneas tumorales

Droga	Efecto	Línea celular (Modelo bidimensional)	IC₅₀ (μM)	Referencia
Casiopaina II gly	Intercalante del DNA, Inhibidor de las enzimas succinato Deshidrogenasa, α-cetoglutarato deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa.	AS30D	10	Marín-Hernández et al., 2006
		C6	10	Trejo-Solís et al., 2005
Rodamina 123	Desacoplante mitocondrial	CRL 1420	131	Lampis et al., 1983
	Inhibidor de ANT	MCF-7	(48 h)	
Rodamina 6G	Inhibidor del citocromo C	HT29	3	Kolarov et al., 1984
	Inhibidor de ANT	A431		Fearon et al., 1987
CCCP	Incremento en la acidificación intracelular Reducción de ATP	EMT-6	5-15	New ell y Tannock, 1989
		MGH-U1	(6 h)	

Los compuestos fueron evaluados después de 24 h de incubación en cultivos celulares con DMEM más 25 mM de glucosa a 37°C, 5% CO₂ y 95% aire. HeLa, cáncer cervicouterino metastático estadio IV; C6, línea celular de glioma; CRL 1420, cáncer pancreático; MCF-7, cáncer de mama estadio III; HT29, cáncer de colon; EMT-6, cáncer de mama. ANT, Translocador de nucleótidos de adenina. Modificado de Moreno-Sánchez et al., 2009.

1.3 Terapias clínicas contra el cáncer

Las terapias empleadas convencionalmente en la clínica contra cualquier tipo de cáncer varían dependiendo del estadio de la enfermedad y su origen (Tabla 3). Independiente del tipo de cáncer, los tratamientos pueden clasificarse en: (a) local como la cirugía (histerectomía, extracción quirúrgica del tejido canceroso y parte del tejido adyacente) y la radioterapia (emisión de rayos X de alta intensidad en un campo determinado) y (b) sistémico (droga administrada de manera oral o vía intravenosa) como la quimioterapia que son fármacos administrados al torrente sanguíneo antes de la cirugía para reducir el tamaño de un tumor de tamaño

mayor a 10 cm (quimioterapia neoadyuvante) o posterior a ella (quimioterapia adyuvante). Entre las desventajas de la quimioterapia se encuentra la baja especificidad del compuesto hacia la célula tumoral, lo cual provoca un daño irreversible en las células sanas del hospedero. Lo anterior aumenta los efectos colaterales adversos en algunos los pacientes como náusea, vómito y daño permanente en corazón, pulmón y riñón; además, durante la terapia los pacientes desarrollan procesos inflamatorios, alopecia, fiebre neuropénica, hiperpigmentación cutánea y disminución en el número total de plaquetas [Rowinsky et al., 1993; Dhanalakshmi et al., 2003; Montalvo et al., 2011]. A nivel molecular, los pacientes desarrollan resistencia a los fármacos empleados a través de la sobre expresión de la glicoproteína P, bomba aniónica encargada de la expulsión masiva de drogas y/o compuestos químicos del citosol al espacio extracelular [Cerezo et al., 2012]. En consecuencia, la recurrencia del cáncer es evidente [Dhanalakshmi et al., 2003].

Tabla 3. Tratamientos usados en la clínica en los diferentes etapas del cáncer cervicouterino

Etapa	Estadio	Descripción	Tratamiento	Efectos secundarios	Recurrencia
I	A	Tumor confinado al cuello uterino, menor a 7 mm.	Histerectomía, RT: 45 Gy	Fatiga, inflamación, alopecia.	10% en el primer año posterior al tratamiento
	B	Tumor confinado en el cervix, no mayor a 4 cm.	Histerectomía, RT: 65 – 75 Gy		
II	A	Tumor que se extiende más allá del cuello uterino sin llegar a la pared pélvica. Menor a 4 cm.	Gemcitabina 125 mg/m ² + CP 40 mg/m ² RT: 40 – 45 Gy	Fiebre neutropenica, trastornos cardiacos, neurotoxicidad, polineuropatía, insuficiencia renal, hiperpigmentación cutánea, disminución en el número de plaquetas, queratopatía, nueritis óptica bilateral.	33% en el primer año posterior al tratamiento
	B	Tumor con invasión parametrial.	Gemcitabina 100 mg/m ² + CP 50 mg/m ²		
III	A	El tumor involucra el tercio inferior de la vagina.	CP 40 mg/m ² + Paclitaxel 1 mg/m ²		20 – 50% de recurrencia en los primeros 5 años, posterior al tratamiento.
	B	Tumor se extiende a la pared pélvica.	RT: 80 Gy		
IV	A	El tumor invade a la vagina o recto y se extiende más allá de la pelvis.	CP 50 mg/m ² + paclitaxel 135 mg/m ²		
	B	Metástasis a distancia (Recto ó ganglios)	CP 50 mg/m ² + paclitaxel 135 mg/m ² CP 50 mg/m ² + Topotecan 0.75 mg/m ²		

La histerectomía es aplicada en los primeros estadios del cáncer cervicouterino, posteriormente el paciente se trata con una combinación de radioterapia más quimioterapia por 3 semanas. RT, radioterapia medida en Grays. Etapas I y II se refieren a un tumor localizado con tamaño menor a 4 cm. Etapas III y IV se refiere a un tumor invasivo y metastásico que ocupa una tercera parte del útero. Modificado de Montalvo et al., 2011.

En el caso del Cáncer Cervicouterino (CCU) estadio II y posteriores, la terapia más usada en el sector clínico es la quimioterapia base cisplatino (generador de aductos en el DNA) en combinación con: (a) paclitaxel (inhibidor de la polimerización de la tubulina), gemcitabina (inhibidor nucleosídico en la fase G1/S del ciclo celular) o topotecan (inhibidor de la topoisomerasa I) y/o (b) en combinación con la cirugía o radioterapia (dependiendo del estadio del tumor). Dichos tratamientos van acompañados de terapia neoadyuvante (antes del

tratamiento) o adyuvante (después del tratamiento) [Marks et al., 1996; Montalvo et al., 2011]. Sin embargo, se ha reportado que dichos tratamientos promueven efectos secundarios, relacionados con las altas dosis empleadas en los pacientes (Tabla 3, 4) como toxicidad en corazón, pulmón, cerebro, riñón y alopecia. En consecuencia, el paciente tiene una baja calidad de vida, además de desarrollar resistencia a los fármacos quimioterapéuticos y una reincidencia de la enfermedad [Rowinsky et al., 1993; Rodríguez-Macías et al., 2003; Afekhide y Edijana, 2006]. Para evitar esta toxicidad en las células sanas, se han buscado nuevos blancos terapéuticos contra el tumor [Martínez-Outschoorn et al., 2016].

Tabla 4. Fármacos canónicos utilizados en la quimioterapia

Fármacos	Tipo de Cáncer	Blanco	Dosis (mM)	Efectos Secundarios en pacientes	Referencias
Paclitaxel	Ovario, mama y pulmón	Disfunción del ensamblaje de los microtúbulos	0.23	Taquicardia, neurotoxicidad ó polineuropatía	Rowinsky et al., 1993
Doxorrubicina	Mama, pulmón, ovario, gástrico	Intercalante del DNA, inhibidor de la topoisomerasa II	11	Cardiotoxicidad, vómito, diarrea, alopecia	Chatterjee et al., 2010
Bleomicina	Linfoma de Hodgkín, pene, cuello uterino y vulva	Síntesis de DNA	27-80	Principalmente problemas pulmonares.	William, et al., 2005
CP	Testículo, ovario, vejiga, esófago, estómago, pulmón, osteosarcoma	DNA (alquilantes)	66.42-332.1	Nausea, vómito, insuficiencia renal, neuropatía periférica, mielosupresión,	Tsang et al., 2009
Carboplatino	Testículo, ovario, pulmón y cuello		484	Insuficiencia renal, mielosupresión	Colby et al., 2002
Oxaliplatino	Colorectal, estómago,		2.14	Neurotoxicidad sensorial aguda, neuropatía, ataxia sensorial	Saif et al., 2005
Ciclofosfamida	Linfoma de Hodgkín, mama, ovario, pulmón y neuroblastoma		23	Insuficiencia renal, inmunosupresión, cardiotoxicidad	Fraiser, 1991
Ifosfamida	Sarcomas osteogénico, testículo, pulmón, mama		11.5 – 19.1	Encefalopatía, neurotoxicidad	Pelgrims et al., 2000
Dacarbazina	Linfoma de Hodgkín y sarcomas		3– 6	Hepatotoxicidad,	Deleve et al., 1994
Gemcitabina	Pancreático, mama, ovario y pulmón		Análogo de pirimidinas	2.8	Toxicidad pulmonar,
5- fluoruracilo	Colorectal, estómago, páncreas, mama, ovario	Análogo a uracilo	758.7	Toxicidad gastrointestinal, inmunosupresión	Macdonald et al., 1999
Topotecán	Ovario, pulmón, cervicouterino	Inhibidor de Topoisomerasa I	13 – 30.5	Neutropenia, anemia, toxicidad gastrointestinal, trombosis	Von Gruenigen et al., 2012
Etopósido	Testículo, pulmón, leucemia y linfoma	Inhibidor de Topoisomerasa II	0.85	Toxicidad hematológica y hepática	Kobayashi et al., 1994
Bevacizumab	Linfoma de células T, ovario	Unión a Anti-VEGF (vascularización)	0.10	Cardiopatía, hepatotoxicidad	Advani et al., 2012
Rituximab	Linfomas	Unión a Anti-CD20	2.53	Disnea	Šimkovič et al., 2015
Tamoxifem	Mama	Antagonista del receptor de estrógeno	53.8 – 107.66	Trombosis, teratogénesis, hemorragia, cáncer de endotelio,	Yang et al, 2013

1.4 Estrategias experimentales actuales contra el CCU

La reincidencia del cáncer cervicouterino es evidente aún con las terapias usadas actualmente en la clínica. Por lo anterior, se han propuesto diferentes terapias dirigidas a diferentes blancos tumorales [Martínez-Outschoorn et al., 2016]. Desafortunadamente, existen varios inconvenientes como son la poca efectividad del tratamiento sobre el crecimiento tumoral, el aumento de efectos colaterales y la reincidencia de la enfermedad [Rowinsky et al., 1993; Rodríguez-Macías, 2003; Marín-Hernández et al., 2003; Afekhide y Edijana, 2006] por lo que es necesario la identificación de nuevos blancos terapéuticos, que sean más efectivos contra una célula tumoral poco agresivos contra la célula del hospedero [Dhanalakshmi et al, 2003].

La búsqueda de nuevos compuestos antineoplásicos con potencial anticancerígeno, con mayor eficiencia que los empleados en la clínica y menor toxicidad contra el hospedero ha conducido a la síntesis de nuevos fármacos con estructuras similares a los empleados en la clínica. El cisplatino (CP, cis-diaminodicloroplatino) (Figura 3) utilizado en el tratamiento contra el cáncer CCU, está diseñado con una estructura cuya base es el platino, pero altamente tóxico promoviendo disfunción renal y necrosis [Goldstein et al., 1983], asociada a la inhibición de (a) la FO, (b) condensación de la cromatina y (c) biogénesis mitocondrial. Además se ha reportado la pérdida de microvellosidades, disminuyendo la absorción y filtración renal [Choie et al., 1980; Levi et al., 1980; Safirstein et al., 1984]. La inhibición de la FO por las mitocondrias incluye el colapso del potencial transmembranal mitocondrial, la apertura del poro de la

permeabilidad mitocondrial, liberación del citocromo tipo c y en consecuencia, apoptosis y la afectación de la homeostasis del Ca^{2+} [Gordon et al., 1986; Brady et al., 1990; Kruidering, 1997]. Debido a los diferentes efectos colaterales del CP actualmente se están sintetizando nuevos compuestos o empleando otros compuestos llamados drogas no canónicas que no estaban inicialmente dirigidos contra el cáncer pero que han resultado eficaces para disminuir la proliferación tumoral (Tabla 5). Uno de los compuestos que se han sintetizado recientemente por la Dra. Lena Ruiz en el Instituto de Química de la UNAM para el tratamiento contra el cáncer son las casiopeinas®, de las cuales, la casiopeina II gly (CasII-gly, Cu (4,7-dimetil-1, 10 -fenantrolina-glicina NO_3) (Figura 3) ha sido una de las más estudiadas [Marín-Hernández et al., 2003; Alemón-Medina et al., 2007; Mejía y Ruíz-Azuara et al., 2008; Rodríguez-Mercado et al., 2016]. La Cas II-gly tiene un centro metálico de cobre, dos ligantes de tipo imina (N-N) que reaccionan con el ADN. También posee el aminoácido glicina para aumentar la estabilidad de la molécula. A bajas concentraciones (1-10 μM), la Cas II-gly abate el crecimiento de diferentes tipos de tumores humanos y de roedor (HeLa, MCF7, C6, A549, H157) [Trejo-Solís et al., 2005; Rodríguez-Enríquez et al., 2006; Kachadourian et al., 2010; Mandujano-Tinoco et al., 2013] por su efecto citostático promoviendo la fragmentación de DNA e inducción apoptótica [Rivero-Müller et al., 1998; Alemón-medina et al., 2007], Aunque mantiene alta efectividad contra las células cancerosa, la Cas II-gly es altamente cardiotoxica (Hernández-Esquivel et al., 2006) limitando su uso en el sector clínico.

