



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

“Participación de dicloroacetato en la respuesta a agentes antineoplásicos en
líneas celulares de cáncer”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ANA GABRIELA MONDRAGÓN PERRUSQUIA

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Patricia García López



Ciudad universitaria, CD. MX.,

Agosto 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: María Eva González Trujano

VOCAL: Profesor: Claudia Teresa Tovar Palacio

SECRETARIO: Profesor: Patricia García López

1er. SUPLENTE: Profesor: Guadalupe Esther Ángeles López

2° SUPLENTE: Profesor: Víctor Hugo Aviles Rosas

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE
CANCEROLOGÍA**

ASESOR DEL TEMA: DRA PATRICIA GARCÍA LÓPEZ _____

SUSTENTANTE: ANA GABRIELA MONDRAGÓN PERRUSQUIA _____

ÍNDICE

1. ÍNDICE DE ABREVIATURAS	9
2. INTRODUCCIÓN	11
3. MARCO TEÓRICO	
3.1 EPIDEMIOLOGÍA	13
3.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CÁNCER	14
3.2.1 GLIOMA	16
3.2.1.1 TEMOZOLAMIDA	17
3.2.2 CÁNCER EPITELIAL DE OVARIO	18
3.2.2.1 CISPLATINO	18
3.3 CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DEL CÁNCER	19
3.3.1 EL EFECTO WARBURG	20
3.3.2 FUNCIÓN MITOCONDRIAL	22
3.4 RESISTENCIA AL TRATAMIENTO	23
3.5 QUIMIOSENSIBILIZACIÓN	25
3.5.1 DICLOROACETATO	26
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVOS	
5.1 OBJETIVO GENERAL	28
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	28

6. MATERIALES Y MÉTODOS	
6.1 FÁRMACOS Y REACTIVOS	29
6.2 LÍNEAS CELULARES	29
6.3 ESQUEMA DE EXPOSICIÓN A LOS FÁRMACOS	29
6.4 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR	
6.4.1 VIABILIDAD CELULAR UTILIZANDO EL ENSAYO XTT	30
6.4.2 VIABILIDAD CELULAR UTILIZANDO EL ENSAYO DE CRISTAL VIOLETA	30
6.5 DETERMINACIÓN DE ERO	31
6.6 DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS	31
6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
7. RESULTADOS	
7.1 CURVAS DE EXPOSICIÓN A LOS FÁRMACOS INDIVIDUALES	33
7.2 EFECTO CITOTÓXICO GENERADO POR LA COMBINACIÓN DE TMZ Y DCA EN LA LÍNEA CELULAR C6	35
7.3 EFECTO CITOTÓXICO GENERADO POR LA COMBINACIÓN DE CDDP Y DCA EN LA LÍNEA CELULAR SKOV3	36
7.4 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO DESPUÉS DE LOS TRATAMIENTOS INDIVIDUALES Y COMBINADOS CON DCA	39
7.5 DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS	42

8. DISCUSIÓN	45
9. CONCLUSIÓN	50
10. PERSPECTIVAS	50
11. BIBLIOGRAFÍA	50

1. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN.- Ácido Desoxirribonucleico

ADNm.- Ácido Desoxirribonucleico mitocondrial

ADP.- Adenosin dífosfato

Akt.- Proteína cinasa B

ATP.- Adenosin trifosfato

CDDP.- Cisplatino

DCA.- Dicloroacetato

ERO.- Especies Reactivas de Oxígeno

FDA.- Food and Drug Administration

GLUT 1,3.- Transportadores de glucosa 1 y 3

GSH.- Glutación

IGF1/2.- Factor de crecimiento insulínico tipo 1 y 2

LKB1.- Cinasa Hepática B1

MGMT.- Metil guanina metil transferasa

OXPHOS.- Fosforilación oxidativa

NRF1 y 2.- Factor nuclear respiratorio 1 y 2

PDK.- Piruvato deshidrogenasa cinasa

PDH.- Piruvato deshidrogenasa

PGC1 α/β .- Peroxisome proliferator-activated receptor y co-activador 1 α

REDOX.- Oxido-Reducción

SNC.- Sistema Nervioso Central

TFAM.- Factor de transcripción mitocondrial A

TGF- β .- Factor de crecimiento tumoral β

TMZ.- Temozolamida

VEGF.- Factor de crecimiento endotelial vascular

2. INTRODUCCIÓN

El cáncer se caracteriza por un crecimiento celular anómalo y continuo que, a pesar de los extraordinarios mecanismos de control de proliferación y muerte celular que hay en el organismo para prevenir su aparición, éste encuentra la manera de prosperar y presenta una tendencia a la invasión y a la metástasis.¹ Las vías de transducción de señales mitógenas, el ciclo celular y los mecanismos de muerte celular programada o apoptosis son las que se encuentran principalmente alteradas en este padecimiento.

Para erradicar el cáncer se utilizan diversas estrategias terapéuticas como lo son: La quimioterapia, la radioterapia y la cirugía. Con los distintos fármacos antineoplásicos usados en la quimioterapia se busca que puedan actuar sobre una o varias fases del ciclo celular o sobre los mecanismos de control de la proliferación celular. Existen varios tipos de fármacos, dependiendo de la función que ejercen en la célula,² entre estos se encuentran los agentes alquilantes, cuyo mecanismo se basa en la metilación de las bases nitrogenadas del ADN. Otro de los grupos ampliamente utilizados en el tratamiento contra neoplasias son los complejos de platino, que ocasionan un efecto citostático producido por la formación de complejos por su interacción con el ADN, impidiendo así la replicación del mismo. Aunque se trata de los grupos de fármacos antineoplásicos más utilizados en la clínica para tratamiento de varios tipos de cáncer, estos también producen diversos efectos adversos, esto es debido a su poca selectividad provocando también una afectación a las células sanas, ocasionando síntomas como lo son náuseas, vómito, nefrotoxicidad, anorexia, entre otros. Debido a estos, se han multiplicado esfuerzos para encontrar nuevos fármacos que no ocasionen, o en todo caso disminuyan, este tipo de efectos adversos o que potencien la citotoxicidad sobre las células cancerígenas.

Además de los inconvenientes, se sabe que en la evolución del cáncer se van produciendo nuevas alteraciones genéticas que provocan una heterogeneidad celular y, por lo tanto, diferentes propiedades bioquímicas y tiempo de duplicación. Estos mecanismos están directamente relacionados con la aparición de

resistencia al tratamiento; sin embargo, es posible estudiar los mecanismos que eluciden los puntos que contrarresten la resistencia, por lo que uno de los objetivos principales en las áreas de la investigación es buscar combinaciones de fármacos que ayuden a minimizar la aparición de resistencias y que en caso de que estas continúen, buscar afectar al tumor a través de otras vías relacionados con el microambiente tumoral. Se ha reportado que la enzima piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK) favorece un microambiente alto en lactato originando un microambiente anaerobio que facilita los estados patológicos del cáncer. Uno de los compuestos que inhibe a esta enzima PDK, es el DCA. En este trabajo se estudió la influencia del dicloroacetato sobre la citotoxicidad de temozolamida en una línea celular de cáncer de glioma (C6) y la citotoxicidad de cisplatino en una línea celular de cáncer epitelial de ovario (SKOV3).

3. MARCO TEÓRICO

3.1 EPIDEMIOLOGÍA

En 2012, a nivel mundial, se registraron 14.1 millones de casos nuevos de cáncer, 8.2 millones de muertes y 32.6 millones de personas que viven con cáncer dentro de los 5 años del diagnóstico; el 57% (8 millones) de los casos nuevos de cáncer, el 65% (5.3 millones) de las muertes y el 48% (15.6 millones) de los casos con 5 años de prevalencia ocurren en las regiones menos desarrolladas de la población, siendo la tasa general de incidencia estandarizada por edad es casi 25% mayor en hombres que en mujeres.³

En nuestro país, el cáncer es la tercera causa de muerte en la población con un total de 73,240 defunciones en el año 2012 (Figura 1),⁴ presentando así una gran importancia en el estudio de esta patología y en la búsqueda de tratamientos que contribuyan a la disminución de las defunciones presentadas por esta enfermedad.

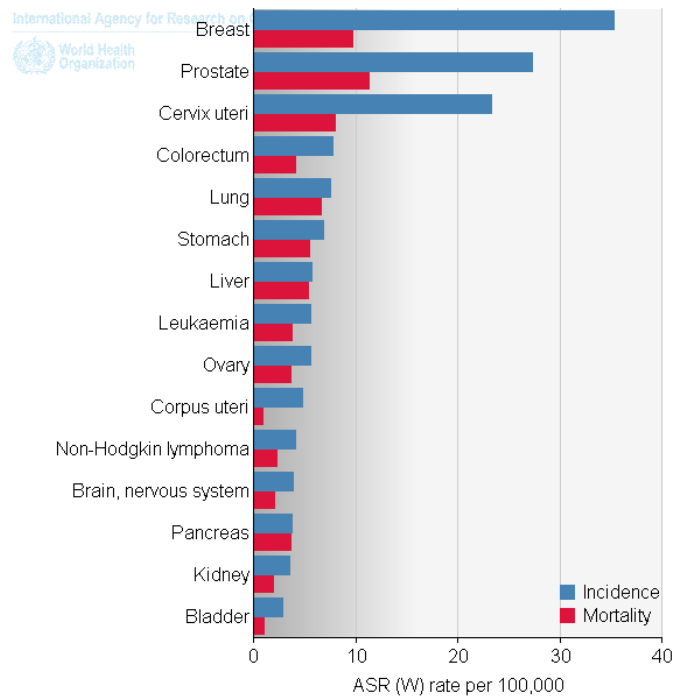


Figura 1. Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer en México.³

3.2 Características generales del cáncer

El cáncer puede ser definido como un estado multifacético de desregulación celular, el cual afecta principalmente el control de la proliferación, muerte y la ruta empleada para la obtención de energía,⁵ aunque estos son los principales mecanismos celulares que se encuentran descontrolados no son los únicos. Algunos autores mencionan que existen 6 marcadores relacionados con el funcionamiento de la célula (Figura 2) que le brindan al cáncer capacidades que contribuyen al crecimiento tumoral y su diseminación.⁶ Las cuales son:

- Señales de control de metabolismo y proliferación celular: Los tejidos normales tienen controlada la producción y el desarrollo de las señales promotoras del crecimiento. En células tumorales ésta regulación está descontrolada, además de que las células adquieren la capacidad de producir de manera sostenida estas señales de proliferación por múltiples mecanismos, lo que se traduce en una subsecuente proliferación descontrolada de la célula.
- Evasión de supresores de crecimiento: Las células normales deben tener mecanismos circundantes que regulen de manera negativa la proliferación celular, estas acciones dependen de genes supresores de tumores, los cuales se encuentran suprimidos en las células tumorales por diversos mecanismos por medio de proteínas involucradas como lo son LKB1, el producto citoplásmico del gen NF2 y TGF- β .
- Resistencia a la muerte celular: Las células tumorales desarrollan una variedad de estrategias para evadir la apoptosis como, por ejemplo, la pérdida de la función de p53, el aumento en la expresión de reguladores anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-X) o de señales de supervivencia (Igf1/2) o la inhibición de factores pro-apoptóticos (Bax, Bim, Puma).
- Activación de la inmortalidad replicativa: Esta se da por actividad de una proteína denominada telomerasa. Esta actúa sobre los telómeros

(repeticiones en tándem que se encuentran al final de los cromosomas y que determinan la cantidad de veces que puede dividirse una célula), elongando el ADN telomérico, por lo que la célula se puede dividir un número ilimitado de veces.

