



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**LOS FÁRMACOS ANTINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS INCREMENTAN LA  
POTENCIA DE CISPLATINO, PACLITAXEL Y DOXORRUBICINA EN ESFEROIDES  
MULTICELULARES DE CÁNCER CERVICOUTERINO HELA**

# **TESIS**

**PARA OPTAR POR EL DE GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**BIOL. ROBLEDO CADENA DIANA XOCHIQUETZAL**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SARA RODRÍGUEZ ENRÍQUEZ**  
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"

**COMITÉ TUTOR: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE**  
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"

**DRA. MARÍA DEL CARMEN MEJÍA VÁZQUEZ**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**CD. MX., AGOSTO 2019**



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.





# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**LOS FÁRMACOS ANTINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS INCREMENTAN LA  
POTENCIA DE CISPLATINO, PACLITAXEL Y DOXORRUBICINA EN ESFEROIDES  
MULTICELULARES DE CÁNCER CERVICOUTERINO HELA**

# **TESIS**

**PARA OBTENER EL DE GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:  
BIOL. ROBLEDO CADENA DIANA XOCHIQUETZAL**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SARA RODRÍGUEZ ENRÍQUEZ**  
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"

**COMITÉ TUTOR: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE**  
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"

**DRA. MARÍA DEL CARMEN MEJÍA VÁZQUEZ**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**MÉXICO, CD. MX., AGOSTO 2019**

OFICIO CPCB/824/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 18 de febrero de 2019, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ROBLEDO CADENA DIANA XOCHIQUETZAL** con número de cuenta **308203747**, con la tesis titulada **"LOS FÁRMACOS ANTINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS INCREMENTAN LA POTENCIA DE CISPLATINO, PACLITAXEL Y DOXORRUBICINA EN ESFEROIDES MULTICELULARES DE CÁNCER CERVICOUTERINO HELA"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. SARA RODRÍGUEZ ENRÍQUEZ**:

Presidente: DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ  
Vocal: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS  
Secretario: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE  
Suplente: DR. EZEQUIEL MOISÉS FUENTES PANANÁ  
Suplente: DR. MARCO ANTONIO VELASCO VELÁZQUEZ

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

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 07 de agosto de 2019



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



**COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**UNIDAD DE POSGRADO**

Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria  
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX  
Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

# Agradecimientos Institucionales

---

## **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL), FACULTAD DE MEDICINA

## **CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT)**

Apoyo SEP-CONACyT Nos. 239930 y 283144

Apoyo Infraestructura-CONACyT No. 281428

Apoyo para el posgrado CONACyT No. de Becario: 464032

## **TUTORA PRINCIPAL Y MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

TUTORA PRINCIPAL:

Dra. Sara Rodríguez Enríquez

COMITÉ TUTOR:

Dra. Rebeca López Marure

Dra. María del Carmen Mejía Vázquez

# Agradecimientos a título personal

---

A mi familia.

A los miembros del grupo de tumores del INCICH, en especial a la Dra. Sara Rodríguez Enríquez por su ayuda y apoyo, desde antes que iniciara el posgrado hasta el día de hoy.

Al Dr. Rafael Moreno Sánchez, por sus observaciones y críticas que ayudaron al desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez, por su apoyo y guía en todo este tiempo.

A la Dra. Silvia Cecilia Pacheco Velázquez, por sus enseñanzas y *tips*.

Al departamento de Bioquímica por sus constantes y atinadas preguntas.

A **TOD@S** mis amig@s que me acompañaron y permanecieron conmigo en todo este camino, aguantando mis miles de mensajes, mis largos audios y mi intensidad (se merecen el cielo y ganar por selección natural).

Un reconocimiento especial (por orden alfabético): Abigail, Arturo, Betsy, Cristina, Daniela, Francisco, Gabriela, Georgina, Gerardo, Jesy, José, Luz, Oscar, Paola y Rosina.

A mi Casiopea (12 años juntas) y a las nuevas integrantes de la familia: Gigi y Beppo.