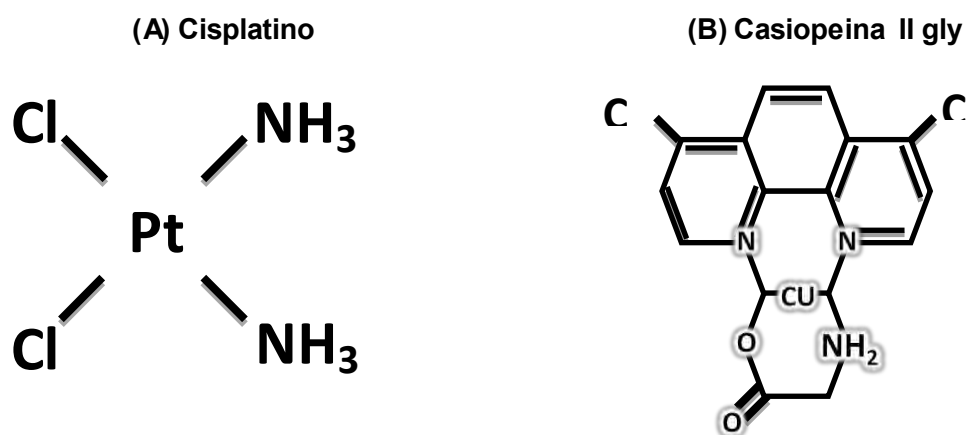


Figura 3. Estructuras de cisplatino (A) y Cas II-gly (B)

Tabla 5. Drogas no canónicas y drogas anti-mitocondriales empleadas como inhibidores de la proliferación tumoral

Drogas no canónicas					
Droga	Blanco	Línea celular tumoral	IC ₅₀ μM	Efecto en línea tumoral	Referencia
Gosipol	Inhibidor de las deshidrogenasas	Mieloma múltiple	2.2 – 2.4	Regulador Bcl-2/Bcl-xl	Lin et al., 2013.
Benznidazol	Estrés oxidativo	THP-1	2	Regula p27	Calvo et al., 2013
Cloruro de cadmio		H69	1	Mayor producción de ROS	Kazuo et al., 1991
Jasmonato	Arresta el ciclo celular	Hep 3B	0.5–3.0 mM	Liberación del Citocromo C	Rotem et al., 2005
Furanona	Inhibidor de Biofilm bacteriano	A549	0.3	Daño al DNA	Calderón-Montaño et al., 2013
Octilguanidina	Inhibidor del poro de transición	HeLa	28	Apoptosis	Rideout, 1986
Alda-1	Activador de ALDH	-	-	-	-
Cumarina	Inhibidor de ALDH	CFPanc-1	2.02 - 2.15	Activador de caspasas	Nasr et al., 2014
Nimesulide	Antiinflamatorio no esteroideo	HepG2	100	Regulación de Smad 4	Yang et al., 2012
		A549	100	COX2, VEGF-C, VEGFR-3	Liang et al., 2012
Drogas anti-mitocondriales					
Casiopeina II gly	Intercalante del DNA	AS30D	5	Inhibidores de 2OGDH, PDH, SDH.	Marín-Hernández et al., 2006
Casiopeina III Ea		C6	5	Apoptosis	Trejo-Solís et al., 2005
Mitoxitea	Antioxidante	HCT 116	80	Inhibidores de SDH	Lan et al., 2010
α-TOS		MDA MB 231	150		Malafa et al., 2002
α-TEA		HCT 116	1.5		Lan et al., 2010

THP-1, línea celular de leucemia; H69, carcinoma de pulmón de células pequeñas; Hep 3B, hepatocarcinoma humano; A549, línea celular cáncer de pulmón; CFPac-1; cáncer de páncreas metastático; HepG2, Hepatocarcinoma humano; C6, glioblastoma de ratón;

MDA MB 231, cáncer de mama metastático; HCT116, línea celular de cáncer de colon. Todas las IC₅₀ se evaluaron en condiciones de normoxia (95% de aire y 5% de CO₂) e hiperglucemia (DMEM 25 mM), a una temperatura de 37°C.

1.4.1 Terapia anti-mitocondrial

Recientemente nuestro grupo de trabajo y otros han demostrado que aunque la glucólisis está acelerada, la mitocondria es funcional [Zu y Guppy, 2004; Moreno-Sánchez et al., 2007; Rodríguez-Enríquez et al., 2009] y provee en algunos casos más de 80% del ATP utilizado para sostener sus funciones básicas. Estos estudios se han realizado en tumores agresivos cultivados en monocapa y bajo condiciones de hiperglucemia (glucosa 25 mM) y normoxia (5% CO₂ y 95% aire) [Rodríguez-Enríquez et al., 2006 y 2010]. Debido a que la funcionalidad mitocondrial está ligada a la generación de un potencial electronegativo mayor [Ribas et al., 2016] proponemos que cationes lipofílicos podrían internalizar con eficacia dentro de la mitocondria, concentrarse e inhibir la FO, por lo tanto podrían ser considerados como un tratamiento potencial contra el cáncer [Moreno-Sánchez et al., 2007]. La Cas II-gly es un catión lipofílico que inhibe a varias enzimas importantes del metabolismo mitocondrial. Estas enzimas contienen grupos tiol en sus sitios de reacción con los cuales la Cas II-gly reacciona y son la piruvato deshidrogenasa (PDH) y la 2-oxoglutarato deshidrogenasa (2OGDH) y la succinato deshidrogenasa (SDH) [Hernández-Esquivel et al., 2006; Marín-Hernández et al., 2006]. Interesantemente, las dosis utilizadas para disminuir la actividad de dichas enzimas de la FO, abate la respiración y el crecimiento tumoral [Trejo-Solis et al., 2005; Rodríguez-Enríquez et al., 2006; Kachadourian et al., 2010; Mandujano-Tinoco et al., 2013] estableciéndose una correlación estrecha

entre la inhibición mitocondrial y el crecimiento tumoral. Además a dichas dosis, el crecimiento de células normales como linfocitos humanos no se ve aparentemente afectado (IC_{50} proliferación= 34 μ M) [Rodríguez-Enríquez, 2006; 2008; 2010]. La alta especificidad de la Ca II-gly contra las células no-tumorales permite sugerir su uso en el sector clínico [Moreno-Sánchez et al., 2007, 2014]. Sin embargo, la Cas II-gly es altamente cardiotoxica (IC_{50} , inhibición al 50% de la función cardiaca en rata = 12 μ M) [Hernández-Esquivel et al., 2006], por lo que nuevas estrategias son requeridas para utilizarlas a bajas dosis, tal como se explica a continuación.

1.4.1.1 El sinergismo experimental como estrategia terapéutica contra tumores malignos

Los efectos colaterales indeseables de un fármaco determinado pueden disminuirse por la aplicación conjunta de otro fármaco (a bajas dosis) que promuevan un efecto sinérgico [Jonhson et al. 2001; Kaelin et al., 2005; Keith et al., 2005]. Existen tres tipos de sinergismo dependiendo del efecto potenciador que tiene sobre la población celular (Tabla 6). El primer tipo de sinergismo es el llamado sinergismo infra-aditivo donde la combinación de fármacos promueve una inhibición menor al obtenido con cada uno de los fármacos individualmente. El segundo tipo de sinergismo se llama efecto aditivo, en este caso la combinación de las drogas es la suma de las inhibiciones individuales. El tercer tipo de sinergismo es el supra aditivo, donde la adición combinada de ambos fármacos promueve una inhibición mayor al 50% (Tabla 6). Este tipo de aproximación ya se ha aplicado en otro tipo de enfermedades como la candidiasis cuyo tratamiento en

pacientes resistentes a pentamidina (fármaco canónico contra *Candida albicans*) no son eficaces. En este estudio se aplicó la pentamidina junto con la fenazopiridina (FNP), un analgésico que no es utilizado contra la candidiasis. La aplicación de FNP a bajas concentraciones (4.2 µM) no afectó la proliferación de *Candida albicans*, pero potenció (más del 90%) el efecto de la pentamidina. El sinergismo se puede cuantificar con la ecuación de Bliss (Ec. 1) [Borisy et al., 2003] la cual permite analizar el efecto de las dos drogas individualmente o en combinación (Ec. 1).

$$C = A + B - A \cdot B,$$

Ecuación 1. Ecuación de sinergismo tipo Bliss. C= Aditivismo de ambas drogas, A= Inhibición de la droga 1 representada fraccionalmente y B= Inhibición de la droga 2 representada fraccionalmente [Borisy et al., 2003]

El aditivismo tipo Bliss (ATB) se puede determinar experimentalmente como en la figura 4. Por ejemplo, las concentraciones empleadas para Cas II-gly en este estudio fueron 0.2, 0.3, 0.5 y 1 µM, mientras que para cisplatino, las concentraciones empleadas fueron de 25, 50, 100 y 150 µM. Los porcentajes de inhibición de ambos fármacos se ilustran en la Figura 4A. Para el análisis de combinación, las concentraciones de fármacos por arriba de la IC₅₀ son descartadas. La figura 4B muestra un gráfico de matrices de ATB. El valor de cero representa la inhibición individual de cada fármaco, como no hubo combinación el valor de Bliss es "0". En el resto de las celdas se agregan los valores producto de la ecuación 1. Los valores negativos representan un aumento

en la proliferación con la combinación usada en cada caso. Los valores resaltados con color verde, son los valores que reflejan un efecto supra aditivo, ya que en estos casos la inhibición combinatoria de ambas droga fue mayor que la encontrada en la monoterapia (Figura 4B).

% Inhibición						
Cisplatino (μM)	100	14	26	83	94	93
	10	13	9	69	90	92
	1	11	2	60	90	92
	0.1	0	0	59	89	91
	0	0	0	8	28	75
		0	0.11	0.3	0.5	1
Cas II-gly (μM)						

Figura 4A. Porcentaje de inhibición individual de cada fármaco empleado y en combinación.

ATB						
Cisplatino (μM)	100	0	12	61	52	4
	10	0	-4	48	49	4
	1	0	-9	41	51	6
	0.1	0	0	51	61	16
	0	0	0	0	0	0
		0	0.11	0.3	0.5	1
Cas II-gly (μM)						

Figura 4B. Ejemplo de la matriz de Aditivismo Tipo Bliss (ATB) obtenida con datos de esta tesis. Se muestra el porcentaje de inhibición de la proliferación celular en presencia de las diferentes concentraciones de Cas II-gly y de cisplatino (CP). En color verde se resalta el efecto sinérgico supra aditivo que se obtuvo.

Para *Candida albicans*, se determinó que la FNP tenía un efecto supra aditivo (Tabla 6)

Tabla 6. Tipo de aditivismo-Bliss para cada combinación de fármaco.

Cas II-gly (% Inhibición)	Droga 2 (Canónica, no canónica ó antimitocondrial) (% Inhibición)	Resultado de la combinación Efecto (% inhibición)	
50	50	100	Aditivo
20	20	100	Supra aditivo
50	50	20 ó -20	Infra aditivo

Lo anterior confirma que el sinergismo experimental puede ser una alternativa potencial contra otros tipos de enfermedades como el cáncer [Borisy et al., 2003].

A este respecto no existe una combinación farmacológica efectiva contra esta enfermedad. Por ejemplo, la combinación de cisplatino con paclitaxel ha sido hasta la fecha el tratamiento de primera línea contra el cáncer cérvicouterino. Sin embargo, el tumor reincide en corto tiempo (10 meses) además de que el paciente presenta diferentes efectos adversos (fiebre, dolor abdominal, gastritis) disminuyendo su calidad de vida [Dhanalakshmi et al., 2003].

CAPÍTULO II

2.1 Justificación

Las terapias clínicas actuales contra el cáncer cervicouterino provocan efectos secundarios graves en el individuo. Además existe una alta tasa de reincidencia tumoral (5 años) lo cual afecta la calidad de vida del paciente. La vía energética de las células tumorales puede ser un blanco potencial terapéutico contra el CCU debido a que la mitocondria es funcional y provee más de 80% del ATP para su proliferación. La utilización de compuestos que afectan a la mitocondria como son los cationes lipofílicos podrían ser considerados como tratamientos potenciales contra el cáncer porque a bajas dosis y combinados con algunos fármacos clínicos podrían disminuir los efectos adversos de toxicidad observados a altas dosis. Por lo anterior, este estudio contempló analizar el efecto de concentraciones sub-IC₅₀ de Cas II-gly combinada con diferentes compuestos anti-mitocondriales, canónicos y algunos no canónicos para proponer una combinación farmacológica que abata el crecimiento de las células HeLa sin comprometer la integridad de la célula del hospedero.