- Inducción de angiogénesis: Se produce para atender la necesidad del tumor de nutrientes y oxígeno, por lo que se generan nuevas células endoteliales que, posteriormente, darán origen a los vasos.⁷
- Activación de la invasión y la metástasis: El proceso de invasión y metástasis ha sido esquematizado por una secuencia de pasos: Invasión local, intravasación de células tumorales, tránsito a través del sistema linfático y hematógeno, extravasación, formación de pequeños nódulos (micrometástasis) y finalmente el crecimiento de las lesiones micrometastásicas en tumores macroscópicos (colonización). Se cree que las células que han sido sometidas a un estímulo distinto de factores de transcripción por influencia de su microambiente de la matriz extracelular, son las que usualmente van a presentar este fenotipo, aunque no está del todo descrito el mecanismo por el cual se presentan estas características.⁸

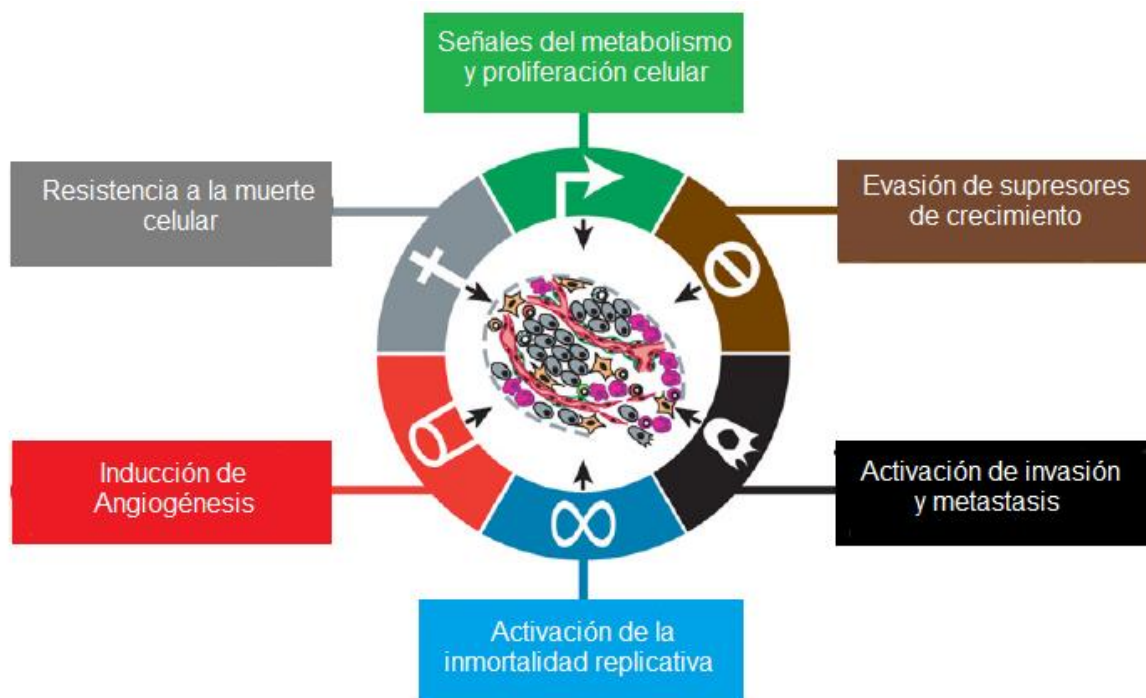


Figura 2. Marcadores principales del cáncer.⁶

Otro de los problemas del cáncer es la resistencia al tratamiento, la cual depende de la etapa de progresión de la enfermedad y del tipo de neoplasia. En este trabajo se estudiaron dos neoplasias: glioblastoma multiforme y cáncer epitelial de ovario debido a que clínicamente se ha reportado una baja respuesta a su tratamiento y en consecuencia una sobrevida no mayor a dos años después de su diagnóstico.

3.2.1 Glioma

Es el tumor de células gliales más común y agresivo del SNC con aproximadamente un 30 a 45% de frecuencia y que presenta una supervivencia de entre 12 y 14 meses después de su diagnóstico. Es caracterizado por una población celular muy heterogénea que es genéticamente inestable⁹, presenta una proliferación celular descontrolada, alta vascularización, adaptación a condiciones de hipoxia, resistencia a la apoptosis, heterogeneidad tumoral, entre otras⁵. Aunado a esto, están las dificultades que representa encontrar un tratamiento eficaz y que pueda atravesar la barrera hematoencefálica y que, además, tenga una baja neurotoxicidad.

3.2.1.1 Temozolamida

La Temozolamida (TMZ) es el antineoplásico utilizado como primera línea de tratamiento de glioblastoma multiforme. Presenta diversas ventajas como una buena biodisponibilidad y distribución cuando es administrada por vía oral y atraviesa la barrera hematoencefálica en un 30%,⁶ además de que no requiere del metabolismo hepático para su activación. Esta se cataloga como un pro-fármaco (fármaco que necesita ser activado por el organismo para ejercer su efecto) que como se muestra en la Figura 3, al ingresar al organismo se transforma a MTIC, posteriormente ocurre la liberación del catión metildiazonio, que es el que dona el grupo metilo que interacciona con la Guanina, ocasionando la formación de un aducto y, por lo tanto, impidiendo la correcta lectura y transcripción del ADN.¹⁰

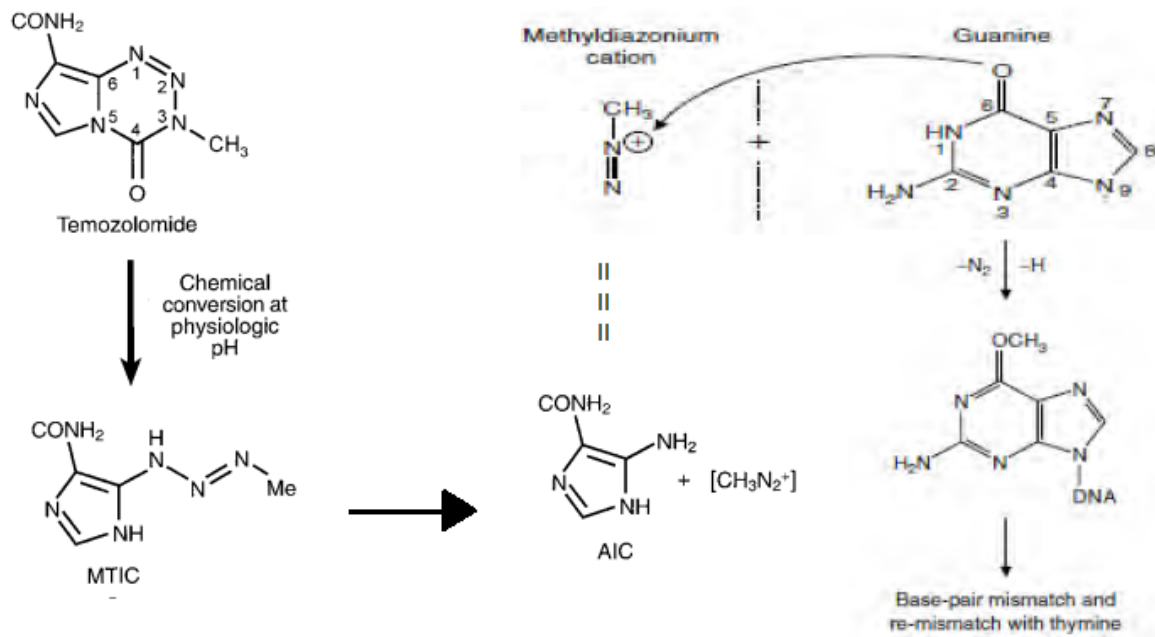


Figura 3. Mecanismo de acción de TMZ¹⁰.

3.2.2 Cáncer epitelial de Ovario

Es la neoplasia ginecológica más mortal, debido a que, al momento de su diagnóstico, la mayoría de las pacientes presentan un estado muy avanzado y a pesar de la cirugía y la quimioterapia a base de compuestos de platino, sólo el 4.1% sobrevive 5 años después del diagnóstico.³ Su principal manifestación clínica es la presencia de una masa pélvica o abdominal, acompañada o no de dolor abdominal, que puede ser agudo o crónico, según ocurra o no la torción ovárica. Una de las principales características de este tipo de tumores es que presentan una resistencia a los fármacos derivados del platino o que la sensibilidad a éste no es mayor a 6 meses¹¹, siendo un gran problema, debido a que el cisplatino es el fármaco de primera línea para tratar este tipo de cáncer.

3.2.2.1 Cisplatino

El cisplatino [cis-diaminodicloroplatino (II)] es un complejo de coordinación (sustancia constituida por un átomo central, generalmente un metal, al que se une uno o varios ligandos) originalmente sintetizado por M. Peyrone en 1844 y su estructura fue primeramente elucidada por Alfred Werner en 1893. Fue aprobado como tratamiento para el cáncer por la FDA en 1978¹². Es uno de los complejos más activos utilizado en la terapia de distintos tipos de cáncer. La forma neutra del cisplatino puede entrar a la célula a través de la barrera lipídica tanto por difusión pasiva como por el transportador de cobre CTR1, el cual es independiente de ATP y saturable. Una vez dentro de la célula, puede ser inactivado por la unión con glutatión (GSH) y también puede ser expulsado de la célula a través de proteínas transportadoras de cobre tipo ATPasa denominadas ATP7B o ATP7A^{13, 14}.

Su actividad anti-tumoral resulta de la modificación del DNA a través de la formación de aductos en la hebra líder, preferentemente entre (G7-G7), (G7-A7).¹⁵ Estos interfieren con la transcripción, traducción y, por lo tanto, conduce a la apoptosis celular (Figura 4).¹³ Además, se ha comprobado que posee la capacidad de detener la división celular (arresto celular), y posteriormente llevar a las células a una muerte por apoptosis.⁶

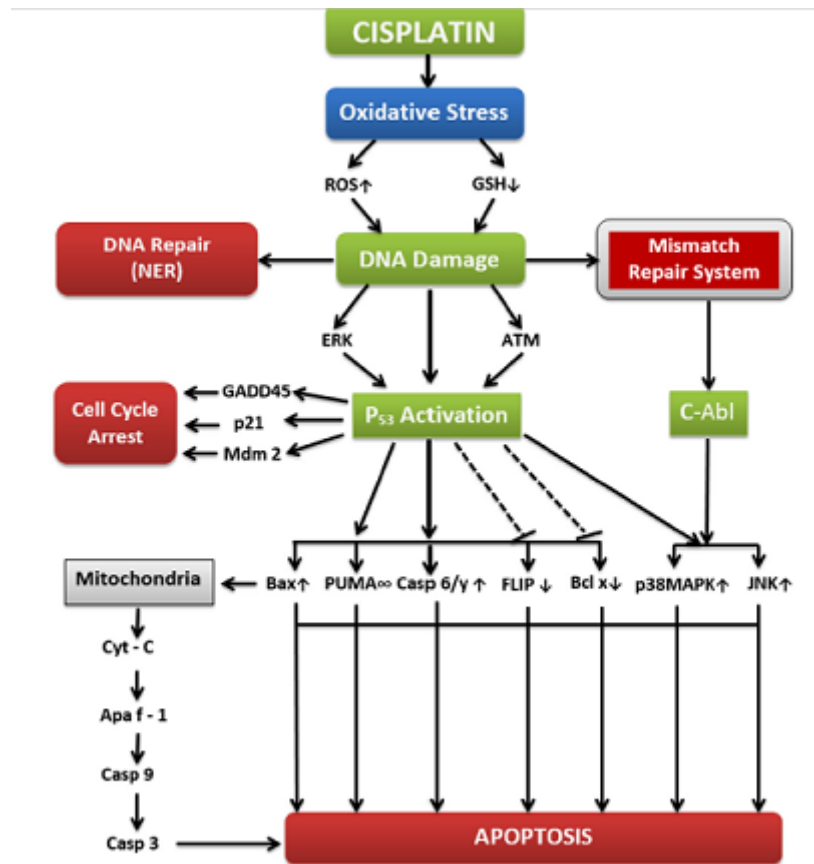


Figura 4. Mecanismos moleculares del cisplatino para el tratamiento del cáncer.¹²

A pesar del uso de fármacos con mecanismos de acción como los descritos anteriormente, la respuesta a estos fármacos no es suficiente para erradicar el cáncer en los pacientes por lo que se buscan nuevas estrategias para mejorar esta respuesta. En los últimos años, se ha despertado un gran interés en las rutas metabólicas que están presentes en las neoplasias y su influencia en la supervivencia y respuesta al tratamiento.

3.3 Características metabólicas del cáncer

Se ha reportado que el crecimiento y la supervivencia del tumor producen una adaptación del metabolismo celular. Algunos autores (Cairns, Harris & Mak, 2011) proponen que estas alteraciones metabólicas podrían ser consideradas como marcadores cruciales del cáncer¹⁶ (Figura 5).