2.2 Hipótesis

La aplicación sinérgica de Cas II-gly con diferentes tipos de drogas empleadas en el sector clínico contra el CCU, así como no canónicas y anti-mitocondriales a dosis sub-IC₅₀ disminuirá la proliferación de HeLa sin afectar a las células no tumorales.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo General

Evaluar el efecto sinérgico de Cas II-gly con drogas antimitocondriales, no canónicas y canónicas en cultivos bidimensionales de la línea celular HeLa.

2.3.2 Objetivos Particulares

1. Determinar la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) de fármacos anti-mitocondriales, canónicos y no-canónicos, sobre la proliferación de la línea celular HeLa.
2. Evaluar el efecto sinérgico de la Cas II-gly con los diferentes fármacos, canónicos, no-canónicos y anti-mitocondriales a concentraciones menores de la IC_{50} sobre la proliferación de cultivos bidimensionales de la línea celular HeLa.
3. Validar los resultados obtenidos en la línea celular HeLa con otra línea tumoral (A 549, cáncer de pulmón) y no tumoral (3T3, fibroblastos de ratón).

CAPÍTULO III

3 Material y Métodos

3.1 Proliferación de las células HeLa

La línea tumoral HeLa (cáncer cérvicouterino humano estadio IV y altamente metastásica) fue obtenida de la ATCC (American Type Culture Collection). El análisis de genotipificación del Instituto Nacional de Medicina Genómica demostró que la línea HeLa comparte todos los alelos reportados por la ATCC para la autenticación de la misma (Anexo 1).

Las células HeLa (1×10^6 células) fueron cultivadas en 20 mL de Dulbecco-MEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 10,000 unidades de penicilina/estreptomicina en placas de cultivo celular de 150 x 20 mm, a 37°C, 5% CO₂ y 95% aire.

3.2 Curva de crecimiento de la línea celular de HeLa

La curva de crecimiento de HeLa inició con una alícuota inicial de 20,000 células cultivadas en 100 µL de medio Dulbecco-MEM en placas de cultivo de 96 pozos durante 120 h. A las 24, 48, 72, 96 y 120 h, las células se lavaron con buffer de fosfatos PBS (por sus siglas en inglés de Phosphate Buffered Saline) pH 7.2 y se cosecharon con tripsina/EDTA (0.25%). Las células rápidamente se diluyeron con PBS y se centrifugaron a 2200 rpm. El botón celular se diluyó en 1 mL de

PBS. El conteo celular se realizó con una cámara de Neubauer reticulada (Fuchs Rosenthal, 0.0625 mm²) en un microscopio invertido marca Zeiss.

3.3 Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de los diferentes fármacos sobre la proliferación tumoral

Las células HeLa (20,000 cels/100 µL) se crecieron en cajas de cultivo de 96 pozos. Los fármacos (Tablas 4 y 5) se añadieron en la fase de crecimiento exponencial celular (al día 2) en concentraciones exponenciales (0.1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM) por 24 horas. Los 16 fármacos canónicos es decir, empleados en el sector clínico (paclitaxel, doxorrubicina, bleomicina, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, ciclofosfamida, ifosfamida, dacarbazina, gemcitabina, 5-fluoruracilo, topotecan, etopósido, bevacizumab, rituximab, tamoxifem) fueron amablemente donados por el departamento de Quimioterapia del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN). Los compuestos no canónicos y anti-mitocondriales (gossipol, benznidazol, cadmio, jasmonato, furanona, octilguanidina, alda-1, cumarina, nimesulide, Mitoxitea, α-TEA, α-TOS,) fueron obtenidos de casas comerciales establecidas (*SIGMA-ALDRICH, European Pharmacopeia*). La Cas II-gly y Cas III-EA fueron donada por la Dra. Lena Ruiz del Instituto de Química de la UNAM.

3.3.1 Determinación de la proliferación tumoral

La proliferación celular se determinó colorimétricamente utilizando el método de MTT (formazan) que se explica a continuación. En el método, las

células se incubaron con 20 µL de un stock con 5 mg/mL de MTT por 3 h a 37 °C, 5 % CO₂ y 95 % aire. Los cristales de formazan se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y la muestra se leyó a 595 nm en un lector de placas de ELISA (BIO-RAD, Hercules, California, USA).

El análisis de densidad celular se realizó con el software Origin 8 y con un ajuste de decaimiento de tipo exponencial [Greco et al., 1995].

3.4 Determinación de la citotoxicidad de los diferentes fármacos sobre la proliferación de HeLa por el ensayo de bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio (MTT)

La proliferación celular en presencia de los diferentes fármacos fue ensayada con el método de MTT. Este ensayo mide la transformación de la sal de tetrazolio a formazan por las enzimas deshidrogenasas de las células. A mayor exposición de las deshidrogenasas, mayor coloración azul y menor toxicidad del fármaco [Plumb, 2004].

Las células de HeLa se expusieron a cada fármaco por 24 h, fueron incubadas con 5 mg/mL de MTT por 3 h a una temperatura 37 °C, 5 % CO₂ y 95 % aire. Los cristales de formazan se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y la muestra se leyó a 595 nm en un lector de placas de ELISA (BIO-RAD, Hercules, California, USA).

3.5 Análisis de la toxicidad de los fármacos utilizando el sinergismo tipo Bliss

Una vez determinada la IC_{50} de Cas II-gly y de los fármacos canónicos, no-canónicos y anti-mitocondriales, se realizaron las curvas de crecimiento en presencia de la combinación de fármacos. Las células de HeLa (20,000 cels/ 100 μ L) fueron cultivadas en DMEM en placas de 96 pozos. Durante su crecimiento exponencial, se adicionó Cas II-gly (a dosis menores de su IC_{50}) en conjunto con los diferentes fármacos (a dosis menores de su respectiva IC_{50}) durante 24 h. El efecto de los fármacos sobre la proliferación tumoral se realizó por el ensayo MTT.

El sinergismo tipo Bliss se cuantificó con la ecuación 1 para determinar el tipo de aditivismo tipo Bliss (Tabla 6) que presentó cada combinación sub- IC_{50} de Cas II-gly con los diferentes fármacos canónicos y no canónicos. Para la determinación de la potenciación los diferentes fármacos sobre Cas II-gly, se calculó nuevamente la IC_{50} de Cas II-gly en presencia de concentraciones conocidas de cada fármaco.

CAPÍTULO IV

4 Resultados

4.1 Crecimiento de la línea celular de HeLa

El crecimiento de HeLa se muestra en la Figura 5. La curva de crecimiento se realizó durante 5 días; el crecimiento exponencial se registró del día 1 al día 3; la fase estacionaria se registró en el día 4 y 5. El análisis semi-logarítmico [Phelan et al., 2016] (Figura 6) del día 1 al 3 mostró un tiempo generacional de 21 ± 3 h como está reportado para CCU HeLa bajo las mismas condiciones experimentales [Meck et al., 1976].

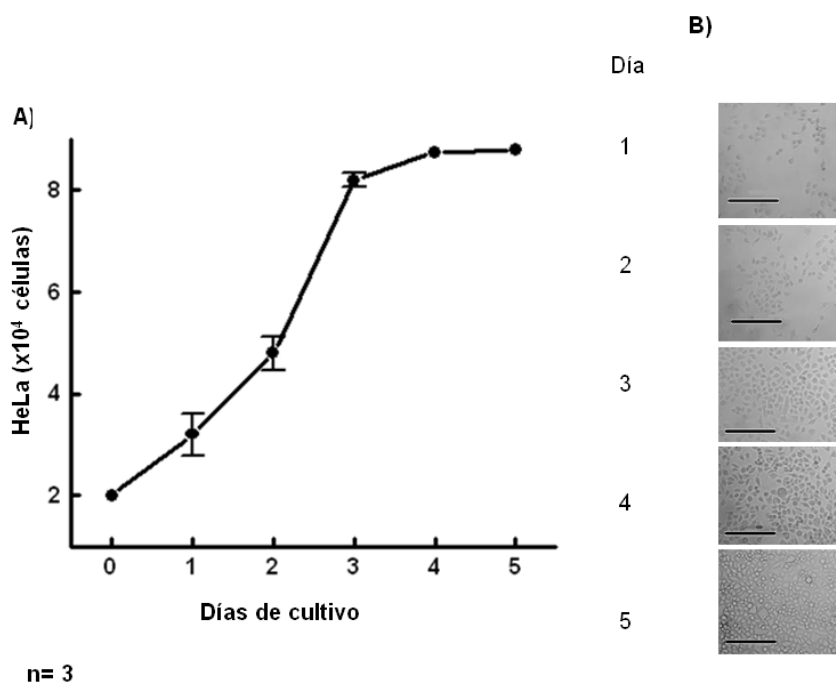


Figura 5. (A) Curva de crecimiento de las células HeLa. Los datos muestran el promedio \pm desviación estándar, $n=3$; (B) morfología de las células HeLa en los diferentes tiempos de cultivo. Barra = 200 μm .

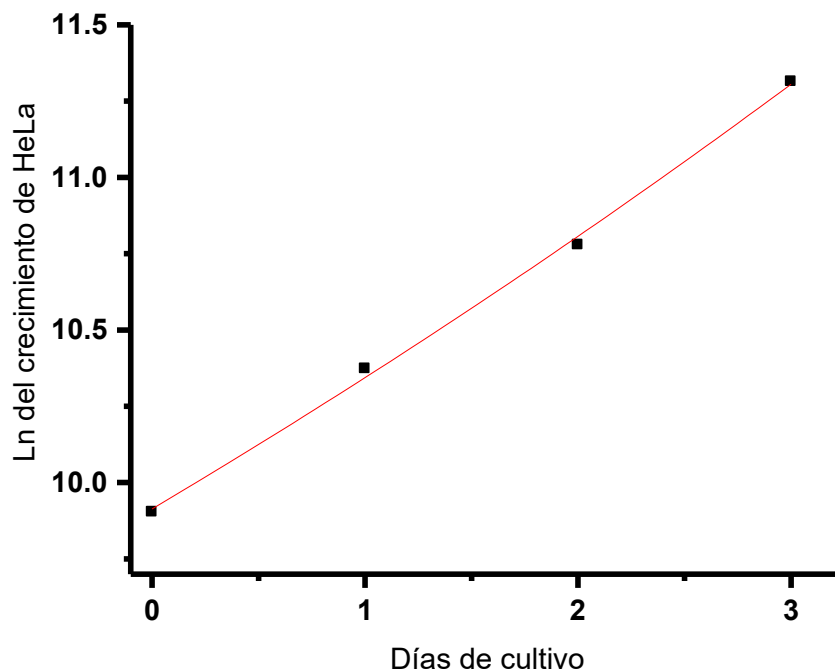


Figura 6. Análisis semi-logarítmico del crecimiento exponencial de las células HeLa del día 1 al día 3 de cultivo. Ln, logaritmo natural.

4.2 Toxicidad de los fármacos antimitocondriales, canónicos y no canónicos sobre el crecimiento de HeLa

El efecto de las drogas en la proliferación celular de HeLa, fue evaluada 24 horas después de haber agregado los fármacos los cuales fueron añadidos al segundo día de cultivo es decir, en fase de proliferación (Figura 7). El análisis de proliferación se realizó con MTT, en condiciones de normoxia (95% aire y 5% CO₂) y DMEM 25 mM de glucosa a 37°C. Las IC₅₀ de los diferentes fármacos (antimitocondriales, canónicos y no canónicos) en la proliferación de HeLa se muestra en la Tabla 7.

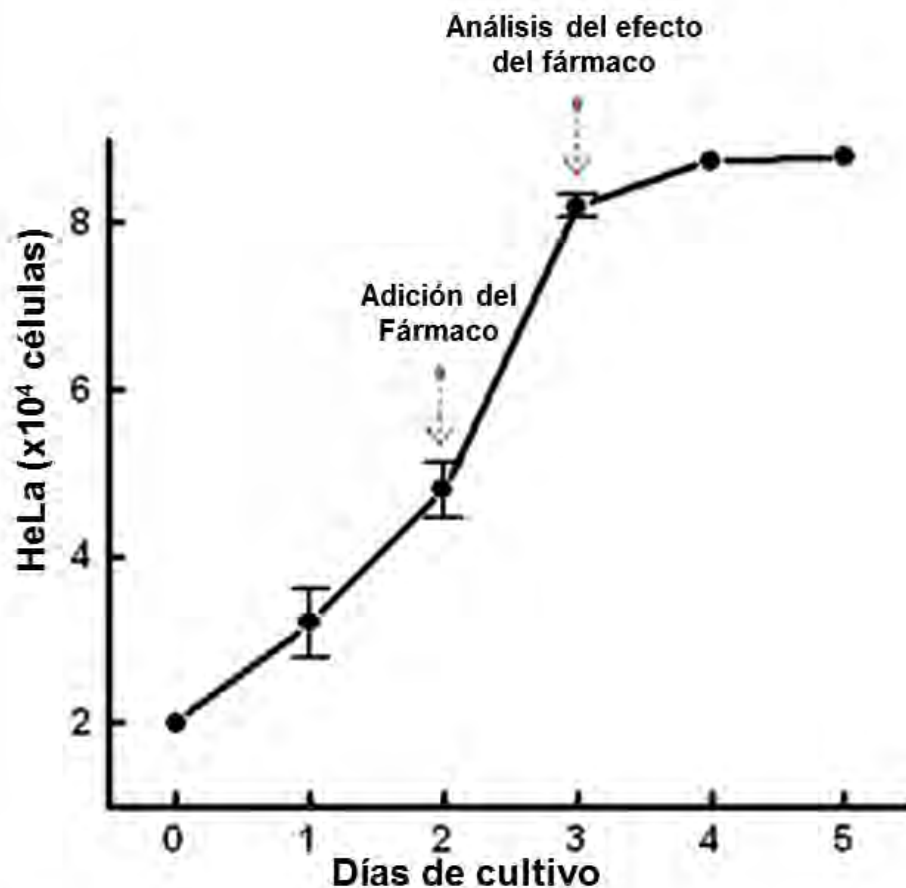


Figura 7. Gráfico que muestra el día de adición del fármaco. El fármaco a evaluar se añadió al día 2 (crecimiento exponencial) por 24 horas. Al término, las células se cosecharon y se analizó el efecto del fármaco sobre la proliferación tumoral. Se muestran los datos en promedio \pm desviación estándar de al menos 3 cultivos diferentes.

El crecimiento de HeLa resultó ser más sensible a los fármacos antimitocondriales que a los canónicos y no canónicos, como se ha reportado en la literatura [Rodríguez-Enríquez et al., 2009; Mandujano-Tinoco et al., 2013]. La potencia de Cas II-gly, Cas III-EA, mitoxitea, α TEA y α TOS fue menor a $5 \mu\text{M}$, (Tabla 7) comparada con los fármacos canónicos y no canónicos; indicando que la proliferación del tumor es sostenida principalmente por el ATP mitocondrial tal como se ha reportado previamente [Rodríguez-Enríquez et al., 2009].

Las IC_{50} de los fármacos canónicos utilizados en el sector clínico pero diseñados contra otros tipos de cáncer diferentes al CCU tuvieron valores en rangos milimolar (Tabla 7), indicando que dosis muy altas de dichos fármacos pueden abatir el crecimiento del tumor con posibles efectos colaterales [Chatterjee et al., 2010; Ch et al., 2012; Yang et al., 2013; Simkovic et al., 2015]. Los fármacos empleados en la quimioterapia convencional contra el CCU como paclitaxel, doxorubicina, topotecan, etóposidos y la familia de los platinos (cisplatino y oxaliplatino) mantuvieron valores de IC_{50} menores (30-300 μ M) comparados con el tamoxifen, gemcitabina, ifosfamida y ciclofosfamida (habitualmente utilizados en la quimioterapia contra el cáncer de mama) con IC_{50} de 16-32.5 mM. Finalmente los fármacos que tienen un origen proteico dirigidos contra una proteína específica sobre-expresada en cáncer de mama como son las tirosin cinasas [William et al., 2005; Advani et al., 2012; Simkovic et al., 2015], es decir bevacizumab, bleomicina y rituximab, mostraron valores de IC_{50} más altas que los compuestos antimitocondriales (IC_{50} = 1-4 mM).

Interesantemente, algunos compuestos cuyo efecto sobre la proliferación, metabolismo o viabilidad del cáncer que no han sido explorados, abatieron la proliferación de HeLa con valores de IC_{50} en el rango micromolar. Entre estos destacan el antiparasitario benznidazol, la hormona metil-jasmonato, el activador de la ADH alda-1 y el antioxidante cumarina (Tabla 7). Otros compuestos considerados no-canónicos por su uso limitado contra el tumor debido a su alta toxicidad son el cadmio y la octilguanidina (OG). Ambos tienen como blanco alterno a la mitocondria debido a que promueven (a) radicales libres (cadmio) o (b) la apoptosis intrínseca (OG) [Rideout, 1986; Kazuo et al., 1991]. Contra el CCU,

ambos compuestos tuvieron un efecto potente, abatiendo la proliferación tumoral con valores de IC_{50} de 30-40 μM . Inhibidores clásicos contra la glucólisis como el gossipol o los anti-inflamatorios no esteroideos como el nimesulide (Tabla 7) abatieron la proliferación del CCU a concentraciones en el rango milimolar, pero a dosis menores comparadas con las obtenidas para los fármacos canónicos y por supuesto, contra los anti-mitocondriales.

Tabla 7. Valores de IC₅₀ de los fármacos antimitocondriales, canónicos y no-canónicos en las células HeLa

Drogas antimitocondriales		Fármacos Canónicos	
Fármaco	IC50 (µM)	Fármaco	IC50 (mM)
Casiopeina IIgly	1.5 ± 0.9 (6)	Paclitaxel	30 ± 10 µM (4)
Casiopeina III Ea	1.1 ± 0.9 (4)	Doxorubicina	0.1 ± 0.01
Mitoxitea	1 ± 0.15	Bleomicina	30 µU (2)
α TOS	1.2 ± 0.46	Cisplatino	0.3 ± 0.1 (4)
α TEA	4.7 ± 0.7	Carboplatino	1 ± 0.4 (5)
Fármacos no canónicos		Oxaliplatino	0.3 ± 0.1 (5)
Fármaco	IC50 (µM)	Ciclofosfamida	16 ± 3
Gossipol	6 mM ± 0.4	Dacarbazina	3 ± 2 (4)
Benznidazol	0.8 ± 0.14	Ifosfamida	26 (1)
Cadmio	40 ± 6	Gemcitabina	30 (1)
Jasmonato	1 ± 0.05	5-Fluorouracilo	20 (1)
Furanona	21 ± 16	Topotecan	0.25 (1)
Octilguanidina	34 ± 11	Etóposido	0.15 (2)
Alda-1	0.4 ± 0.01	Bevacizumab	1
Cumarina	0.86 ± 0.03	Rituximab	4 (2)
Nimesulide	4mM ± 0.7	Tamoxifen	32.5 ± 4.3

Los valores indican el promedio de al menos 3 determinaciones diferentes ± desviación estándar, excepto donde se indique lo contrario. El efecto del fármaco sobre la proliferación celular se evaluó después de 24 h de exposición. Abreviaciones: µU (microunidades)

4.3 Efecto sinérgico de la casiopeina II gly con drogas canónicas, no canónicas y anti-mitocondriales sobre la proliferación de HeLa

La Cas-IIgly y las drogas canónicas, no canónicas y anti-mitocondriales se añadieron simultáneamente en el día 2 (Figura 7) de cultivo. El efecto sinérgico se analizó después de 24 horas utilizando la ecuación del sinergismo tipo Bliss [Borisy et al., 2003].

El catión lipofílico Cas II-gly fue la droga anti-mitocondrial base por tener mayor potencia a dosis menores comparada con α -TEA; además de que tiene como enzimas blanco a tres deshidrogenasas importantes de la FO, la PDH, la 2OGDH y la SDH. Aunque la potencia de la Cas III-EA resultó ser mayor que la Cas II-gly (Tabla 7), el efecto de la Cas III-EA no se ha ensayado en células normales comparada con la Cas II-gly [Marín-Hernández et al., 2012].

La combinación de la Cas II-gly con los fármacos canónicos de la tabla 7 mostró un efecto dual dependiendo de los fármacos evaluados. El fluoroacilo, dacarbazina y oxaplatino combinados con Cas II-gly (0.3-1 μ M) mostraron un efecto infra-aditivo (Tabla 8) con valores negativos de -1 a -72 indicando que dichos fármacos podrían estar interactuando entre sí y evitando su interacción con la célula.

Tabla 8. Efecto infra-aditivo de Cas II-gly con algunos fármacos canónicos en HeLa

Fármaco	[μM]	Cas II-gly [μM]	ATB
Oxaliplatino	10 – 300	0.3 – 1	- (3 - 55)
Fluoroacilo	0.1 – 20	0.5 – 1	- (1 – 17)
Docetaxel	0.1 – 5		- (9 – 35)
Doxorrubicina	1 – 2	0.3 - 1	- (4 – 35)
Dacarbazina	0.5 - 10		- (3 – 72)

Los valores de IC_{50} de oxaliplatino, fluoroacilo, docetaxel, doxorubicina y dacarbazina son 0.3 ± 0.1 , 20, 0.25, 0.1 ± 0.01 y 3 ± 2 mM, respectivamente. La IC_{50} de Cas II-gly es 1.5 μ M. Los valores en micromolar indican el rango de concentración utilizado por los fármacos. ATB son los valores de aditividad tipo Bliss calculados con la ecuación 1, $n=3$.

Por el contrario, paclitaxel, cisplatino, gemcitabina, ciclofosfamida y carboplatino mostraron un efecto supra-aditivo con Cas II-gly (Tabla 9). Interesantemente, el paclitaxel y los compuestos base platino (cisplatino y carboplatino) que son los fármacos utilizados en la quimioterapia en México [Montalvo et al., 2011] contra CCU tuvieron los valores de supra-aditivo más altos (desde 14 hasta 52) después de ser combinados con Cas II-gly. De hecho, la combinación de Cas II-gly de 0.3 μ M y cisplatino 50 μ M fue donde se observó el mayor valor de supra-aditivo evaluada (Tabla 9). La combinación de Cas II-gly con gemcitabina y ciclofosfamida (quimioterapia utilizada contra el cáncer de mama y ovario) mostró un efecto supra-aditivo menor (9–13) sobre la proliferación celular comparado con paclitaxel y los compuestos base-platino.

Tabla 9. Efecto supra aditivo de Cas II-gly con algunos fármacos canónicos en HeLa

Fármaco	[mM]	Cas II-gly [μM]	ATB
Paclitaxel	0.01	0.3 – 1	28 – 41
Cisplatino	0.05	0.3	14 – 52
Gemcitabina	0.5 – 1	0.3 – 0.5	9 – 13
Ciclofosfamida	0.25 – 1	0.3	10
Carboplatino	0.15	0.3 – 0.5	15 – 39

Los valores de IC_{50} de paclitaxel, cisplatino, gemcitabina, ciclofosfamida y carboplatino son $30 \pm 10 \mu$ M, 0.3 ± 0.1 mM, 30, 16 ± 3 mM y 1 ± 0.4 mM respectivamente. La IC_{50} de la CasII-gly es 1.5μ M. Los valores en micromolar indican el rango de concentración utilizado por los fármacos. ATB son los valores de aditivismo tipo Bliss calculados con la ecuación 1, Los valores indican el ATB en cada sinergismo. n = 3.

La Cas II-gly ($0.3 - 0.5 \mu$ M) en combinación con compuestos no canónicos como furanona ($5 - 20 \mu$ M), octilguanidina ($5 - 30 \mu$ M), jasmonato ($0.1 - 1 \mu$ M), benznidazol ($0.1 - 0.8 \mu$ M) ó cloruro de cadmio ($5 - 35 \mu$ M) no tuvo efecto sobre la proliferación de HeLa. Sin embargo, el análisis de Bliss mostró que la Cas II-gly tiene un efecto infra-aditivo con cada uno de ellos. Los valores negativos en las gráficas ATB revelaron que ambos fármacos interactuaron entre sí como se ha documentado para el tratamiento de cáncer de pulmón metastático donde se utilizó la dexametasona combinada con interleucina-2 [Papa et al., 1986]. En este estudio, se mostró que ambos compuestos juntos no tenían la potencia determinada con monoterapia y se favorecía la proliferación tumoral.

La observación importante de nuestros resultados es que furanona, octilguanidina, jasmonato, o benznidazol no deben ser combinados con la Cas II-gly en pacientes que tienen cáncer CCU debido a su fuerte efecto potenciador sobre la proliferación del tumor (Tabla 10).

Tabla 10. Sinergia infra aditiva de Cas II-gly con compuestos no canónicos sobre la proliferación de HeLa.

Fármaco	Fármaco [μM]	Cas II-gly [μM]	ATB
Benznidazol	0.1 – 0.8	0.3 – 0.5	- (19 – 45)
Cloruro de Cadmio	5 - 35		- (23 – 62)
Jasmonato	0.1 - 1		- (39 – 97)
Furanona	5 - 20		- (9 – 64)
Octilguanidina	5 - 30		- (9 -64)
Alda-1	0.05 – 0.4		-(13-14)
Cumarina			

Los valores de IC₅₀ de benznidazol, cloruro de cadmio, jasmonato, furanona, octilguanidina, alda-1 y cumarina son 0.8 ± 0.14 μM, 40 ± 6 μM, 1 ± 0.05 μM, 21 ± 16 μM; 34 ± 11 μM; 0.4 ± 0.01 μM y 0.86 ± 0.03 μM, respectivamente. Los valores en micromolar son el rango de concentración utilizado por los fármacos así como la Cas II-gly. ATB son los valores de aditivismo tipo Bliss calculados con la ecuación 1, n=3.