Entre estos múltiples mecanismos, destacan tres principalmente que están relacionados con las necesidades básicas de la división celular:

- La generación rápida de ATP para mantener los niveles energéticos
- El incremento en la biosíntesis de macro moléculas
- El riguroso mantenimiento de un estado de óxido-reducción (REDOX) apropiado

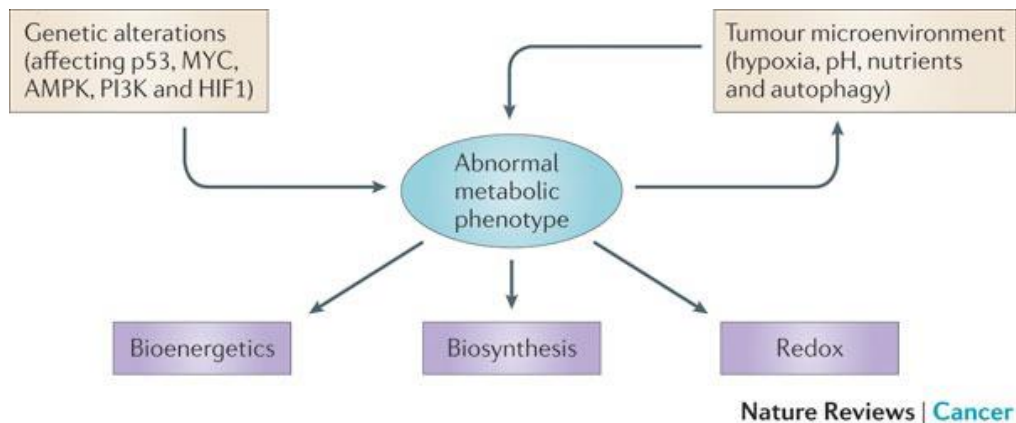


Figura 5. Determinantes del fenotipo metabólico del tumor.¹⁶

3.3.1 El efecto Warburg

La mayoría de la energía que las células necesitan para vivir es producida en la mitocondria a través de un proceso llamado Fosforilación Oxidativa. Este proceso acopla la fosforilación del NADH y FADH₂ con la fosforilación del ADP a ATP. Es un proceso oxígeno-dependiente, debido a que los electrones resultantes de la oxidación del NADH y FADH₂ serán aceptados por el Oxígeno (O₂). Aunque es el proceso más importante para la obtención de energía, no es el único. Las células también pueden producir ATP por medio de la glicólisis aerobia. Este proceso se lleva a cabo en el citosol y no requiere Oxígeno,¹⁷ consiste en la ruptura de una molécula de glucosa en 2 moléculas de piruvato, resultando en la producción de 2 moléculas de ATP. En este sentido, fosforilación oxidativa es más eficiente que la

glicolisis para la generación de ATP, debido a que por cada molécula de glucosa, se generan 36 ATPs (Figura 6).¹⁸

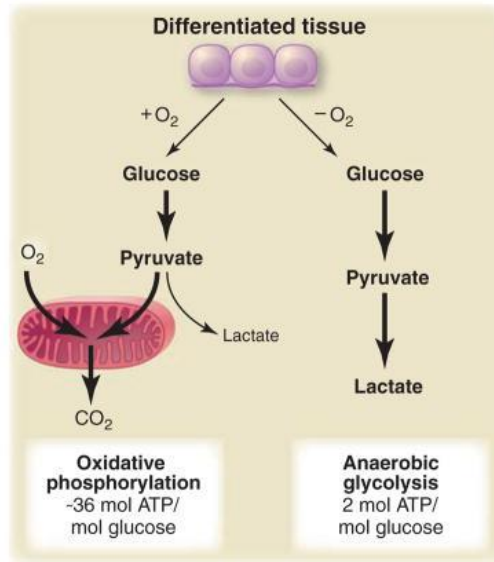


Figura 6. Representación de las diferencias entre fosforilación oxidativa y glicolisis.¹⁸

En la primera mitad del siglo XX, Otto Warburg observó que las células cancerosas presentaban un aumento en la glicolisis aún en presencia de O_2 ¹⁹, produciendo 4 moles de ATP en lugar de 2. A esto se le conoce como el “Efecto Warburg” (Figura 7).

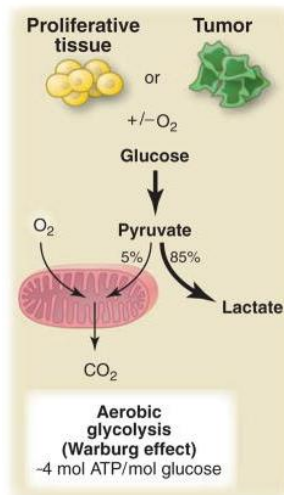


Figura 7. Representación del efecto Warburg en células cancerosas.¹⁸

Se ha demostrado que la activación de la glicolisis juega un papel crucial en el desarrollo del cáncer. La acumulación de los metabolitos de la glucosa causados por la activación constitutiva de la glicolisis, dan como resultado una activación del factor inducible de hipoxia (HIF-1), lo que produce un aumento en la transcripción de genes que codifican, por ejemplo, para proteínas involucradas en el metabolismo de la glucosa, resistencia a la apoptosis, invasión, metástasis, angiogénesis, entre otras.¹⁷

3.3.2 Función mitocondrial

La mitocondria es un orgánulo considerado el corazón del metabolismo celular. Cada célula contiene 100 o más mitocondrias. Es el sitio donde se lleva a cabo la generación de ATP, además de que contiene una gran variedad de proteínas que son necesarias para la promoción celular, la prevención de la muerte celular y la programación de la muerte.⁵

Presenta su propio ADN (ADNm), el cual está regulado por factores de transcripción (NRF1, NRF2 y TFAM) y coactivadores (PGC1 α/β). TFAM, además regula la replicación y brinda cierto tipo de protección al genoma.²² A pesar de ello, se pueden producir mutaciones; existen zonas que son más susceptibles y que usualmente se presentan en tejidos que tienen altas demandas de energía.²³

Se sabe que las mutaciones afectan seriamente el número de copias del genoma mitocondrial, así como la función mitocondrial. Para que una mutación se manifieste en términos de la alteración de una función, más del 60% de las copias del ADNm deben tener esa mutación.²⁴ A este fenómeno se le relaciona la importancia de la mitocondria en la iniciación tumoral, la tumorigenicidad, las propiedades metastásicas de las células y las complicaciones particulares en la terapia. Con estos cambios, se producen diversos efectos en la mitocondria que van desde una disminución en sus funciones hasta el cambio de ruta por la cual se obtiene energía, el cual se relaciona con la malignidad de la célula, ya que esta disfunción bioenergética está relacionada con vías que regulan el crecimiento celular, contribuyen a la supervivencia de la célula por la activación de la proteína cinasa B (Akt) y la activación del factor inducible de hipoxia (HIF-1).²⁵

La disminución en la función mitocondrial tiene muchas implicaciones en diversas vías que controlan la proliferación y la muerte celular. Una de las vías que se encuentra afectada es la apoptosis dependiente de la actividad mitocondrial,²¹ lo que representa una ventaja adicional para las células tumorales debido a que la muerte por esta vía se encuentra inhibida.

Por otro lado, se sabe que la mitocondria es la mayor fuente de especies reactivas de Oxígeno (ERO). Este daño oxidativo contribuye a la disfunción y la muerte celular. Como era de esperarse, la producción de estas especies se encuentra disminuida en los tumores, debido a la condición de hipoxia que se presenta en el microambiente tumoral.²⁶

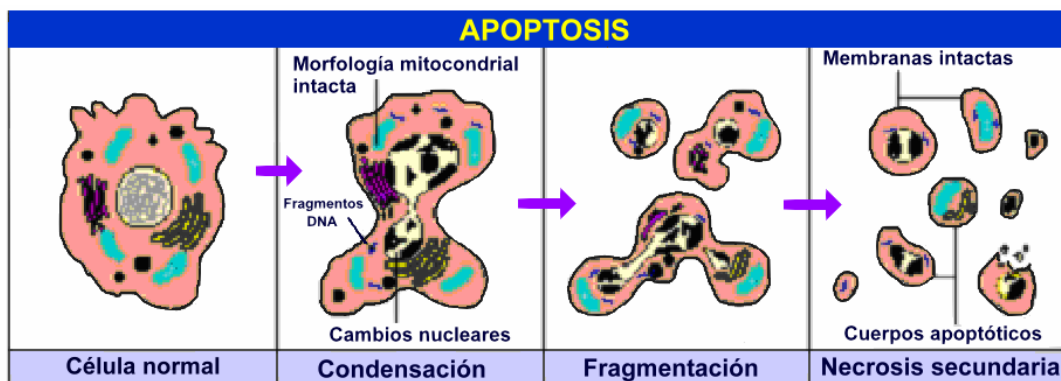


Figura 8. Representación de la progresión de la apoptosis.²⁰

3.4 Resistencia al Tratamiento

Un gran número de fármacos antineoplásicos ejercen su efecto por medio de la interacción con los ácidos desoxirribonucleicos (ADN). Estos representan al grupo más utilizado en la clínica²⁷. Su mecanismo de acción involucra una interferencia en el procesamiento del ADN, conduciendo a una muerte celular, usualmente por la vía de apoptosis.

La falta de eficacia de la quimioterapia de varios tipos de cáncer es en gran parte, por el desarrollo de la multirresistencia a fármacos. Los mecanismos de resistencia pueden estar relacionados con la disminución de la acumulación de fármaco en el interior de la célula, la evasión de la apoptosis y mecanismos de la reparación del ADN.²⁸

Para el glioma, específicamente, se ha documentado la resistencia mediada por la proteína de reparación del DNA MGMT. Esta enzima tiene como función principal, remover grupos metilo en 06-MeG (que son las metilaciones que produce la TMZ). Durante este proceso, la base metilada es expuesta hacia afuera de la doble hélice y así pueda actuar la enzima en su sitio de acción. También está asociada esta resistencia con un aumento en la expresión de la proteína y con la metilación del promotor de la misma.²⁹

En el caso de cisplatino, algunos pacientes cuyos tumores presentan una buena respuesta al inicio del tratamiento, con el paso del tiempo generan una resistencia, la cual se ha investigado, es causada por múltiples mecanismos, los cuales ocasionan la disminución de la acumulación del fármaco, aumento de los tioles intracelulares y un aumento en la reparación del ADN.¹⁵ Varios de los mecanismos que se han propuesto para el desarrollo de esta resistencia incluyen la alteración del influjo y/o eflujo del fármaco, aumento en la eliminación por medio de un aumento de los niveles de tioles o glutatión, un mejoramiento en la capacidad de reparación del ADN o por la regulación de rutas bioquímicas específicas³⁰ (Figura 9).

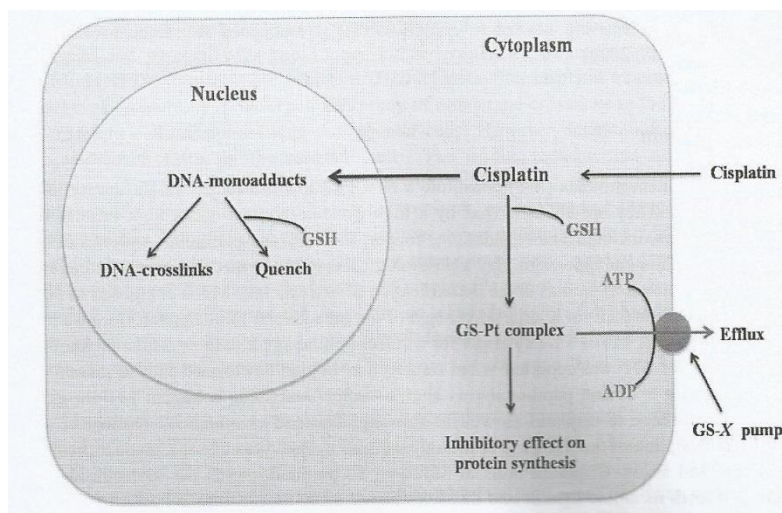


Figura 9. Mecanismos de resistencia de Cisplatino.¹³

3.5 Quimiosensibilización.

Debido a la resistencia a la quimioterapia que se muestra en la mayoría de los tipos de cáncer es necesario buscar estrategias para aumentar la respuesta a la terapia. Una de estas estrategias ha sido el reposicionamiento farmacológico. Esto se refiere al uso de fármacos que fueron desarrollados para un padecimiento distinto para el que fue diseñado. Esto implica la administración de 2 fármacos, cuyos blancos de acción son distintos. La finalidad de esta estrategia es lograr un aumento en el efecto citotóxico de los agentes antitumorales¹⁴, modificando el ingreso y/o permanencia del fármaco en la célula.

Para llevar a cabo esto, se han utilizado fármacos que cumplen con características particulares:

- Fármacos relativamente baratos, a los que los pacientes pueden tener acceso de manera sencilla.
- Fármacos libres de patente.
- Fármacos que presente efectos adversos mínimos o bien caracterizados.
- Fármacos con características farmacológicas bien establecidas.

En este trabajo se propone el uso de una molécula pequeña, como el dicloroacetato, para combinarse con dos agentes antineoplásicos que son comúnmente utilizados en la quimioterapia, como lo son el cisplatino y la temozolamida. Este fármaco cumple con las características de ser barato, accesible, no presenta efectos adversos importantes y cuyas características farmacológicas se encuentran bien establecidas. Y principalmente por su mecanismo de acción que es actuar inhibiendo la PDK, provocando una reactivación en la fosforilación oxidativa para la obtención de ATP.

3.5.1 Dicloroacetato

Es una molécula pequeña y relativamente barata denominada “medicamento huérfano” utilizado para el tratamiento de la acidosis láctica en pacientes pediátricos. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la enzima piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK), favoreciendo la actividad de la piruvato deshidrogenasa (PDH) y así, la transformación del piruvato a Acetil CoA. (Figura 10)

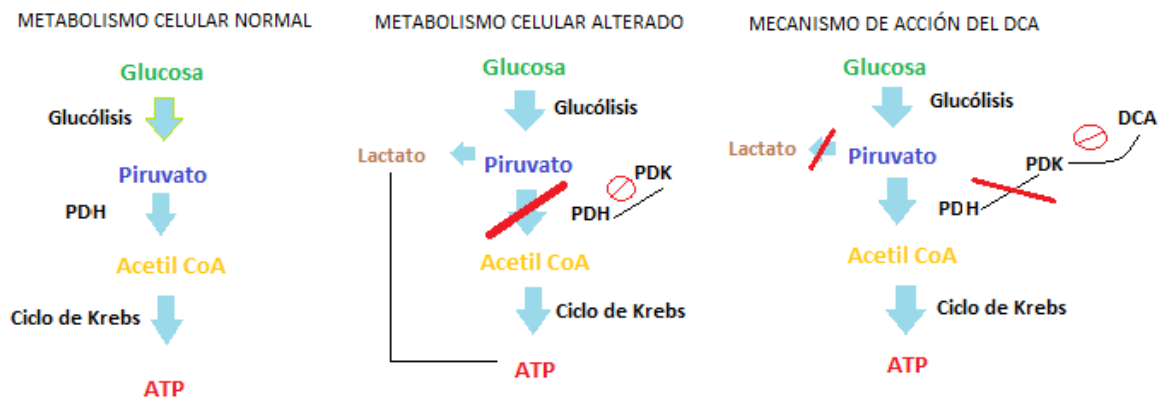


Figura 10. Representación del mecanismo de acción del DCA. ³¹

La importancia de este compuesto radica en que tiene la capacidad de contribuir a que el piruvato presente en la célula pueda ser descarboxilado por la PDH y así, pueda entrar al Ciclo de Krebs, completando la oxidación de la glucosa en la matriz mitocondrial, generando 36 ATPs por la vía de la fosforilación oxidativa ³² revirtiendo así el efecto Warburg y todas las implicaciones de este en el metabolismo celular.

Existen diversos estudios en los cuales se ha utilizado el dicloroacetato en el tratamiento de diversos tipos de cáncer donde se presenta una conversión del uso de la fosforilación oxidativa por glicolisis anaerobia para la obtención de energía, donde el microambiente tumoral es hipóxico y/o donde se presenta una hiperpolarización de la membrana mitocondrial, para observar si este puede provocar una reversión de estas anomalías y así hacer más susceptibles a las células tumorales al tratamiento.

En el presente trabajo se eligieron 2 líneas celulares de cáncer; la primera, SKOV3, es una línea de células epiteliales de ovario, proveniente de una paciente caucásica de 64 años³³; mientras que C6 es una línea de células gliales (fibroblastos) de rata provenientes de un tumor cerebral inducido con N-nitrosometilurea.³⁴ Una de las características sobresalientes de estas líneas es que presentan una resistencia natural al tratamiento. También se ha estudiado que presentan condiciones tumorales que pudieran ser blanco de acción para el dicloroacetato, por lo tanto, este pudiera contribuir a aumentar la susceptibilidad de las células a los tratamientos utilizados en la clínica.

4. HIPÓTESIS

El dicloroacetato incrementará el efecto citotóxico de temozolamida y cisplatino en las líneas celulares de glioma y ovario, respectivamente, a través de la generación de especies reactivas de oxígeno y apoptosis.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del dicloroacetato sobre la citotoxicidad generada por temozolamida en células de cáncer de glioma y cisplatino en células de cáncer de ovario.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto citotóxico que genera la combinación de temozolamida y dicloroacetato en la línea celular de glioma C6.
2. Evaluar el efecto citotóxico que genera la combinación de cisplatino y dicloroacetato en la línea celular de cáncer de ovario SKOV3.
3. Determinar la generación de especies reactivas de oxígeno en la línea celular de cáncer de ovario SKOV3 después de la exposición combinada de dicloroacetato y cisplatino.
4. Determinar el porcentaje de apoptosis en la línea celular de cáncer de ovario SKOV3 después de la exposición combinada de dicloroacetato y cisplatino.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 FÁRMACOS Y REACTIVOS

El dicloroacetato (Sodium Dichloroacetate. 98%, 347795-50G), el cisplatino (cis-Diamine platinum (II) dichloride, 479306-1G) y la temozolamida (T2577-100MG) fueron utilizados de la marca Sigma Aldrich®.

6.2 LÍNEAS CELULARES

La línea celular de glioma C6 fue obtenida de American Type Culture Collection, ATC (Rockville, U.S.A.). Estas fueron cultivadas en condiciones de esterilidad en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM (Gibc, Grand Island, N.Y. U.S.A.) suplementado con el 5% de suero fetal bovino e incubado a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂.

La línea celular de cáncer de ovario SKOV3 fue obtenida de American Type Culture Collection, ATC (Rockville, U.S.A.). Estas fueron cultivadas en condiciones de esterilidad en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM (Gibc, Grand Island, N.Y. U.S.A.) suplementado con el 10% de suero fetal bovino e incubado a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂.

6.3 ESQUEMA DE EXPOSICIÓN A LOS FÁRMACOS.

Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, para la línea SKOV3 y al 5% para la línea celular C6 en cajas de 75 cm² (Esta disminución en el porcentaje de suero fetal bovino se llevó a cabo debido a la alta tasa de proliferación que presenta la línea celular C6). Una vez que la confluencia alcanzó aproximadamente el 90%, las células se despegaron con una solución de PBS-EDTA 0.1 M y se contaron mediante la técnica de azul tripano. Para la línea de cáncer de ovario SKOV3 se estableció que el número óptimo de células por pozo fue de 7,000, mientras que para la línea de glioma C6 se estableció que el número óptimo de células fue de 4,000. Una vez sembradas en placas de 96 pozos, las células fueron expuestas a un rango de concentraciones y tiempos de exposición para cada fármaco; para las exposiciones individuales se estableció para SKOV3

que las concentraciones de cisplatino fueron de 0 a 333 μM por 48 horas con exposición diaria; mientras que para las células C6 las concentraciones de temozolamida fueron en un rango entre 0-1000 μM por 72 horas de exposición diaria. Los tratamientos combinados con DCA fueron para las placas combinadas: Para SKOV3 cisplatino: 10, 25 y 50 μM y DCA: 10, 20, 40, 75 y 100 mM, y para C6 se utilizó temozolamida: 25, 50 y 100 μM y DCA: 1, 5, 10, 20 y 30 mM. Estas concentraciones fueron determinadas mediante las curvas de exposición individual de cada fármaco.

6.4 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

6.4.1 VIABILIDAD CELULAR UTILIZANDO EL ENSAYO XTT

Después de la exposición a las diferentes combinaciones de los fármacos, se utilizó un Kit de proliferación (XTT) (Roche Diagnostics GmbH), utilizando 125 μL del reactivo por pozo a una concentración de 0.15 mg/mL. Las placas se incubaron por 2 horas. Una vez transcurrido este tiempo, la reacción se leyó en un lector de ELISA (Thermo Electron Corporation, Fisher Scientific) a 690 nm y a 492 nm. La viabilidad se determinó mediante la comparación de los pozos control, representando éstos el 100% de viabilidad.

6.4.2 VIABILIDAD CELULAR UTILIZANDO EL ENSAYO DE CRISTAL VIOLETA

La viabilidad celular se corroboró con el ensayo de cristal violeta, para esto después de la exposición de los tratamientos con las diferentes combinaciones de los fármacos, las células se fijaron a la placa con una solución al 4% de formaldehído durante 4 horas. Una vez fijadas, las células se tiñeron con solución de cristal violeta al 0.1% en PBS a cada pozo y se incubaron por 2 horas con agitación constante. Posteriormente el cristal violeta se retiró y se realizaron lavados PBS. Al final, las células teñidas se resuspendieron en ácido acético al 33% y la reacción se leyó en el lector de ELISA (Thermo Electron Corporation, Fisher Scientific) a 570nm.

Para finalizar, se tomaron fotografías de las células que fueron expuestas a los tratamientos con el programa Cells Entry con ayuda de un Microscopio (Olympus 1X51) a cada caja.

6.5 DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

La determinación de la generación de ERO después de los tratamientos se llevó a cabo por citometría de flujo con un equipo Guava® easyCyte Single Sample Flow Cytometer utilizando el ensayo de Annexin V. Para esto se sembraron 1.5×10^5 células SKOV3 en cajas de 25 cm^2 y se expusieron a los siguientes tratamientos: cisplatino solo ($5 \text{ }\mu\text{M}$ y $8.5 \text{ }\mu\text{M}$), DCA solo (50 mM y 75 mM) y las combinaciones de CDDP/DCA ($5 \text{ }\mu\text{M}$ / 50 mM) y ($8.5 \text{ }\mu\text{M}$ / 75 mM). Las células fueron lavadas y tripsinizadas con solución PBS-EDTA 0.1 M-tripsina y se centrifugaron a 2000 rpm durante 8 minutos. El pellet se resuspendió en medio DMEM y las células se contaron con el ensayo de azul tripano utilizando el equipo TC20 Automated Cell Counter (Bio-RAD). Posteriormente se tomó 200,000 células en $200 \text{ }\mu\text{L}$, se agregó 10 mM del reactivo Carboxy H_2 DCFDA, se incubó a temperatura ambiente y condiciones de obscuridad por 30 minutos. Se leyó la fluorescencia de cada muestra en un citómetro Guava® easyCyte Single Sample Flow Cytometer con un número de 5,000 eventos, utilizando como control positivo un grupo de células tratado con H_2O_2 a una concentración de 4 mM .

6.6 DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS

Las células SKOV3 fueron sembradas a una densidad de 1.5×10^5 células SKOV3 en cajas de 25 cm^2 . El esquema de tratamiento fue el mismo utilizado para el ensayo de ERO. Después de que las células fueron lavadas, tripsinizadas y contadas, se agregó $100 \text{ }\mu\text{L}$ del reactivo Guava Nexin® Annexin V Assay y se incubó a temperatura ambiente, en condiciones de obscuridad por 20 minutos. La fluorescencia de cada muestra se leyó en un citómetro Guava® easyCyte Single Sample Flow Cytometer con un número de 10,000 eventos.

Para la determinación de apoptosis se utilizó un gráfico de dispersión de 4 cuadrantes cuyos ejes muestran si la célula analizada es positiva y/o negativa tanto para Anexina como para 7AAD (Figura 11).

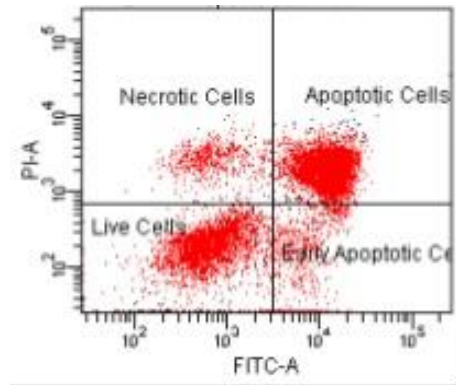


Figura 11. Cuadrantes obtenidos en un análisis de apoptosis mediante citometría de flujo.

6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico para la determinación de la citotoxicidad generada por las combinaciones de los fármacos se llevó a cabo mediante el programa IBM SPSS Statistics. Se realizaron comparaciones de medias mediante ANOVA de una vía y posteriormente una prueba posthoc Bonferroni con un $\alpha=0.05$. El análisis estadístico para la determinación de ERO y Apoptosis se llevó a cabo mediante el programa SigmaStat. Se realizaron comparaciones de medias mediante ANOVA de una vía y posteriormente una prueba de Tukey con un $\alpha=0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 CITOTOXICIDAD DE LOS FÁRMACOS INDIVIDUALES.

A partir de las curvas de concentración-efecto se determinó la CI_{50} de cada fármaco aplicado de manera individual, de este valor se establecieron las concentraciones de cada fármaco para ser combinadas con el DCA.

En las figuras 12 y 13 se muestran los resultados derivados de las curvas de concentración-efecto de temozolamida en la línea celular C6 y de cisplatino en la línea celular SKOV3, observando una disminución de la viabilidad celular con respecto al incremento de las concentraciones de cada fármaco. A partir de estas curvas se determinaron las CI_{50} para cada fármaco individual, las cuales fueron 115 μM para temozolamida en la línea C6 y 16 μM para cisplatino en la línea celular SKOV3.

En la figura 14 se muestran los resultados derivados de las curvas de concentración-efecto de dicloroacetato tanto en la línea celular C6, como en la línea SKOV3, observando una disminución en la viabilidad celular respecto al incremento de las concentraciones. A partir de estas curvas se determinaron las CI_{50} para cada línea celular, las cuales fueron 33 mM para C6 y 75 mM para SKOV3

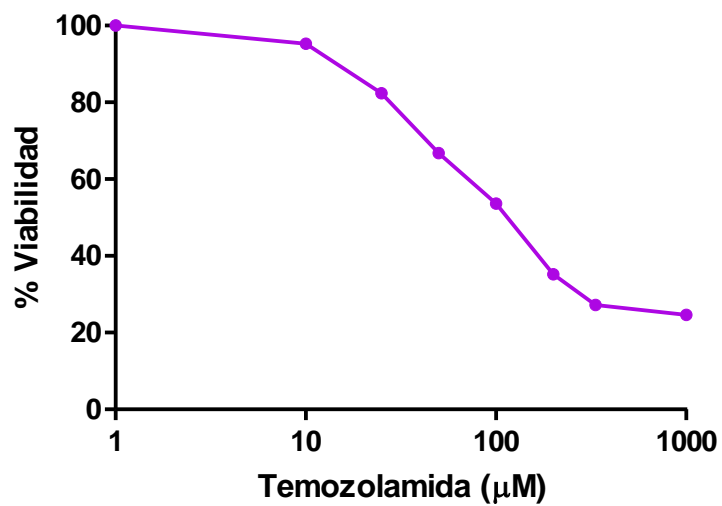


Figura 12. Viabilidad de la línea celular C6 después de la exposición a Temozolamida. Cada punto representa una n=8 repeticiones.