Algunas drogas anti-mitocondriales como las reportadas en la Tabla 11 inhiben las mismas enzimas que la Cas II-gly [Malafa et al., 2002; Marín-Hernández et al., 2006; Lang et al., 2010]. La adición de dichos inhibidores a concentraciones sub IC₅₀ sobre la proliferación de células de HeLa mostró un aditivismo infra-aditivo en presencia de Cas II-gly. Sin embargo, es poco probable que siendo un catión lipofílico, la Cas II-gly interactúe con otros cationes lipofílicos como mitoxitea, α-TEA, α-TOS, Cas III-Ea.

La combinación de Cas II-gly con algunos compuestos como ALDA-1 o cumarina a bajas concentraciones (<50 nM) arrojó valores de ATB negativos (-13), mientras el valor de ATB en la combinación Cas II-gly + α-TEA (400 nM) fue de -

90. Lo anterior indica que ambos compuestos (Cas II-gly+ ALDA-1 o α -TEA o cumarina) podrían interactuar entre sí evitando inhibir la proliferación del tumor o que ambos podrían potenciar la proliferación tumoral lo cual desde el punto de vista clínico sería contraproducente.

Tabla 11. Efecto infra aditivo de Cas II-gly con fármacos anti-mitocondriales en cultivo bidimensional de HeLa

Fármaco	Fármaco [μ M]	Cas II-gly [μ M]	ATB
Mitoxitea	0.1 - 1	0.3 – 0.5	- (38 – 57)
α TOS	0.1 - 1		- (41 – 71)
α TEA	0.5 – 4		- (18 – 90)

Los valores de IC_{50} de mitoxitea, α -TEA y α -TOS son $1 \pm 0.15 \mu$ M, $1.2 \pm 0.46 \mu$ M y $4.7 \pm 0.7 \mu$ M, respectivamente. Los valores en micromolar son el rango de concentración utilizado por los fármacos así como de la Cas II-gly. ATB son los valores de aditivismo tipo Bliss calculados con la ecuación 1. Los valores indican el ATB en cada sinergismo. n=3.

4.4 Efecto sinérgico de la Cas II-gly sobre la proliferación de A549

Los fármacos que mostraron un efecto supra aditivo con Cas II-gly en HeLa, se ensayaron también en la línea tumoral A549 (cáncer pulmonar estadio III) enfermedad que ocupa el tercer lugar en muertes de mujeres a nivel mundial [GLOBOCAN, 2012] (Tabla 12). Para este tipo de experimentos se utilizó la IC_{50} calculada para HeLa y se aplicó sobre A549.

El análisis Bliss mostró que la Cas II-gly tiene un efecto supra-adictivo con los fármacos utilizados en la terapia convencional contra el cáncer de pulmón. Paclitaxel, cisplatino, carboplatino, ciclofosfamida y gemcitabina tuvieron valores de ATB de 23 hasta 90. El mayor efecto supra aditivo (ATB=90) fue la

combinación Cas II-gly con carboplatino, seguido por cisplatino con (ATB= 26-67 ATB) y ciclofosfamida (ATB=23 – 67) (Tabla 12).

Tabla 12. Efecto supra aditivo de Cas II-gly con fármacos canónicos en cultivo bidimensional de A 549

Fármaco	(mM)	Cas II-gly (μM)	ATB
Cas II-gly $1 \pm 0.09 \mu\text{M}$			
Paclitaxel	0.01 μM	0.25 – 0.75	38- 48
Cisplatino	0.5		26 – 67
Gemcitabina	0.5 – 1		23 – 68
Ciclofosfamida	0.25 – 1		23 – 67
carboplatino	0.75 – 1		38 - 90

Los valores de IC_{50} de paclitaxel, cisplatino, gemcitabina, ciclofosfamida y carboplatino son $30 \pm 10 \mu\text{M}$, $0.3 \pm 0.1 \text{ mM}$, 30, $16 \pm 3 \text{ mM}$ y $1 \pm 0.4 \text{ mM}$ calculados para HeLa, respectivamente. Los valores en micromolar son el rango de concentración utilizado por los fármacos así como la Cas II-gly. ATB son los valores de aditivismo tipo Bliss calculados con la ecuación 1, $n=3$. Los valores indican el ATB en cada sinergismo. $n = 3$.

Las matrices de Bliss (Figura 9) muestran los datos del aditivismo máximo (ATB=90) obtenido con una concentración de Cas II-gly $0.5 \mu\text{M}$ y carboplatino 1 mM.

ATB						
Carboplatino (mM)	1	0	81	90	80	99
	0.75	0	50	78	54	67
	0.5	0	38	55	52	60
	0.25	0	-2	12	45	53
	0	0	0	0	0	0
		0	0.25	0.5	0.75	1
			Cas II-gly (μM)	Cas II-gly (μM)		

Figura 9 Matriz tipo Bliss que muestra el porcentaje de inhibición de la proliferación celular en presencia de las diferentes concentraciones de Cas II-gly y de carboplatino. En azul se muestra la inhibición sinérgica de Cas II-gly y carboplatino donde se alcanzó un máximo de inhibición supra aditiva.

En la figura 10 se muestra el efecto del carboplatino 1mM disminuyendo al 50% la IC₅₀ de Cas II-gly de 1 μM a 0.5 μM .

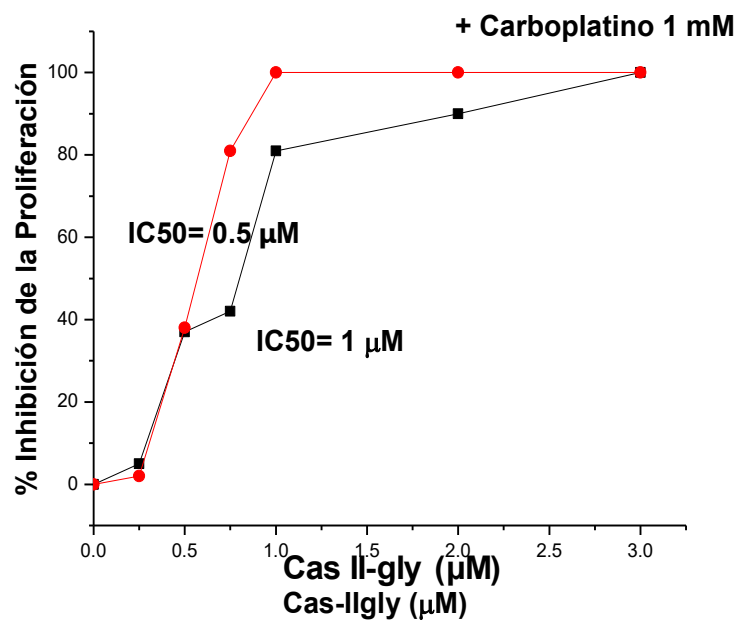


Figura 10: Efecto de carboplatino, sobre la IC₅₀ de Cas II-gly.

4.5 Efecto sinérgico de la Cas II-gly sobre la proliferación de 3T3

La utilización de fármacos experimentales sobre los modelos tumorales involucra el análisis de su efecto sobre células no-tumorales para evitar efectos en el hospedero [Borisy et al., 2003]. Por lo anterior, se evaluaron los fármacos con máximo efecto supra aditivo sobre HeLa y A549 en fibroblastos de ratón 3T3. Individualmente, cada fármaco (Cas II-gly, carboplatino, paclitaxel y cisplatino) no afectó significativamente la proliferación de 3T3 (la inhibición de la proliferación osciló entre 0.7-2.5 %) a las concentraciones ensayadas en HeLa y A549. Por otro lado, la combinación de Cas II-gly con todos los fármacos ensayados no tuvo repercusión sobre la proliferación de 3T3 demostrando su efecto inocuo sobre las células del hospedero.

Tabla 13. Ausencia de aditivismo tipo Bliss en fibroblastos 3T3 después del tratamiento combinado de Cas II-gly y diferentes drogas antineoplásicas

Fármaco	[mM]	Cas II-gly (μM)	ATB
Paclitaxel	0.03	0.3 – 1.5	1
Cisplatino	0.3		0.75
Gemcitabina	30		0
Ciiclofosfamida	16		0
carboplatino	1		2.5

Los valores en micromolar son el rango de concentración utilizado por los fármacos y de la Cas II-gly. ATB son los valores de aditivismo tipo Bliss calculados con la ecuación 1, n=3. Los valores indican el ATB en cada sinergismo. n = 3.

4.6 Evaluación del efecto de los fármacos canónicos sobre la concentración inhibitoria 50 de Cas II-gly

En múltiples modelos tumorales se ha propuesto que la sinergia de un fármaco está estrechamente relacionada con su capacidad de aumentar la potencia de un segundo fármaco, es decir, disminuir su concentración inhibitoria 50 [Borisy et al., 2003; Lehár et al., 2009]. Por tanto se evaluó la capacidad de cada fármaco sinérgico con efecto supra-aditivo sobre la potencia de Cas II-gly (Tabla 14). La IC_{50} de Cas II-gly en ausencia de fármaco fue 1.5 μ M y disminuyó 40-50% después del tratamiento con paclitaxel, gemcitabina y ciclofosfamida por 24 h. Sin embargo, la IC_{50} de Cas II-gly con cisplatino (50 μ M) disminuyó más de 15 veces. Resultados similares se encontraron en el cáncer de pulmón A549 utilizando taxol 2 nM combinado con discodermolida 8.1 nM, otro desestabilizante de microtubulos [Martello et al., 2000].

Tabla 14. Aumento de la potencia de Cas II-gly sobre la proliferación de HeLa y A549 después del tratamiento de los fármacos canónicos por 24 h

	IC₅₀ (μM)	Sinergismo	IC₅₀ (μM)	
Casiopaina II gly	HeLa			
	1.5 ± 0.9 (6)	Paclitaxel	0.63 ± 0.29	(3)
		Cisplatino	0.080 ± 0.04	
		Gemcitabina	0.73 ± 0.12	
		Ciclofosfamida	0.85 ± 0.46	
		Carboplatino	0.90 ± 0.17	
	A549			
	1 ± 0.09 (3)	Paclitaxel	0.61 ± 0.11	(3)
		Cisplatino	0.33 ± 0.09	
		Gemcitabina	0.45 ± 0.004	
		Ciclofosfamida	0.71 ± 0.32	
Carboplatino		0.50 ± 0.05		

Los valores en micromolar son el rango de concentración utilizado para Cas II-gly, en HeLa y A549. Los valores entre paréntesis indican el número de repeticiones.

CAPÍTULO V

5 Discusión

El uso de fármacos antineoplásicos en la clínica está ligado a múltiples efectos secundarios, lo que disminuye la calidad de vida del paciente [Chatterjee et al., 2010; Advani et al., 2012; Yang et al., 2013; Simkovic et al., 2015]. Por lo tanto, la identificación de nuevos blancos terapéuticos cobra mayor importancia en la clínica para contrarrestar el crecimiento tumoral sin afectar a las células sanas. En los últimos 15 años el metabolismo energético [Hanahan y Weinberg, 2011] y sobretodo la fosforilación oxidativa ha surgido como un nuevo biomarcador tumoral debido a la observación de que las células tumorales dependen mayoritariamente de la mitocondria [Zu y Guppy, 2004; Rodríguez-Enríquez et al., 2006; Moreno-Sánchez et al., 2010]. De hecho, el cáncer cervicouterino HeLa depende más del 80% del ATP mitocondrial en condiciones de normoxia [Rodríguez Enríquez et al., 2009]. Estas observaciones concuerdan con lo reportado en la literatura [Malafa et al., 2002; Lang et al., 2010] donde se propone que la mitocondria es funcional y esencial para que la célula tumoral crezca y se desarrolle. Por tanto podría ser considerado un blanco importante para la inhibición del crecimiento tumoral [Moreno-Sánchez et al., 2010].

La alta dependencia del tumor a la mitocondria permite cierta selectividad de algunos fármacos hacia el tumor y en menor grado hacia la célula no tumoral. Por ejemplo, el alto potencial transmembranal mitocondrial electronegativo encontrado en la mitocondria tumoral ($-\Delta\Psi_m = 180$ mV) comparado con mitocondrias normales ($-\Delta\Psi_m = 160$ mV) permite una internalización y acumulación de cationes

lipofílicos mayor del 68% en comparación con una célula no tumoral [Nicholls et al., 1999]. Esta observación correlaciona con la alta toxicidad de varios cationes lipofílicos como la Cas II-gly, mitoxitea, y los derivados de la vitamina E encontrada en células HeLa (Tabla 2) cuya IC_{50} está en el intervalo micromolar tal como se ha publicado en diferentes líneas tumorales humanas como son HeLa, MCF7, C6, A549, H157) [Trejo-Solís et al., 2005; Rodríguez-Enríquez et al., 2006; Kachadourian et al., 2010; Mandujano-Tinoco et al., 2013] y comparados con los fármacos canónicos que se encuentran en rango mM (Tabla 4).