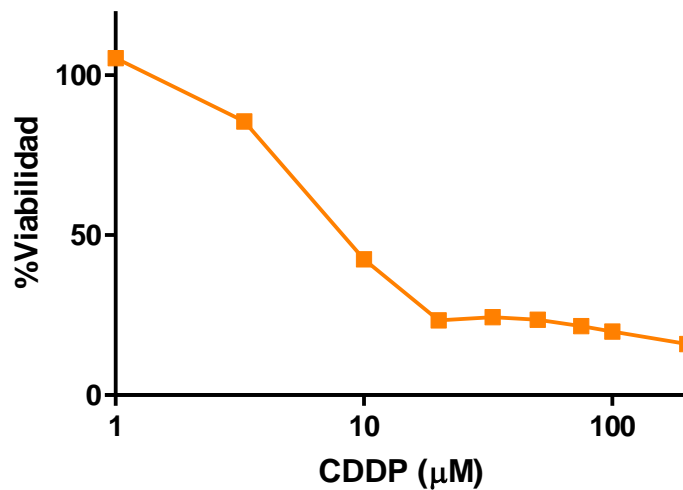


Figura 13. Viabilidad de la línea celular SKOV3 después de la exposición a Cisplatino. Cada punto representa una n=8 repeticiones

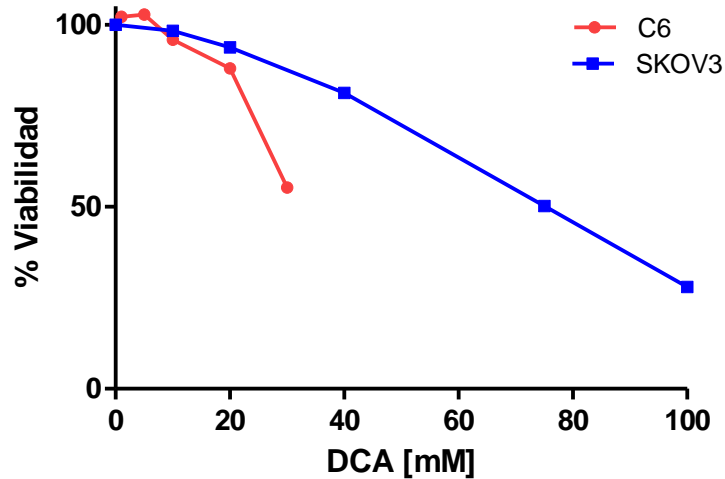


Figura 14. Viabilidad de las líneas celulares C6 y SKOV3 después de la exposición a Dicloroacetato.

7.2 EFECTO CITOTÓXICO DESPUÉS DE LA COMBINACIÓN DE TMZ Y DCA EN LA LÍNEA CELULAR C6

En la figura 15 se observa una disminución en la viabilidad celular en presencia de concentraciones crecientes de TMZ. Sin embargo, esta disminución fue mayor cuando las células fueron expuestas a la combinación de TMZ y DCA 20 y 30 mM, siendo estadísticamente significativa con la concentración de 30mM de DCA. En la tabla 1 se presentan los resultados de la CI_{50} obtenidos, observando una disminución en esta cuando se combina la TMZ con el DCA 20 y 30 mM.

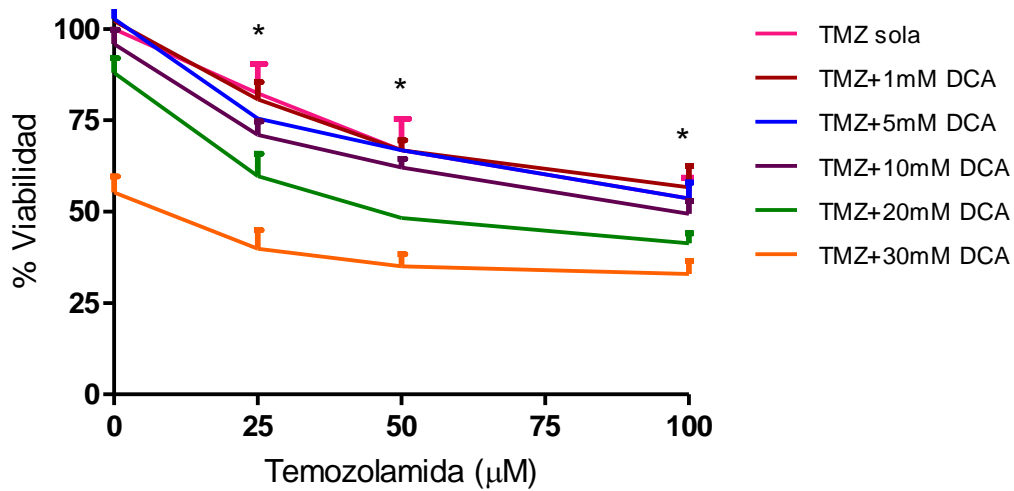


Figura 15. Viabilidad celular de la línea C6 después de la exposición de TMZ sola o combinada con DCA. Cada punto representa una n=3 experimentos independientes \pm E.E. *Diferencia estadísticamente significativa de la combinación TMZ+30mM DCA respecto a TMZ sola. * $p < 0.05$

Tabla 1. CI_{50} de temozolamida sola o combinada con DCA.

	CI_{50}
TMZ SOLA	115 μ M
DCA SOLO	33 mM
TMZ + 20 mM DCA	44.5 μ M
TMZ+30 mM DCA	8.3 μ M

7.3 EFECTO CITOTÓXICO DESPUÉS DE LA COMBINACIÓN DE CDDP Y DCA EN LA LÍNEA CELULAR SKOV3.

En la figura 16 se observa una disminución de la viabilidad celular de la línea SKOV3 en presencia de concentraciones crecientes de CDDP. Sin embargo, esta disminución fue mayor cuando el CDDP se combinó con el DCA, siendo estadísticamente significativo con las concentraciones de 75 y 100 mM de DCA.

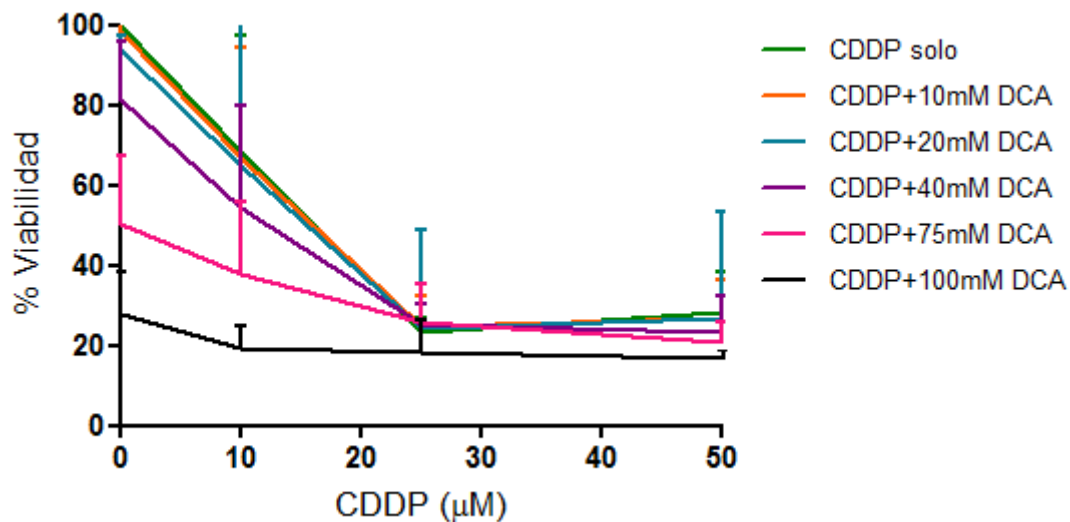


Figura 16. Viabilidad de la línea celular SKOV3 después de la exposición de CDDP solo o combinado con DCA. Cada punto representa una n=3 experimentos independientes \pm E.E.

Tabla 2. CI_{50} de cisplatino solo o combinado con DCA.

CI_{50}	
CDDP SOLO	16 μ M
DCA SOLO	75 mM
CDDP + 75 mM DCA	<10 μ M
CDDP+100 mM DCA	<10 μ M

Para corroborar nuestros resultados de viabilidad celular obtenidos con el ensayo de XTT se realizó la evaluación de la viabilidad celular con los mismos tratamientos utilizando el método de cristal violeta observando resultados similares al ensayo de XTT.

En las imágenes de las figuras 17 y 18 podemos observar un aumento significativo en la muerte celular después de los tratamientos. Se presenta una mayor muerte con la combinación de CDDP con DCA. Además, las células cuando se exponen tanto a DCA solo como combinado con los antineoplásicos cambian su morfología, siendo más alargadas.

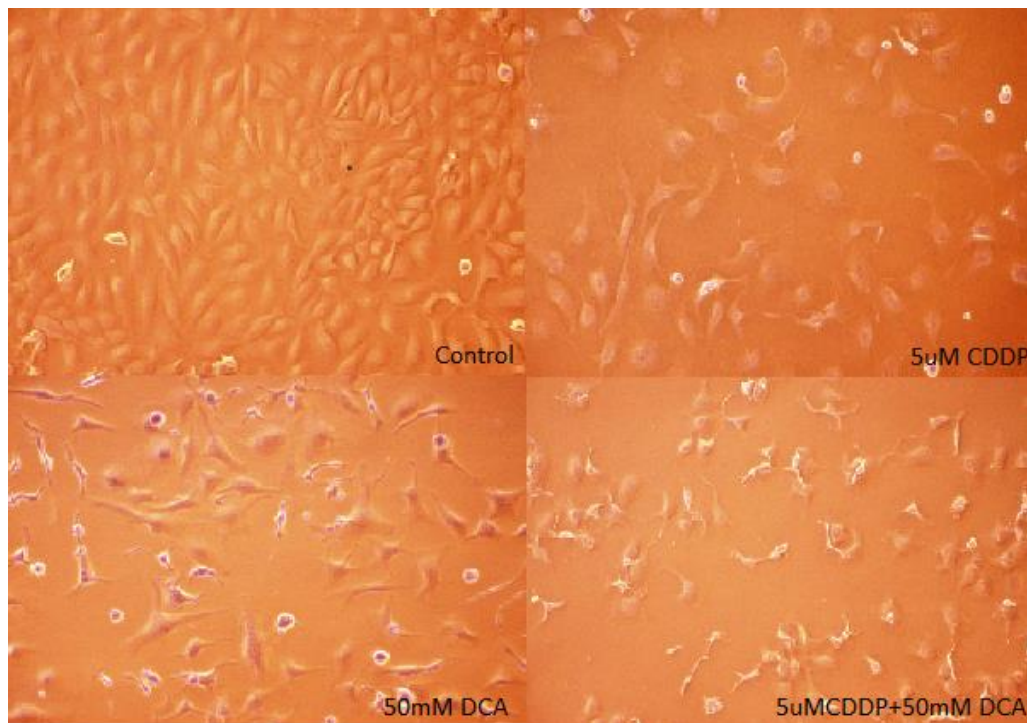


Figura 17. Imágenes representativas del crecimiento celular después de la exposición a los fármacos con concentraciones de 5 μ M CDDP, 50 mM DCA y su combinación con un aumento 10X.

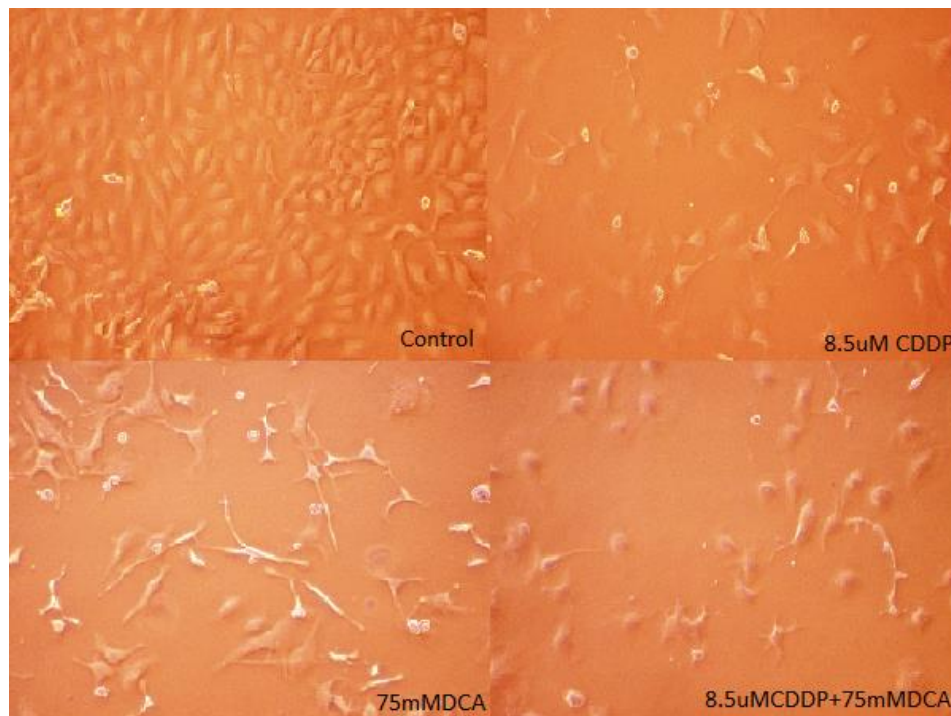


Figura 18. Imágenes representativas del crecimiento celular después de la exposición a los fármacos con concentraciones de 8.5 μ M CDDP, 75 mM DCA y su combinación con aumento 10X.

7.4 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO DESPUÉS DE LOS TRATAMIENTOS INDIVIDUALES Y COMBINADOS CON DCA.

Para la evaluación de las especies reactivas de Oxígeno con los tratamientos solos o combinados, las concentraciones fueron elegidas a partir de los resultados obtenidos de la viabilidad celular. Para el caso del CDDP se eligieron dos concentraciones (5 y 8.5 μ M) Las cuales corresponden a la CI_{20} y CI_{50} . Estas concentraciones fueron combinadas con DCA a 50 mM y 75 mM, que corresponden a la CI_{30} y CI_{50} , respectivamente.

Los resultados mostrados en las figuras 19 y 20, fueron normalizados al valor del grupo control. Se puede observar un aumento en la intensidad de la fluorescencia tanto con la exposición de los fármacos individuales como en las combinaciones con DCA. Estos resultados se corroboran con el desplazamiento del pico tanto de los tratamientos individuales como las combinaciones hacia la derecha, como se observan en los histogramas (Figuras A 19 y 20). Sin embargo, este desplazamiento fue mayor cuando se expuso la combinación de CDDP con DCA, siendo

estadísticamente significativo con ambas combinaciones; 5 μ M CDDP+ 50 mM DCA (Figura 19) y 8.5 μ M de CDDP + 75 mM de DCA (Figura 20).

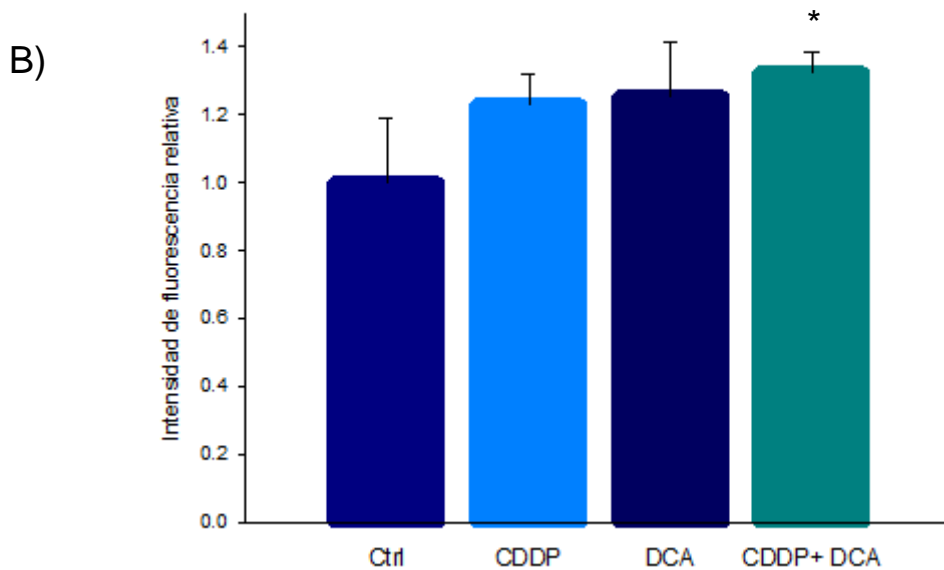
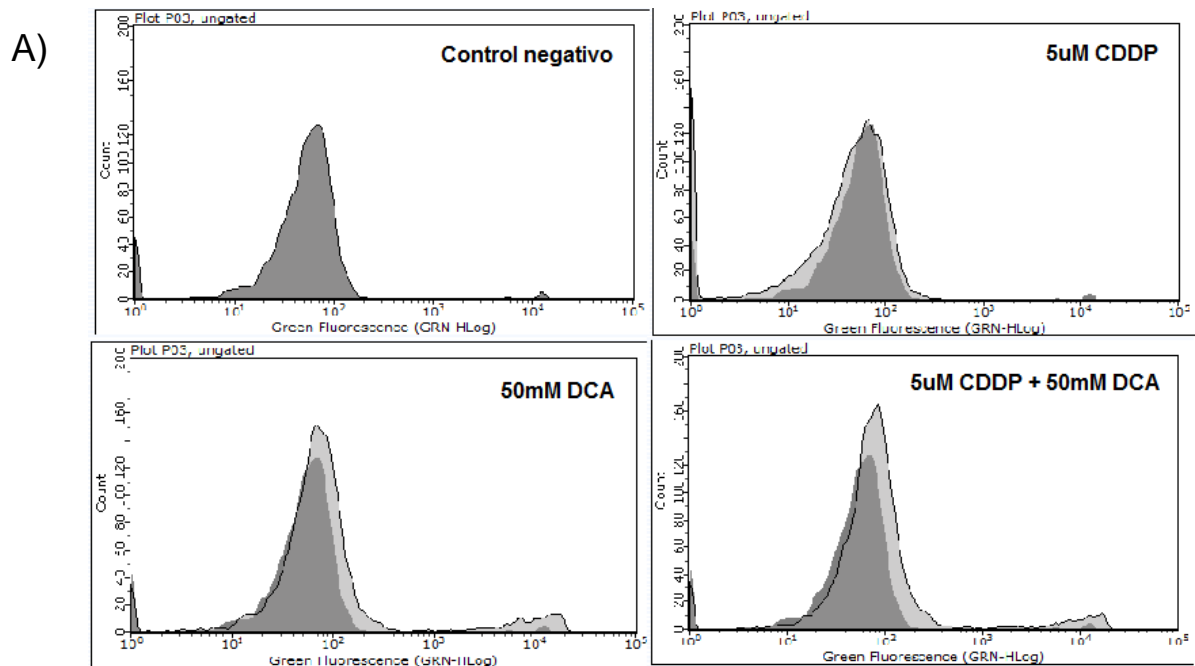


Figura 19. Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) después de los tratamientos con CDDP 5 μ M y DCA 50 mM. A) Histogramas representativos de cada tratamiento, B) Promedio de 3 experimentos independientes \pm D.E.

*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control; $p < 0.05$

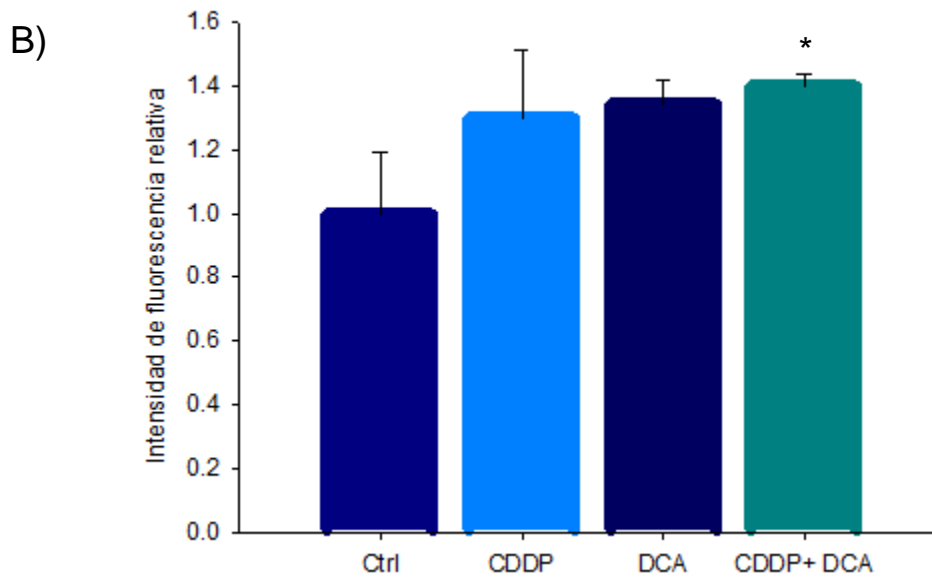
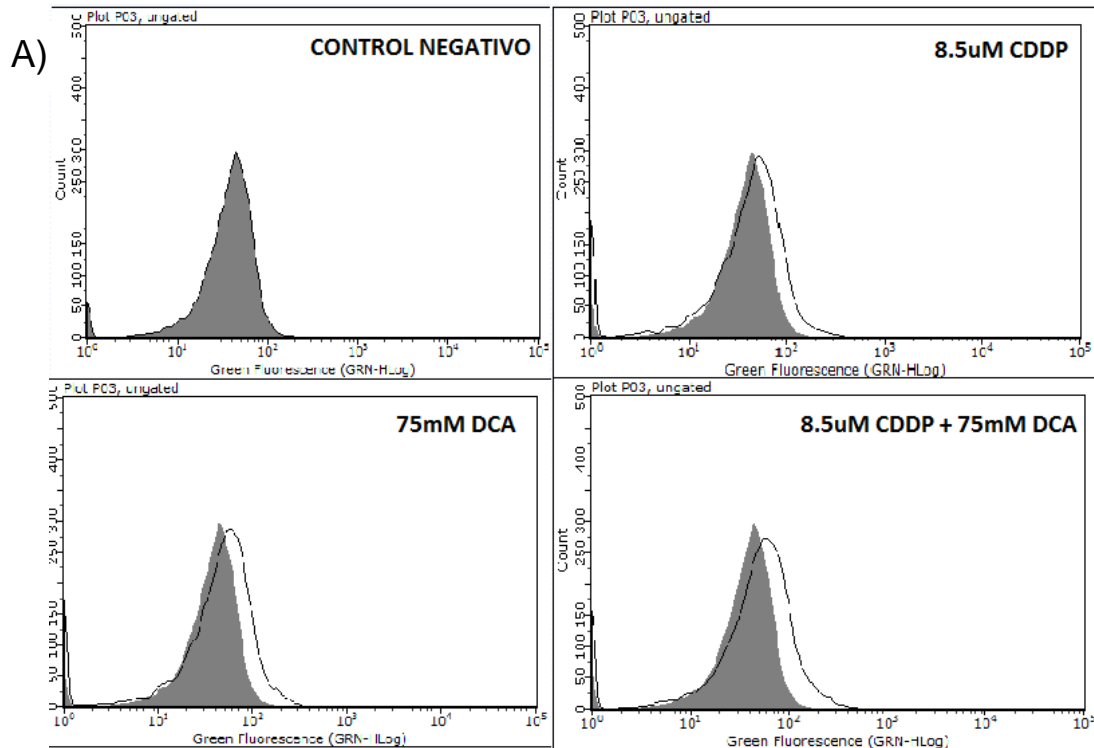


Figura 20. Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) después de los tratamientos con CDDP 8.5 μ M y DCA 75 mM. A) Histogramas representativos de cada tratamiento, B) Promedio de 3 experimentos independientes \pm D.E.

*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control; $p < 0.05$

7.5 DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS

Para la evaluación de la apoptosis con los tratamientos solos o combinados, las concentraciones fueron elegidas a partir de los resultados obtenidos de la viabilidad celular. Para el caso del CDDP se eligieron dos concentraciones (5 y 8.5 μ M) Las cuales corresponden a la CI_{20} y CI_{50} . Estas fueron combinadas con DCA 50 mM y 75 mM, que corresponden a la CI_{30} y CI_{50} , respectivamente.

Los resultados se muestran en la figura 21 y 22, fueron normalizados al valor del grupo control y se graficó el incremento del porcentaje relativo de apoptosis. Como se puede observar en la figura 21 no hubo un incremento en la apoptosis cuando se utilizaron las concentraciones de 5 μ M y 50 mM de DCA y su combinación. Sin embargo, aunque la diferencia no alcanzó a ser significativa, se observa una tendencia al incremento cuando se utilizaron las concentraciones de 8.5 μ M de CDDP, 75 mM de DCA y su combinación (Figura 22).