5.1 Los cationes lipofílicos disminuyen la proliferación de HeLa en monoterapia

Las drogas antimitocondriales CasII-gly, casiopeina III-EA, mitoxitea, α -TOS, α -TEA se han evaluado en diferentes tipos de células tumorales de roedor (AS30D) y humanas (glioma C6, mama triple negativo MDA MB 231 y colon HCT116). La potencia de estos inhibidores (Tabla 5) fue 25 veces mayor que la obtenida para los fármacos canónicos clínicos (Tabla 4). El mecanismo de acción de algunos de los compuestos antimitocondriales como la familia de las casiopeinas es su fuerte efecto inhibitorio sobre enzimas involucradas en el metabolismo mitocondrial como la piruvato deshidrogenasa, la 2-oxoglutarato deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa. A dosis menores (5 μ M) la Cas II-gly también desencadena la apoptosis intrínseca o mitocondrial, liberando citocromo c al citosol [Trejo-Solís et al., 2005; Marín-Hernández et al., 2003; 2006; Lan, 2010].

La Cas II-gly resultó ser el compuesto antimitocondrial con mayor potencia (4 veces más) que el resto de las drogas antimitocondriales ensayadas. Lo anterior

se debe a su efecto multisitio: Cas II-gly (3.5 μM) afecta el consumo de oxígeno sensible a oligomicina en el hepatocarcinoma de rata AS30D [Marín-Hernández et al., 2006], a través de la inhibición de diferentes enzimas del ciclo de Krebs a concentraciones micromolares ($K_i = 5 \mu\text{M}$), algunas de ellas consideradas sitios de control en mitocondrias [Marín-Hernández et al., 2006; Rodríguez-Enríquez et al., 2006]. La inhibición de la piruvato deshidrogenasa (PDH), la 2-oxoglutarato deshidrogenasa (2OGDH) y la succinato deshidrogenasa (SDH) por Cas II-gly se debe a que ésta interactúa con los grupos tiol de los sitios reactivos de cada enzima [Marín-Hernández et al., 2003; 2006; Hernández-Esquivel et al., 2006]. A más altas dosis (100 μM) la Cas II-gly (i) se intercala en el DNA promoviendo su desestabilización [Rodríguez-Mercado et al., 2006], (2) promueve apoptosis [Trejo-Solís et al., 2005] e (3) inhibe enzimas involucradas en el metabolismo glucolítico como la HKII [Marín-Hernández et al., 2012]. Debido a que las IC_{50} de Cas II-gly sobre la proliferación de diferentes carcinomas como mama MCF7, glioma C6, pulmón A549, H157, mama triple negativo MDA MB 231 y MDA MB 468 así como la subpoblación de células troncales stem cells derivadas de MCF-7 se reporta menor a 5 μM [Trejo-Solís et al., 2005; Kachadourian et al., 2010; Mandujano-Tinoco et al., 2013; Pacheco-Velázquez et al., y Ladrón de Guevara et al., 2016 manuscritos en preparación], entonces se ha propuesto que el evento inicial por el cual las células arrestan su ciclo celular es por el abatimiento de la fosforilación oxidativa y en consecuencia la disminución abrupta en la concentración intracelular de ATP lo que conlleva a la cesación del ciclo celular.

5.2 Los fármacos no canónicos afectan la proliferación de HeLa en monoterapia

El uso de drogas que no son empleadas para inhibir la tumorigénesis y tienen como blanco otros procesos pueden tener efecto sobre la proliferación de líneas tumorales [Rotem et al. 2005; Calderon-Montaña et al., 2013; Calvo et al., 2013; Lin et al., 2013]. El presente estudio contempló utilizar varios de estos compuestos (Tabla 5) que aunque se fabricaron para contrarrestar la evolución de otras enfermedades, sí han logrado la inhibición parcial de la proliferación del tumor [Calderón-Montaña et al., 2013; Calvo et al., 2013; Nasr et al., 2014]. Las drogas no canónicas que tuvieron mayor potencia contra la proliferación de HeLa con una IC_{50} menor a $1\mu M$ fueron el benznidazol, la cumarina y el ALDA-1. El benznidazol es un pro-oxidante utilizado contra el microorganismo patógeno *Trypanosoma sp.* causante de la enfermedad de chagas. Además tiene efecto sobre el metabolismo mitocondrial [Nogueira et al., 2008]. También afecta proteínas relacionadas con apoptosis y ciclo celular, como son la p27, caspasas 3 y 7 a dosis en el rango de 2-5 μM [Calvo et al., 2013; Nasr et al., 2014]. La cumarina es utilizado como activador de ALDH en células cardiacas y potente inhibidor del ciclo celular e inductor de apoptosis en células tumorales [Nasr et al., 2014; Ying-Yuan et al., 2007].

El jasmonato, el cloruro de cadmio, la furanona, y la octiguanidina también tuvieron efectos sobre la proliferación de HeLa a dosis menores o similares que las reportadas en otras líneas tumorales [Rotem et al. 2005; Calderon-Montaña et al., 2013; Calvo et al., 2013; Lin et al., 2013]. El jasmonato es un compuesto de origen natural empleado para arrestar el ciclo celular tumoral a través de la

inhibición de los complejos ciclinas-cinasas de los parásitos en plantas [Wu et al., 2016]. Sin embargo, a nivel mitocondrial, induce apoptosis a través de la liberación del citocromo tipo c en el carcinoma hepático Hep 3B en concentraciones milimolares [Rotem et al., 2005]. No hay reportes de su efecto sobre el metabolismo mitocondrial. El cloruro de cadmio también resultó efectivo para abatir el crecimiento de HeLa presumiblemente a través de su efecto pro-oxidante [Kazuo et al., 1991] tal como se ha reportado en Hep 3B [Rotem et al., 2005]. Sin embargo, las dosis empleadas de jasmonato son 50 veces mayores que las del cloruro de cadmio, sugiriendo que es un compuesto inespecífico. La octilguanidina se emplea para inducir apoptosis [Wilson et al., 1990; Rideout, 1986]. Su IC_{50} ($34 \pm 11 \mu M$) también es considerada atractiva para el sector clínico y coincide con lo reportado por Rideout en 1986 para el mismo tipo tumoral que se ensayó en este estudio. Además de inhibir del poro de transición mitocondrial se ha reportado que inhibe los estados 3 y 4 de la respiración mitocondrial [Wilson et al., 1990; Rideout, 1986].

El gossipol es un inhibidor inespecífico de la glucólisis. Inhibe a las enzimas dependientes de equivalentes reductores NADH/NAD como son la GAPDH y LDH [Qian y Wang, 1984], al evaluar el efecto que tiene esta droga sobre el crecimiento celular de HeLa, la IC_{50} evaluada fue de 6 mM, comprobando que esta línea celular depende más del ATP mitocondrial que de la glucólisis ya que las concentraciones usadas con los inhibidores mitocondriales fueron en rango μM (Tabla 7). El nimesulide, un anti inflamatorio no esteroideo también se ensayó por su efecto desacoplante a nivel mitocondrial [Moreno-Sánchez et al., 1999]. Sin

embargo, su concentración inhibitoria fue en el rango milimolar, aunque su IC₅₀ fue menor comparada con los no canónicos y con los canónicos (Tabla 7).

La furanona también abatió la proliferación del cáncer de HeLa en las concentraciones reportadas para cáncer de pulmón [Calderon-Montaña et al., 2013]. La furanona es utilizada para disminuir la patogenicidad bacteriana [Trizna et al., 2015] y abate la proliferación de cáncer por su efecto inhibitor sobre la topoisomerasa I [Calderon-Montaña et al., 2013].

Los datos anteriores sugieren que los fármacos no canónicos podrían estar afectando la mitocondria disminuyendo el suministro de ATP a dosis similares que las empleadas para contrarrestar el ciclo celular.

5.3 Los fármacos utilizados en la clínica no afectan importantemente la proliferación de HeLa en monocapa

En la clínica, los compuestos utilizados en la quimioterapia contra el cáncer cervicouterino son el cisplatino, el paclitaxel, la doxorubicina y los etopósidos [Montalvo et al., 2011]. En estudios en monoterapia se ha descrito que HeLa es altamente sensible a dichos fármacos con IC₅₀ en el rango micromolar después de 24 h de tratamiento: cisplatino (IC₅₀ 7 μM), paclitaxel (IC₅₀ 2 μM), doxorubicina (IC₅₀ 20 μM) y etopósido (IC₅₀ 22 μM) [Wang et al., 2002; Qi et al., 2005; Da Silva et al., 2012; Wu et al., 2013]. Sin embargo, nuestros datos apuntan que la concentración utilizada para inhibir el 50% de la proliferación en HeLa está una orden de magnitud mayor (rango mM) (Tabla 7). Para realizar los estudios de manera comparativa con la clínica, se optó por trabajar con los fármacos de

quimioterapia utilizados en el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) en vez de los utilizados de marcas comerciales. En el INCAN, los fármacos son administrados al paciente en combinación con excipientes que facilitan la preparación, conservación y administración del medicamento. A pesar de considerarse sustancias inactivas se ha reportado que los excipientes interactúan con el principio activo del medicamento inhibiendo su efecto [Albert et al., 2012]. Esto podría explicar por qué las IC_{50} reportadas en este estudio son mayores que las reportadas en la literatura. A pesar de ello, los fármacos más potentes fueron el paclitaxel, la doxorubicina y el cisplatino que justamente son los que se usan actualmente para el tratamiento del cáncer CCU [Montalvo et al., 2011].

Las observaciones anteriores provocan que aumente el interés por el uso de la Cas II-gly en el sector clínico. Además concentraciones requeridas para abatir la proliferación tumoral no afecta significativamente células normales como linfocitos humanos cuyas IC_{50} es $34 \mu M$ [Rodríguez-Enríquez et al., 2008]. Sin embargo como ya se discutió con anterioridad, algunos órganos como el corazón son severamente dañados por la exposición a Cas II-gly [Hernández-Esquivel et al., 2006] por lo que la sinergia de Cas II-gly con otros compuestos podría ser una estrategia potencial para el tratamiento del cáncer CCU.

5.4 Sinergismo

El sinergismo se refiere a la combinación de 2 o más compuestos o drogas a concentraciones menores a su IC_{50} cuya interacción potencia el efecto inhibitor de al menos uno, evitando posibles efectos colaterales en el paciente [Borisy et al., 2003], además la combinación de los fármacos empleados debe de tener blancos diferentes dentro de la célula [Lehár et al., 2009]. Aunque en la literatura se han reportado varios estudios sinérgicos para inhibir el crecimiento tumoral [Milrot et al., 2013; Daker et al., 2016; Zheng et al., 2016], la aplicación de dicha combinación también afecta a las células no tumorales [El-Awady et al., 2016] ó la interacción fármaco-fármaco suprime su efecto inhibitor [Hendrick et al., 2008]

En este estudio se ofrece un posible efecto sinérgico de un fármaco antimitocondrial con drogas utilizadas comúnmente en el sector clínico como paclitaxel, cisplatino, gemcitabina, ciclofosfamida y carboplatino. De hecho, hasta la fecha no se han publicado efectos sinérgicos de la Cas II-gly con otros compuestos anticancerígenos. Mucho menos se han descrito sus posibles mecanismos de acción. Sin embargo, resulta de gran interés que las combinaciones entre ambos tienen como blanco procesos celulares diferentes, uno afectando el metabolismo energético y otros inhibiendo el ciclo celular.

En HeLa, la aplicación sinérgica de paclitaxel, cisplatino, gemcitabina, ciclofosfamida y carboplatino con Cas II-gly aumentó significativamente su potencia (40-50%). Esta combinación se aplicó al carcinoma de pulmón (A549) con resultados similares. Milrot (2013), reportó un sinergismo donde la drogas

empleadas (cisplatino y jasmonato) abolieron significativamente el crecimiento de HeLa (>85%) después de 24 h de tratamiento, pero no lo evaluó en otras líneas celulares sanas. En este trabajo el sinergismo supra-aditivo (Tabla 13) encontrado en A549 y HeLa se evaluó en una línea celular de fibroblastos de ratón 3T3 (Tabla 15) confirmando un efecto específico sobre el tumor e inocuo sobre la célula no tumoral, lo que podría ser de potencial interés en el sector clínico.

Conclusión

El efecto sinérgico de Cas II-gly con paclitaxel, cisplatino, carboplatino, ciclofosfamida y gemcitabina promovió un aumento en la toxicidad del compuesto antimitocondrial lo que provocó el abatimiento del cáncer de HeLa.