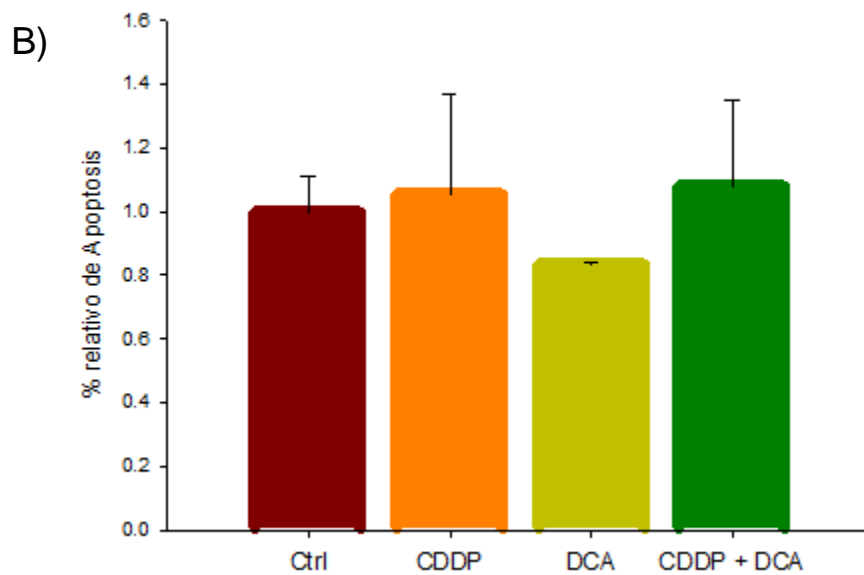
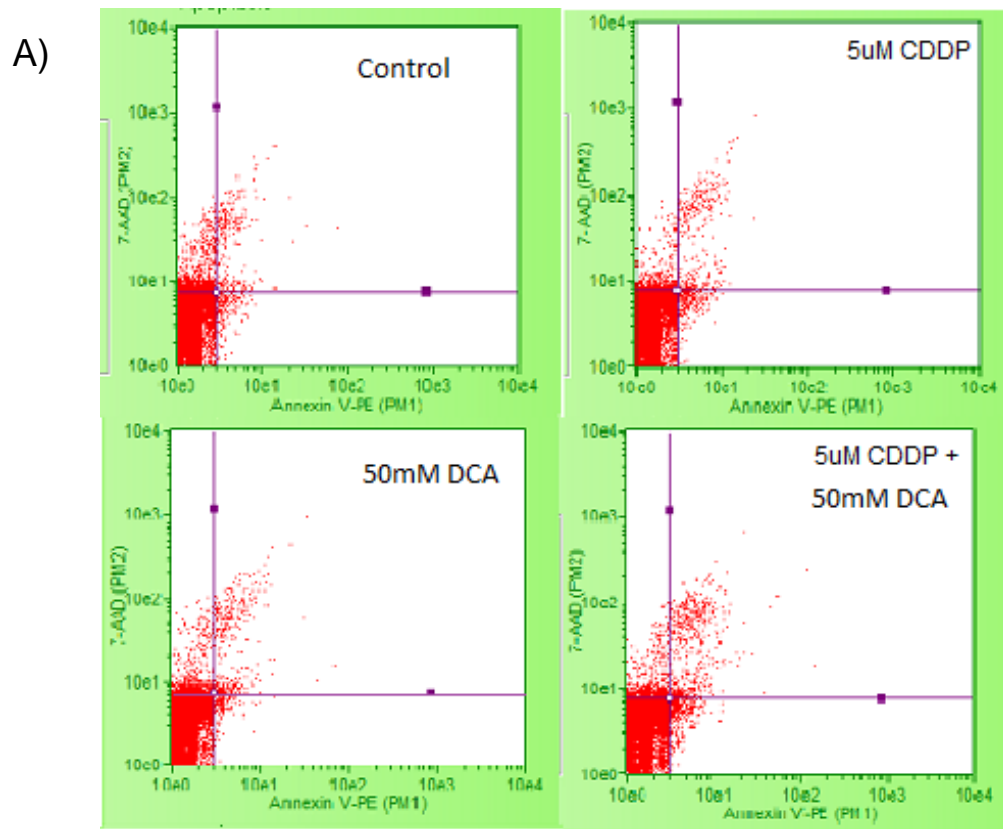


Figura 21. Apoptosis después de los tratamientos con CDDP 5 μ M y DCA 50 mM. A) Cuadrantes representativos de cada tratamiento, B) Promedio de 2 experimentos independientes \pm E.E.

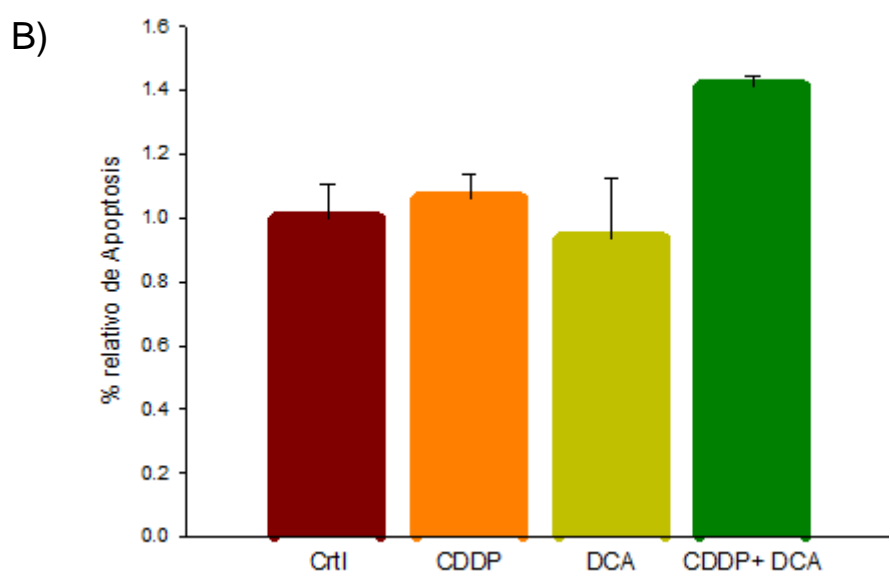
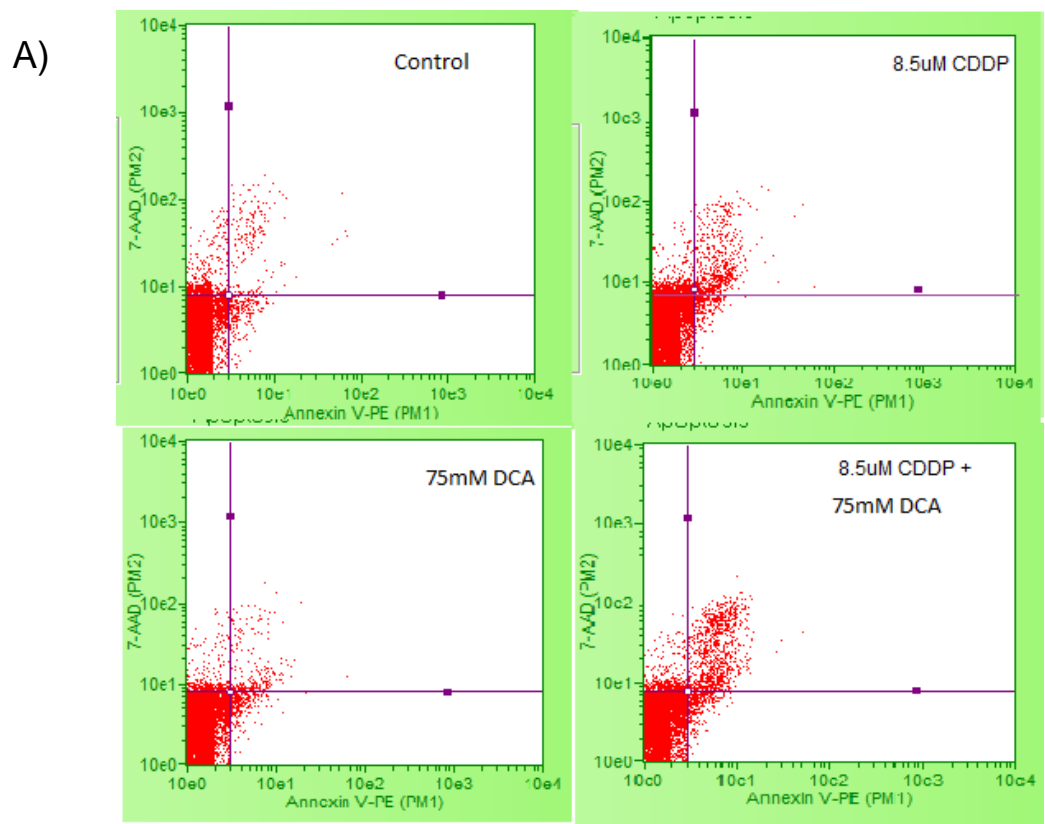


Figura 22. Apoptosis después de los tratamientos con CDDP 8.5 µM y DCA 75 mM. A) Cuadrantes representativos de cada tratamiento, B) Promedio de 2 experimentos independientes ± E.E.

8. DISCUSIÓN

Durante muchos años se han buscado nuevas estrategias que sean efectivas para combatir el cáncer y prolongar la sobrevivencia de los pacientes. Una de estas estrategias se ha enfocado en la búsqueda de fármacos que afecten el metabolismo de las células tumorales³⁵.

En este trabajo se investigó el posible efecto citotóxico de DCA combinado con temozolamida en células de glioma y de cisplatino en células de cáncer epitelial de ovario; a pesar de que se ha demostrado la eficacia del DCA en distintos tipos de cáncer, a la fecha, existen pocos reportes que lo utilizan en combinación con agentes antineoplásicos.

El dicloroacetato es una molécula pequeña considerada como un fármaco con implicación en el metabolismo celular. Estudios clínicos han demostrado que el DCA reduce los niveles de lactato en pacientes con acidosis láctica y sepsis.³⁹ También se ha reportado que el DCA activa a la piruvato deshidrogenasa (PDH) por la inhibición de la piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK) de manera dosis dependiente, y cuyos resultados muestran un incremento en las concentraciones de piruvato en la mitocondria, restaurando así su funcionalidad, induciendo la apoptosis.⁴⁰ La actividad antitumoral del DCA ha sido demostrada en diversos tipos de cáncer, como pulmón, mama, glioblastoma, endometrio y próstata.⁴¹⁻⁴³ Además, este fármaco presenta diversas ventajas, como una biodisponibilidad de casi el 100% cuando se administra por vía oral y puede atravesar la barrera hematoencefálica.

La mitocondria ha sido identificada como uno de los principales blancos, debido a su papel central en la vía de la apoptosis y en el metabolismo celular.³⁶ El marcador más común de las células tumorales es que estas producen altas concentraciones de ácido láctico por el metabolismo de la glucosa aún en presencia de oxígeno, para obtener energía³⁷ (glicolisis). Este cambio metabólico está relacionado con la transformación celular y la

supresión de la apoptosis. Se han realizado estudios que demuestran que el metabolismo energético está regulado por proteínas cinasas. La PDK es una enzima de control, que regula el flujo de carbohidratos, como el piruvato, hacia la mitocondria. La enzima PDK es capaz de inhibir la actividad de la PDH, enzima que convierte el piruvato en Acetil CoA, lo que limita la entrada de piruvato a la mitocondria. Diversos estudios demuestran que la entrada de piruvato al ciclo de Krebs se encuentra disminuido en las células tumorales y que la glicolisis aerobia está incrementada.³⁸ Esta diferencia bioenergética entre las células tumorales y normales podría ofrecer un blanco terapéutico bastante selectivo.

En la primera fase de este trabajo se realizaron las curvas de exposición a los fármacos de manera individual para determinar la CI_{50} , a partir de estos valores se eligieron las concentraciones para combinarse con DCA. Las concentraciones elegidas para TMZ fueron 25, 50 y 100 μ M y para CDDP fueron 10, 25 y 50 μ M, las cuales corresponden a valores que se encuentran por debajo de su CI_{50} .

Citotoxicidad de la combinación de temozolamida y dicloroacetato en la línea celular de glioma C6 y de cisplatino y dicloroacetato en la línea celular SKOV3.

En estudios previos se reportó que el DCA inhibe la angiogénesis, induce la apoptosis y suprime la proliferación celular tanto en células tumorales como en células troncales de glioblastoma sin una toxicidad sistémica asociada.⁴³ Además de producir un incremento en la función mitocondrial y en la fosforilación oxidativa, disminuyendo así los niveles de lactato en el microambiente tumoral.³² De esta manera, se activan mecanismos que las células tumorales tienen controlados para evitar su muerte, como lo es la restauración de la actividad mitocondrial y por lo tanto, la inducción de la apoptosis. También la disminución del lactato genera cambios en el microambiente tumoral, relacionados con la hipoxia que se presenta en el

tumor, favoreciendo la activación de la fosforilación oxidativa³² y con ellos, mecanismos como lo son la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO).

Los resultados obtenidos en este proyecto demuestran que la CI_{50} de la combinación de temozolamida con 30mM de DCA disminuye significativamente ($8.3\mu M$) con respecto a la aplicación de temozolamida sola ($115\mu M$). En el caso de los resultados obtenidos con la combinación de cisplatino y DCA en células de cáncer de ovario (SKOV3), la CI_{50} en la combinación con 75 y 100mM disminuyó significativamente ($<10\mu M$) con respecto a cisplatino solo ($16\mu M$).

Estos resultados sugieren que el DCA sensibiliza a las células de glioma al efecto citotóxico de temozolamida y a las células de cáncer epitelial de ovario al efecto citotóxico de cisplatino.

Los mecanismos propuestos por los cuales el DCA contribuya al incremento en la citotoxicidad de temozolamida y cisplatino se discuten a continuación.