Dicha combinación resultó inocua para las células no tumorales.

Referencias

- Afekhide E, Edijana C. Ocular toxicity of systemic anticancer chemotherapy. *Pharm Prac* 2006; 4(2): 55-59.
- Alemón-Medina R, Breña-Valle M, Garcia-Mora I, Muñoz-Sánchez JL, Ruíz-Azuara L. Induction of oxidative damage by based antineoplastic drugs (Casiopeínas): 2. *Can Chem and pharm.*2007, 60, 219-228
- Aschauer L, Muller PA. Novel targets and interaction partners of mutant p53 Gain-Of-Function. *Biochem Soc Trans.* 2016 44(2):460-6.
- Barrett JR. A Potential Window onto Early Pancreatic Cancer Development: Evidence of Cancer Stem Cell Growth after Exposure to Cadmium Chloride *in Vitro.* *EnvironHealthPerspec*, 2012 120(9), a363.
- Becco L, García-Ramos JC, Azuara LR, Gambino D, Garat B. Analysis of the DNA interaction of copper compounds belonging to the Casiopeínas® antitumoral series. *Biol Trace Elem Res.* 2014;161(2):210-5.
- Beger M, Butz K, Denk C, Williams T, Hurst HC, Hoppe-Seyler F. Expression pattern of AP-2 transcription factors in cervical cancer cells and analysis of their influence on human papillomavirus oncogene transcription. *J Mol Med (Berl).*2001 (5-6):314-20.
- Brandon M, Baldi P, Wallace DC. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene.* 2006 25(34):4647-62.
- Brady HR, Kone BC, Stromski ME, Zeidel ML, Giebish G, Gullans SR. Mitochondrial injury: an early event in cisplatin toxicity to renal proximal tubules. *Am J Physiol* 1990;258:F1181-7.
- Braun MS, Seymour MT. Balancing the efficacy and toxicity of chemotherapy in colorectal cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology.* 2011;3(1):43-52.
- Calderón-Montañó JM, Burgos-Morón E, Orta ML, Pastor N, Austin CA, Mateos S, López-Lázaro M. Alpha, beta-unsaturated lactones 2-furanone and 2-pyrone induce cellular DNA damage, formation of topoisomerase I- and II-DNA complexes and cancer cell death. *Toxico ILett.* 2013 222(1):64-71.
- Calvo KL, Roncoc MT, Noguerad NI, García F. Benznidazole modulates cell proliferation in acute leukemia cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology.* 2013 (35) 4

- Cerezo D, Lencina M, Ruiz-Alcaraz AJ, Ferragut JA, Saceda M, Sanchez M, Cánovas M, García-Peñarrubia P, Martín-Orozco E. Acquisition of MDR phenotype by leukemic cells is associated with increased caspase-3 activity and a collateral sensitivity to cold stress. *J Cell Biochem.* 2012
- Cesari IM, Carvalho E, Figueiredo-Rodrigues M, Mendonça-Bdos S, Amêdo ND, Rumjanek FD. Methyl jasmonate: putative mechanisms of action on cancer cells cycle, metabolism, and apoptosis. *Int J Cell Biol.* 2014;2014:572097.
- Chan DW, Yu SY, Chiu PM, Yao KM, Liu VW, Cheung AN, Ngan HY. Over-expression of FOXM1 transcription factor is associated with cervical cancer progression and pathogenesis. *J Pathol.* 2008 215(3):245-52.
- Choie DD, del Campo AA, Guarino AM. Subcellular localization of cis dichlorodiammineplatinum(II) in rat kidney and liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980; 55:245–52.
- Chuang JY, Huang YF, Lu HF, Ho HC, Yang JS, Li TM, Chang NW, Chung JG. Coumarin induces cell cycle arrest and apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through a mitochondria- and caspase-3 dependent mechanism and NF-kappaB down-regulation. *In Vivo.* 2007;21(6):1003-9.
- Da Silva GD, Da Silva MG, Souza EM, Barison A, Simões SC, Varotti FP, Barbosa LA, Viana GH, Villar JA. Design and synthesis of new chalcones substituted with azide/triazole groups and analysis of their cytotoxicity towards HeLa cells. *Molecules.* 2012;17(9):10331-43.
- Daker M, Yeo JT, Bakar N, Abdul Rahman AS, Ahmad M, Yeo TC, Khoo AS. Inhibition of nasopharyngeal carcinoma cell proliferation and synergism of cisplatin with silvestrol and episilvestrol isolated from *Aglaia stellatopilosa*. *Exp Ther Med.* 2016 Jun;11(6):2117-2126.
- Davis S, Weiss MJ, Wong JR, Lampidis TJ, Chen LB. Mitochondrial and plasma membrane potentials cause unusual accumulation and retention of rhodamine 123 by human breast adenocarcinoma-derived MCF-7 cells. *J. Biol. Chem.* 1985. 260, 13844-13850.
- Dhanalakshmi S; Agarwal P; Glode L; Agarwal R. Silibinin sensitizes human prostate carcinoma DU145 cells to cisplatin and carboplatin, induced growth inhibition and apoptotic death. *Int J Cancer.*(2003) 20;106(5): 699-705.
- Dietzen DJ, Davis EJ. Excess membrane cholesterol is not responsible for metabolic and bioenergetic changes in AS30D hepatoma mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys* 1994, (309) 341, 347.
- El-Awady RA, Semreen MH, Saber-Ayad MM, Cyprian F, Menon V, Al-Tel TH. Modulation of DNA damage response and induction of apoptosis mediates

- synergism between doxorubicin and a new imidazopyridine derivative in breast and lung cancer cells. *DNA Repair (Amst)*. 2016; 37:1-11.
- Fearon KCH, Plumb JA, Burns HJG, Calma KC. Reduction of the growth rate of the waljer 256 tumor in rats by rhodamine 6G together with hypoglycemia. *Cancer Res*. 1987, 47, 3687-3687.
- Garnock-Jones KP, Keating GM, Scott LJ. Trastuzumab: A review of its use as adjuvant treatment in human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive early breast cancer. *Drugs*. 2010;70(2):215-39.
- Geoffrey M Cooper. (2000). *A Molecular Approach, The Cell*, 2nd edition .Boston University Sunderland (MA):
- Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, Kaidi A. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*. 2009 (3):377-86.
- Goldstein RS, Mayor GH. The nephrotoxicity of cisplatin. *Life Sci*. 1983;32:685–90.
- Gordon JA, Gattone VH. Mitochondrial alterations in cisplatin-induced acute renal failure. *Am J Physiol* 1986;250:F991–8.
- Gutschner T, Diederichs S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA Biol*. 2012 (6):703-19.
- Hanahan D; Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. 2011. *Cell*, 114 (5): 646- 674.
- Hanigan MH, Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Therapy*. 2003. 1, 47–61.
- Hellquist H, Skálová A, Barnes L, Cardesa A, Thompson LD, Triantafyllou A, Williams MD, Devaney KO, Gnepp DR, Bishop JA, Wenig BM, Suárez C, Rodrigo JP, Coca-Pelaz A, Stojan P, Shah JP, Hamoir M, Bradley PJ, Silver CE, Sliotweg PJ, Vander Poorten V, Teymoortash A, Medina JE,
- Hendrickx JF, Eger EI 2nd, Sonner JM, Shafer SL. Is synergy the rule? A review of anesthetic interactions producing hypnosis and immobility. *Anesth Analg*. 2008, 107(2):494-506.
- Johnson JI, Decker S, Zaharevitz D, Rubinstein LV, Venditti JM, Schepartz S, Kalyandrug S, Christian M, Arbuck S, Hollingshead M, Sausville EA. Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *Br J Cancer*. 2001 18;84(10):1424-31.

- Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci.* 2000 57(8-9):1229-35.
- Kaelin WG Jr. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:689–698.
- Karin M, Dhar D. Liver Carcinogenesis: From Naughty Chemicals to Soothing Fat- and the Surprising Role of NRF2. *Carcinogenesis.* 2016
- Keith CT, Borisy AA, Stockwell BR. Multicomponent therapeutics for networked systems. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:71–78.
- Kolarov J, Nelson BD. Import and progressing of cytochrome bcl complex subunits in insolated hepatoma ascites cells. Inhibition by Rohamine 6G. *Eur. J. Biochem.* 1984, 144, 387- 392.
- Kruidering M, Van deWater B, de Heer E, Mulder GJ, Nagelkerke JF. Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280:638–49.
- Lan-Feng D, Jameson A, Tilly D, Cerny J, Mahdavian E, Marín-Hernández A, Hernández-Esquivel L, Rodríguez-Enríquez S, Stursa J, Witting P, Stantic B, Rohlena I, Jaroslav T, Kluckova K, Jeffrey C, Ledvina M, Brian A, Moreno-Sánchez R, Mark J, Ralph S, Robin J, and Jiri N. Mitochondrial Targeting of Vitamin E Succinate Enhances Its Pro-apoptotic and Anti-cancer Activity via Mitochondrial Complex II. *Journal of Biological Chemistry* 2011, 286 (5), pp. 3717–3728
- Lampidis TJ, Bernal SD, Summerhayes IC, Chen LB. Selective toxicity of rhodamine 123 in carcinoma cells in vitro. *Cancer Res.* 1987, 43, 716-720.
- Lehár J, Krueger AS, Avery W, Heilbut AM, Johansen LM, Price ER, Rickles RJ, Short GF 3rd, Staunton JE, Jin X, Lee MS, Zimmermann GR, Borisy AA. Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity. *Nat Biotechnol.* 2009 27(7):659-66.
- Levi J, Jacobs SM, Kalman M, McTigue M, Weiner MW. Mechanism of cisplatin nephrotoxicity. I. Effects of sulfhydryl groups in rat kidneys. *J PharmacolExpTher* 1980;213:545–50.
- Liang Z, Liu J, Li L, Wang M., Zhao C, Liang M, Qin G. Effect of nimesulide on the growth of human laryngeal squamous cell carcinoma. *Ame. J. of Otorhinolaryngology* (2014) 120-129

- Lin J., Wu Y, Yang D, Zha Y. Induction of apoptosis and antitumor effects of a small molecule inhibitor of Bcl-2 and Bcl-xl, gossypol acetate, in multiple myeloma in vitro and in vivo. *Oncology Reports* 30: 731-738, 2013
- Lockhart AC, Sundaram S, Sarantopoulos J, Mita MM, Wang-Gillam A, Moseley JL, Barber SL, Lane AR, Wack C, Kassalow L, Dedieu JF, Mita AC. Phase I dose-escalation study of cabazitaxel administered in combination with cisplatin in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*. 2014;32(6):1236-45.
- Nasr T, Bondock S, Youns M. Anticancer activity of new coumarin substituted hydrazide-hydrazone derivatives. *Eur J Med Chem*. 2014(76):539-48.
- Narumiya S, Tanji M, Ishizaki T. Rho signaling, ROCK and mDia1, intransformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev*. 2009(1-2):65-76.
- Newell KJ, Tannock IF. Reduction of intracellular pH as a possible mechanism for killing cells in acidic regions of solid tumors. Effects of carbonylcyanide-3-cholophenylhydrazone. *Cancer Res*. 1989, 49, 4477- 4482.
- Nicholls DG, Ferguson S, Smith JJ. Mitochondria at the crossroad of apoptotic cell death. *J. Bioenerg. Biomembra*. 1999, 31, 321-326.
- Nogueira FB, Ruiz JC, Robello C, Romanha AJ, Murta SM. Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial trypanothione peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Parasitol Res*. 2009;104(4):835-44.
- Mandujano-Tinoco EA, Gallardo-Pérez JC, Marín-Hernández A, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. Anti-mitochondrial therapy in human breast cancer multi-cellular spheroids. *BiochimBiophysActa*. 2013 1833(3):541-51.
- Malafa M, Neitzel L. Vitamin E succinate promotes breast cancer tumor dormancy, *J. Surg. Res*. 93 (2000) 163- 170
- Marín-Hernández A, Gracia-Mora I, Ruiz-Ramírez L, Moreno-Sánchez R. Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas) on mitochondria functions. *BiochemPharmacol*. 2003 65(12):1979-89
- Marin-Hernandez A. 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. 237(9): 1975-88.
- Marks DC, Su GM, Davey RA & Davey MW (1996) Extended multidrug resistance in haemopoietic cells. *Br J Haematol* 95, 587–595.

- Martello LA, McDaid HM, Regl DL, Yang CP, Meng D, Pettus TR, Kaufman MD, Arimoto H, Danishefsky SJ, Smith AB 3rd, Horwitz SB. Taxol and discodermolide represent a synergistic drug combination in human carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res.* 2000;6(5):1978-87.
- Martinez-Outschoorn UE, Peiris-Pagés M, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev ClinOncol.* 2016.
- Medina PJ, Goodin S. Lapatinib: a dual inhibitor of human epidermal growth factor receptor tyrosine kinases. *ClinTher.* 2008 (8):1426-47.
- Mejia C, Ruiz-Azuara L. Casiopeinas Ilgly and Illia induce apoptosis in medulloblastoma cells. *Pathol Oncol Res.* 2008 (4):467-72.
- Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanisms of Cisplatin Nephrotoxicity. *Toxins*, 2010. 2(11), 2490–2518.
- Milrot E, Jackman A, Flescher E, Gonen P, Kelson I, Keisari Y, Sherman L. Enhanced killing of cervical cancer cells by combinations of methyl jasmonate with cisplatin, X or alpha radiation. *Invest New Drugs.* 2013;31(2):333-44.
- Montalvo-Esquivel G, Coronel-Martínez JA, Alvarado-Zermeño A, Cántú de León DF, Flores-Altriste D, Ortega-Rojo A, González-Enciso A, Isla-Ortíz D, Muñoz-González DE, Robles-Flores JU, Solorza-Luna G, Mota-García I, Gallardo-Rincón D, Morales-Vázquez F, Cetina-Pérez ML, Herrera-Gomez A. Oncogúa, cáncer cervicouterino. *Cáncerología* 6 (2011): 61-69.
- Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 2007 274(6):1393-418.
- Moreno L, Pearson AD. How can attrition rates be reduced in cancer drug discovery? *Expert Opin Drug Discov.* 2013 8(4):363-8.
- Moreno-Sánchez R. Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma. *Int J Bio chem. Cell Biol.* 2010 42(10):1744-51
- 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.
- Murata T, Itoigawa M, Ito C, Nakao K, Tsuboi M, Kaneda N, Furukawa H. Induction of apoptosis in human leukaemia HL-60 cells by furanone-coumarins from *Murraya siamensis*. *J Pharm Pharmacol.* 2008;60(3):385-9.

- Organización Mundial de la Salud (OMS): International Agency for Research on Cancer (IARC), GLOBOCAN, 2012: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2015: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
- Papa MZ, Vetto JT, Ettinghausen SE, Mule JJ, Rosenberg SA. Effect of corticosteroid on the antitumor activity of lymphokine-activated killer cells and interleukin 2 in mice. *Cancer Res.* 46,1986; 5618-5623.
- Perdersen PL. Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Prog. Exp. Tumor Res.* 1978, 22, 190-1274.
- Phelan K, May KM. Mammalian Cell Tissue Culture Techniques. *Curr Protoc Pharmacol.* 2016 Jun 1;73:12.1.1-12.1.23.
- Plumb J.A “Cell sensibility assays: The MTT assay” en Langdon S. (2004). *Methods in Molecular Medicine, Cancer Cell Culture: Methods and Protocols.* S. P. Langdon © Humana Press Inc, vol.88, Totowa, NJ. pp. 165-169.
- Qi M, Yu W, Liu S, Jia H, Tang L, Shen M, Yan X, Saiyin H, Lang Q, Wan B, ZhaoS, Yu L. Septin1, a new interaction partner for human serine/threonine kinaseaurora-B. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Oct 28;336(3):994-1000.
- Qian SZ, Wang ZG. Gossypol: a potential antifertility agent for males. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1984;24:329-60.
- Ribas V, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Mitochondria, cholesterol and cancer cell metabolism. *Clinical and Translational Medicine,* 2016. 5, 22.
- Rideout D. Self-assembling cytotoxins. *Science.* 1986, 233(4763):561-3.
- Rivero-Müller A, De Vizcaya-Ruíz A, Plant N, Ruiz-Azuara L, Dobrota. M. Copper complex with anticancer activity rapidly degrade DNA. 1998, 18, 4936
- Robbins KT, Pitman KT, Kowalski LP, de Bree R, Mendenhall WM, Eloy JA, Takes RP, Rinaldo A, Ferlito A. Cervical Lymph Node Metastasis in High-Grade Transformation of Head and Neck Adenoid Cystic Carcinoma: A Collective International Review. *AdvTher.* 2016. 33(3):357-68.
- Rodríguez-Enríquez S, Gallardo-Pérez JC, Avilés-Salas A, Marín-Hernández A, Carreño-Fuentes L, Maldonado-Lagunas V, Moreno-Sánchez R. Energy metabolism transition in multi-cellular human tumor spheroids. *J CellPhysiol.* 2008 216(1):189-97.

- Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Carreño-Fuentes L, Moreno-Sánchez R. Targeting of cancer energy metabolism. *Mol NutrFood Res.* 2009 ;53(1):29-48.
- Rodríguez-Enríquez S, Carreño-Fuentes L, Gallardo-Pérez JC, Saavedra E, Quezada H, Vega A, Marín-Hernández A, Olín-Sandoval V, Torres-Márquez ME,
- Rodríguez-Macías, E. L., Fisiología de la insuficiencia renal aguda por cisplatino. *Rev Electron Biomed / Electron J Biomed* 2013;3:43-46.
- Rodríguez-Mercado JJ, Florín-Ramírez D, Álvarez-Barrera L, Altamirano-Lozano MA. In vitro DNA damage by Casiopeina II-gly in human blood cells. *Drug Chem Toxicol.* 2016.16:1-7
- Rotem R, Heyfets A, Fingrut O, Blickstein D, Shaklai M, Flescher E. Jasmonates: novel anticancer agents acting directly and selectively on human cancer cell mitochondria. *Cancer Research.* 2005;65(5):1984–1993.
- Rowinsky EK, Eisenhauer EA, Chaudhry V, Arbuck SG, Donehower RC. Clinicoxicities encountered with paclitaxel (Taxol). *SeminOncol.* 1993. (4 Suppl3):1-15.
- Safirstein R, Miller P, Guttenplan JB. Uptake and metabolism of cisplatin by rat kidney. *Kidney Int* 1984;25:753–8.
- Siami K, McCluggage WG, Ordonez NG, Euscher ED, Malpica A, Sneige N, Silva EG, Deavers MT. Thyroid transcription factor-1 expression in endometrial and endocervical adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2007 (11):1759-63.
- Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene.* 2003;22(47):7265-79.
- Tan Z, Luo X, Xiao L, Tang M, Bode AM, Dong Z, Cao Y. The Role of PGC1 α in Cancer Metabolism and its Therapeutic Implications. *Mol Cancer Ther.* 2016(5):774-82.
- Trejo-Solís C, Palencia G, Zúñiga S, Rodríguez-Ropon A, Osorio-Rico L, Luvia ST, Gracia-Mora I, Marquez-Rosado L, Sánchez A, Moreno-García ME, Cruz A, Bravo-Gómez ME, Ruiz-Ramírez L, Rodríguez-Enríquez S, Sotelo J. Cas IIgly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia.* 2005 (6):563-74.
- Trizna EY, Khakimullina EN, Latypova LZ, Kurbangalieva AR, Sharafutdinov IS, Evtuyugin VG, Babynin EV, Bogachev MI, Kayumov AR. Thio Derivatives of 2

- (5H)-Furanone as Inhibitors against *Bacillus subtilis* Biofilms. *Acta Naturae*. 2015; 7(2):102-7.
- Tsang RY, Al-Fayea T, Au HJ. Cisplatin overdose: toxicities and management. *DrugSaf*. 2009;32(12):1109-22.
- Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*.2004;10(8):789-99.Warburg, O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956, 124, 269–270.
- Weiner H, Ronald-Lindah L, David W, Crabb T, Geoffrey F. (1996). *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* 6. Springer Science+Business Media, LLC. New York, EUA p. 137.
- Wilson SB, Bonner WD. Effects of Guanidine Inhibitors on Mung Bean Mitochondria . *Plant Physiology*. 1970;46(1):21-24.
- Wu CA, Chao Y, Shiah SG, Lin WW. Nutrient deprivation induces the Warburg effect through ROS/AMPK-dependent activation of pyruvate dehydrogenase kinase. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(5):1147-56.
- Wu K, Fang Z, Wang L, Yuan S, Guo R, Shen B, Shen Q. Biological potential of bio-organic fertilizer fortified with bacterial antagonist for the control of tomato bacterial wilt and the promotion of crop yields. *J Microbiol Biotechnol*.2016 Jul 6.
- Yang S, Guo R, Huang L, Yang L, Jiang D. Nimesulide inhibits the proliferation of HepG2 by up-regulation of Smad4. *Indian Journal of Pharmacology*, 2012 44(5), 599–601.
- Zhao L, Chen W, Li X. Expression of SNAIL mRNA in uterine cervical cancer is detected by real-time PCR. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2008;39(3):414-7.
- Zheng X, Zhang Y, Zhang L, Xu W, Ma W, Sun R, Zeng H. Synergistic inhibition of sunitinib and ethaselen against human colorectal cancer cells proliferation. *Biomed Pharmacother*. 2016(83)212-220.
- Zhong D, Xiong L, Liu T, Liu X, Liu X, Chen J, Zhou, W. The Glycolytic Inhibitor 2-Deoxyglucose Activates Multiple Prosurvival Pathways through IGF1R. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009 284(35), 23225–23233.
- Zu XL, Guppy M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 16;313(3):459-65.

Anexo 1

Análisis de genotipificación del Instituto Nacional de Medicina Genómica demostró que la línea HeLa comparte todos los alelos reportados por la ATCC.



INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA
Laboratorio de Diagnóstico Genómico

Perfil Genético de STR para Verificar la Autenticidad de Línea Celular Humana

Investigador: *Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez*
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"
PRESENTE

Fecha de recepción de las muestras: 03 de Noviembre del 2015, 11:00 horas
Entrego: Dra. Diana Xochiquetzal Robledo

Resultado emitido el: 24 de Noviembre del 2015, 17:32 horas

Metodología: Reacción en cadena de la polimerasa tipo multiplex y electroforesis capilar en el Analizador Genético 3500 de AB, análisis de fragmentos en Gene Mapper ID v5

Marcadores genéticos analizados: Pequeñas repeticiones en tandem (STR) autosómicos: CSF1PO, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, FGA, TH01, TPOX, vWA y el gen de amelogenina.

Tecnología utilizada: ND-1000 Spectrophotometer,
Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit,
AmpFISTR® Identifier™ PCR Amplification.

Resultado:

LÍNEA CELULAR	HeLa			
ID TUBO	HeLa 4/11/15			
N.O. CASO LDG	00832			
ID MUESTRA LDG	832-1			
Marcador	PERFIL GENÉTICO OBTENIDO:		Marcador	HeLa (ATCC® CCL-2™)
D8S1179	12	13	D8S1179	
D21S11	27	28	D21S11	
D7S820	8	12	D7S820	8 12
CSF1PO	9	10	CSF1PO	9 10
D3S1358	15	18	D3S1358	
TH01	7		TH01	7
D13S317	12	13.3	D13S317	12 13.3
D16S539	9	10	D16S539	9 10
D2S1338	17		D2S1338	
D19S433	13	14	D19S433	
vWA	16	18	vWA	16 18
TPOX	8	12	TPOX	8 12
D18S51	16		D18S51	
D5S818	11	12	D5S818	11 12
FGA	18	21	FGA	
Amelogenina	X		Amelogenina	X

referencia: <http://www.atcc.org/products/all/CCL-2.aspx#specifications>

INTERPRETACIÓN. A partir de la muestra entregada e identificada como: HeLa 4/11/15, (ID LDG: 832-1 como parte del caso LDG-Inmegen: 00832), se realizó una extracción del DNA. El DNA fue cuantificado y analizado obteniendo un electroferograma de buena calidad (relación fragmento/ruido), que detectó y nombró automáticamente solo los alelos que se reportan, no se detectó, ni se observó ninguna señal adicional o diferente a las reportadas.

El perfil genético obtenido de la muestra identificada como: HeLa 4/11/15, (ID LDG: 832-1), comparte los 16 alelos reportados para la línea celular HeLa (ATCC® CCL-2™), con una concordancia del 100%, no se detectaron otros alelos a los reportados, que pudieran indicar que la muestra analizada contiene algún otro tipo de células humanas.



M en C Reatriz F Villegas Torres

Cédula profesional: 3788745

Laboratorio de Diagnóstico Genómico, Subdirección de Desarrollo de Aplicaciones Clínicas, Dirección de Investigación, Inmegen

Nota: La información contenida en este documento es confidencial. El personal del Inmegen no toma las muestras, ni verifica la identidad debido a que esta es una prueba estrictamente informativa. La integridad de las muestras es responsabilidad del Inmegen una vez que son recibidas en el laboratorio hasta la emisión de este resultado. La asociación que forman parte de este resultado se basa estrictamente en la información proporcionada por el cliente. La veracidad de la información proporcionada y la autenticidad de las muestras es responsabilidad del Cliente. Reporte obtenido a través de Internet para fines de consulta.

Perfil Genético de STR para Verificar la Autenticidad de Línea Celular Humana. Página 1 de 3
Periférico Sur 4809, Col. Arenal de Tepépan, Delegación Tlalpan, México, D.F., C.P. 14610,
Tel.: 52 (55) 53 50 19 31, www.inmegen.gob.mx