La obtención de ATP por medio de la glicolisis aerobia representa un cambio en el metabolismo celular. Este cambio se puede deber a diversos mecanismos como lo son: cambios en la mitocondria, que pueden presentarse por una acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial y desencadenan en una hiperpolarización de la membrana mitocondrial, impidiendo así sus funciones normales.³⁸ Adicionalmente se presenta una inhibición de la proteína p53, que es un gen supresor de tumores, lo que promueve la proliferación celular. Además de que se ha encontrado que actúa como un regulador del balance entre la respiración oxidativa y la glicolisis aerobia⁴⁴; también se ha demostrado que el Factor inducible de hipoxia 1 (HIF-1) tiene un papel importante en este cambio, debido a que es uno de los reguladores de los factores de transcripción relacionados con la glicolisis⁴⁵, provoca un aumento en la expresión de transportadores de glucosa GLUT 1 y 3, induce VEGF y promueve el desarrollo de microambientes pro-inflamatorios, entre otras cosas.⁴⁶

El DCA al inhibir la PDK y disminuir las cantidades de lactato en el microambiente tumoral, podría contribuir a que se activen mecanismos como la apoptosis y la generación de ERO, favoreciendo la muerte celular y resultando en un aumento significativo en la citotoxicidad de temozolamida y cisplatino.

Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en la línea celular SKOV3 después de la exposición combinada de dicloroacetato y cisplatino.

En diversos estudios se ha demostrado que las especies reactivas de oxígeno pueden ser las moléculas que desencadenan la apoptosis y que el peróxido de hidrógeno es la principal especie que regula esta citotoxicidad celular.⁴⁷ Esta especie se forma, en mayor parte, por la actividad de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria y el retículo endoplásmico⁴⁸, es por eso que cuando se presenta una función anormal de la mitocondria, esta vía de muerte celular se ve disminuida o inhibida.

Con las exposiciones de los fármacos se pudo observar un incremento de alrededor del 40%, el cual alcanzó significancia estadística únicamente en los dos tratamientos combinados con respecto al grupo control. Esto puede deberse a que la presencia del DCA, reactive la vía de la fosforilación oxidativa y eso desencadene en una activación de la mitocondria, por lo que se genere un aumento en la generación de las especies reactivas de oxígeno y eso contribuya a un aumento en la muerte celular.

Determinación del porcentaje de apoptosis en la línea celular de cáncer de ovario SKOV3 después de la exposición combinada de dicloroacetato y cisplatino.

Se ha demostrado que el tratamiento con DCA, promueve la apoptosis en cáncer de pulmón y mama, así como en líneas celulares de glioblastoma por una reversión en el metabolismo de la glicolisis aerobia a la fosforilación oxidativa de la glucosa.³² El mecanismo del DCA también contribuye a la inhibición de la PDK y la supresión del complejo piruvato deshidrogenasa, lo que ocasiona una disminución del potencial de la membrana y la activación de los canales de potasio en la mitocondria de las células tumorales.⁴⁰ Uno de los mecanismos de resistencia a cisplatino es la disminución de la formación de aductos en ADN, favoreciendo una disminución en la apoptosis. Se ha reportado que el DCA contribuye a que las células tumorales sean más susceptibles a la apoptosis.⁴⁹

En el presente trabajo no se observan cambios en el porcentaje de apoptosis con los tratamientos individuales o combinados de las concentraciones de 5 μ M de cisplatino con 50 mM de DCA. Sin embargo, se presentó una tendencia al incremento con el tratamiento combinado de 8.5 μ M de CDDP y 75 mM DCA respecto al grupo control, aunque esta no fue estadísticamente significativa. Para verificar si este aumento presenta diferencia significativa, es necesario completar la "n" experimental, debido a que sólo se realizaron 2 determinaciones. Estos resultados nos llevan a sugerir que existe un posible efecto sinérgico con la combinación de cisplatino y DCA a estas concentraciones y que este puede deberse a los mecanismos que comparten entre ellos o a los mecanismos propios de cada fármaco que resultan en un incremento parcial de la apoptosis.

9. CONCLUSIÓN

El dicloroacetato demostró un aumento en el efecto citotóxico en las líneas celulares de glioma y ovario al combinarse con temozolamida y cisplatino, respectivamente. Además, en las células de cáncer epitelial de ovario, el efecto citotóxico puede estar relacionado parcialmente con el incremento de ERO y apoptosis.

10. PERSPECTIVAS

- Estudiar la vía metabólica involucrada en el efecto de citotoxicidad del DCA que contribuye a una mejor respuesta en la terapia para glioma y cáncer de ovario.
- Verificar el efecto de la combinación del DCA con antineoplásicos mediante un modelo de xenotrasplante.
- Probar la combinación de DCA y otros fármacos estándar en la terapia de otros tipos de cáncer en donde se presente resistencia al tratamiento.
- Probar la combinación del DCA y el fármaco estándar en terapia de tipos de cáncer que presenten características metabólicas blanco para el DCA.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. López, M., Sotelo, J. Brain Tumors in Mexico: Characteristics and prognosis of glioblastoma. *Surgical Neurology*. 2000, 53(2), 157-62.
2. Draper, M., Jones, G., Gould, C., Modrak, D., *Mechanisms of resistance to anticancer drugs* en *Frontiers in Antimicrobial Resistance*. White, David G. ASM Press, Washington, D.C. 2005. 473-475.
3. <http://globocan.iarc.fr/> [CONSULTADO 2017-03-01]
4. <http://www.inegi.org.mx/> [CONSULTADO 2017-03-01]

5. Lan-Feng D., Jiri N., *Mitochondria in Cancer: Why mitochondria are a good target for cancer therapy*, Progress in Molecular Biology and Translational Science, Elsevier Inc, 2014, 127, ISSN 1877-1173, 211-226
6. Hanahan D., Weinberg R., *Hallmarks of cancer: The next Generation*, Cell, 2011; 144: 646-674.
7. Hanahan D., Folkman, J. *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996, 86, 353–364.
8. Karnoub, A.E., Weinberg, R.A. *Chemokine networks and breast cancer metastasis*. Breast Disease, 2007, 26, 75–85.
9. Ramirez Y., Weatherbee J., Wheelhouse R., Ross A., *Glioblastoma multiforme therapy and mechanisms of Resistance*, Pharmaceuticals, 2013, 6, 1475-1506.
10. Friedman H., Kerby T., Calvert H., *Temozolamide and treatment of Malignant Glioma*, Clinical Cancer Research, 2000, 6, 2585- 2597.
11. Davis A., Tinker A., Friedlander M., *“Platinum resistant” ovarian cancer: What is it, who to treat and how to measure benefit?*, Gynecologic Oncology 2014, 133, 624-631.
12. Dasari S., Bernard P., *Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action*, European Journal of Pharmacology, 2014, 740, 364-378.
13. Kojima T., Morita Y., *Cisplatin: Pharmacology, Clinical Uses and Adverse Effects*, Nova Science Publishers, Inc., New York, 2012, 1-14
14. Hunakova L., Gronesova P., Horvathova E., Cholujoval D., *Modulation of cisplatin sensitivity in human ovarian carcinoma A2780 and SKOV3 cell lines by sulforaphane*, Toxicology letters, 2014, 230, 479-486.
15. Kartalou M, Essigmann JM, *Mechanisms of resistance to cisplatin*, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2001, 478, Issues 1-2 23-43.

16. Cairns R., Harris I., Mak T., *Regulation of cancer cell metabolism*, Nature Reviews, Cancer, 2011, 11, 85-95
17. López.M., The Warburg effect: Why and How do cancer cells activate glycolysis in the presence of Oxygen?, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2008, 8, 305-312.
18. Vander M., Cantley L., Thompson C., *Understanding the Warburg Effect: The metabolic requirements of cell proliferation*, Science, 2009, 324(5930), 1029-1033.
19. Warburg O. *On the origin of Cancer Cells*, Science, 1956, 123;3191, 309-314
20. Cascales M., *Bases moleculares de la apoptosis*, Anal. Real Academia Nacional de Farmacología, 2003, (69), 36-64.
21. Rojas M., Salmen S., Berrueta L., *Muerte celular programada; I. Activación y mecanismos de regulación*, Revista Médica de la Extensión Portuguesa. ULA, 2009, 92-106.
22. Falkenberg M, Larsson NG, Gustafsson CM. *DNA replication and transcription in mammalian mitochondria*. Annual Review of Biochemistry, 2007; 76:679–699.
23. Brandon M, Baldi P, Wallace DC. *Mitochondrial mutations in cancer*. Oncogene. 2006; 25:4647–4662.
24. Krishnan KJ, Reeve AK, Samuels DC, et al. *What causes mitochondrial DNA deletions in human cells?* Nature Genetics. 2008; 40:275–279.
25. Jianxin L., Lokendra S., Yidong B., *Implications of mitochondrial DNA mutations and mitochondrial dysfunction in tumorigenesis*, Cell Research, 2009, 19:802-815.

- 26.** Michael P. Murphy, *Understanding and preventing mitochondrial oxidative damage*, Biochemical Society Transactions, 2016, 44: 1219-1226
- 27.** Thurston, David E.; *Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs*; CRC Press Taylor & Francis Group, 2007. 37-43, 61-63
- 28.** Stojkovic S., et all. *Development of resistance to anti glioma agents in rat C6 cells caused collateral sensitivity to doxorubicin*, Experimental Cell Research, 2015.
- 29.** Rivas-Corchado L., González-Geroniz M., Hernández-Herrera R., *Perfil epidemiológico del cáncer de ovario*, Ginecología y Obstetricia de México, 2011; 79(9), 562-568
- 30.** Langton-Webster B., Jian-Ai X., Jody B., David S, *Development of Resistance to Cisplatin Is Associated with decreased Expression of the gpl 85cerbB2 Protein and Alterations in Growth Properties and Responses to Therapy in an Ovarian Tumor Cell Line*, Cell Growth and Differentiation, 1994, vol 5, 1367-1372.
- 31.** Santander N., Rebellón D., et all, *El dicloroacetato: Medicamento huérfano con un posible uso en oncología*, Rev. Farmacológica Chile, 2004, 7(2), 50-56.
- 32.** Michelakis E.D., Sutendra G, Dromparis P., et all. *Metabolic modulation of glioblastoma with dicloroacetate*, Science Translational Medicine, 2010, Vol 2 (31), 31ra34
- 33.** https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-77.aspx?geo_country=be Consultado 11/05/2017 a las 8:00pm
- 34.** <https://www.atcc.org/Products/All/CCL-107.aspx#generalinformation>. Consultado 11/05/2017 a las 8:35pm.

- 35.** Pan G., Mak T., *Metabolic targeting as an anticancer strategy: dawn of a new era?*, Science's STKE, 2007 (381) pe14.
- 36.** Samudio I., Fiegl M., Andreeff M., *Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism*, Cancer Research. 2009;69(6):2163–2166.
- 37.** Pathania D., Millard M., Neamati N., *Opportunities in discovery and delivery of anticancer drugs targeting mitochondria and cancer cell metabolism*, Advanced Drug Delivery Reviews, 2009;61(14):1250–1275.
- 38** Yeung J., Pan J., Lee MH., *Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis – the seventh hallmark of cancer*, Cellular and Molecular Life Sciences, 2008; 65(24):3981–3999.
- 39.** Stacpoole PW, Harman EM, Curry SH, Baumgartner TG, Misbin RI. *Treatment of lactic acidosis with dichloroacetate*. The New England Journal of Medicine, 1983; 309:390–6.
- 40.** Bonnet S., Archer S., Allalunis-Turner J., et al. *A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth*, Cancer Cell. 2007;11(1):37–51
- 41.** Wong Y., Huggins S., Debidda M., Munshi C., De Vivo I. *Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells*. Gynecologic Oncology 2008; 109(3):394–402.
- 42.** Cao W., Yacoub S., Shiverick T., et al. *Dichloroacetate (DCA) sensitizes both wild-type and over expressing Bcl-2 prostate cancer cells in vitro to radiation*. Prostate. 2008; 68(11):1223–1231.

- 43** Kuroda Y., Toshima K., Watanabe T., et al. *Effects of dichloroacetate on pyruvate metabolism in rat brain in vivo*. Pediatric Research, 1984; 18(10): 936–938.
- 44.** Schwartzenberg-Bar-Yoseph F., Armoni M., Karnieli E., *The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression*. Cancer Research, 2004, 64, 2627–2633.
- 45.** Semenza G. L., Roth H., Fang M., Wang G. L., *Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1*. The Journal of Biological Chemistry, 1994; 269,23757–23763.
- 46.** Martinez O., *Glicolisis, Efecto Warburg y flexibilidad metabólica tumoral*, Depto Bioquímica, Facultad Medicina, UA Madrid, 2015. SEBBM
- 47.** Lander, H.M., An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. FASEB J. 1997, 11, 118–124.
- 48.** Halliwell, B., *Reactive oxygen species and the central nervous system*. Journal of Neurochemistry, 1992, 59, 1609–1623.
- 49.** Sedletska Y., Giraud-Panis J., Malinge M., *Cisplatin is a DNA damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: Importance of apoptotic pathways*. Current Medicinal Chemistry. Anticancer Agents, 2005; 5:251–265.