**“Diana: Te vas a titular, contigo, sin ti o a pesar de ti”**  
**Anónimo**

# Dedicatoria

---

**A mi familia.**

**“La emoción más antigua y más intensa de la humanidad es el miedo, y el más antiguo y más intenso de los miedos es el miedo a lo desconocido”.**  
**Howard Phillips Lovecraft**

# Índice

---

Abreviaturas	
Resumen	1
Abstract	2
<b>CAPITULO 1</b>	
Introducción	
1.1 Epidemiología del cáncer cervicouterino	3
1.2 Características moleculares de las células tumorales	4
1.3 Metabolismo energético de tumores metastásicos	5
1.4 Terapias clínicas contra el cáncer cervicouterino (CaCu)	8
1.5 Estrategias experimentales actuales contra el CaCu	10
1.6 Reposicionamiento de fármacos para disminuir el crecimiento tumoral	11
1.7 La terapia sinérgica como estrategia potencial contra tumores malignos	13
1.8 Los esferoides multicelulares tumorales como modelo de estudio	14
<b>CAPITULO 2</b>	
2.1 Justificación	18
2.2 Hipótesis	19
2.3 Objetivos	20
<b>CAPITULO 3</b>	
Metodología	
3.1 Cultivo de líneas celulares	21
3.2 Modelo del esferoide multicelular tumoral (MCTS) de HeLa	22
3.3 Determinación de los valores de las $IC_{50}$ sobre el crecimiento de los MCTS en presencia de los diferentes fármacos	22
3.4 Determinación del efecto sinérgico de los fármacos ensayados sobre el crecimiento de los MCTS de HeLa con el aditivismo tipo Bliss	24
3.5 Determinación del efecto sinérgico de los fármacos ensayados sobre el crecimiento de células no tumorales	25
3.6 Interpretación de los valores de Aditivismo Tipo Bliss e Índice de Resistencia (IR) de los modelos ensayados	25
3.7 Evaluación del efecto tóxico de la combinación de fármacos con potencia supra aditiva sobre el crecimiento de diferentes células no cancerosas: Cálculo del Índice Terapéutico (IT)	26
3.8 Análisis estadístico	27

## **CAPITULO 4**

### Resultados

4.1	Crecimiento de los MCTS de las células HeLa	28
4.2	Efecto de los NSAIDs, compuestos antimitocondriales y fármacos antineoplásicos sobre el crecimiento de los MCTS de HeLa	29
4.3	Efecto sinérgico de los NSAIDs y de CasII-gly sobre los fármacos antineoplásicos en el crecimiento de los MCTS de HeLa	30
4.4	Índice de Resistencia (IR) de las combinaciones supra aditivas de los fármacos canónicos y no canónicos sobre el crecimiento de los MCTS de HeLa	33
4.5	Efecto de los NSAIDs sobre los valores de las concentraciones inhibitorias 50 (IC <sub>50</sub> ) de los fármacos antineoplásicos canónicos en MCTS de HeLa	34
4.6	Cálculo del índice terapéutico (IT) para evaluar la toxicidad de las combinaciones supra aditivas de fármacos canónicos y no canónicos sobre el crecimiento de los MCTS de HeLa	37

## **CAPITULO 5**

### Discusión

5.1	La inhibición de la mitocondria afecta el crecimiento de los MCTS de HeLa	40
5.2	Efecto sinérgico de celecoxib, DMC y CasII-gly sobre fármacos antineoplásicos en MCTS de HeLa	42
5.3	Las combinaciones de los fármacos con efecto infra aditivo aumentaron la proliferación de la línea celular de CaCu (HeLa)	44
5.4	Efecto de las combinaciones de los fármacos con efecto supra aditivo en células no tumorales	45

## **CAPITULO 6**

6.1	Conclusión	47
-----	------------	----

## **CAPITULO 7**

7.1	Literatura citada	48
7.2	Anexo 1: Análisis de genotipificación del Instituto Nacional de Medicina Genómica	55
7.3	Tabla suplementaria 1	56
7.4	Tabla suplementaria 2	58
7.5	Figura suplementaria 1	60
7.6	Anexo 2: Publicaciones en las que colaboré durante mis estudios de maestría	61

# Abreviaturas

---

2OGDH	2 oxoglutarato deshidrogenasa
ATB	Aditivismo Tipo Bliss
ATCC	American Type Culture Collection
CaCu	Cáncer Cervicouterino
CasII-gly	Casiopeina II-gly
DMC	Dimetilcelecoxib
DMEM	Dulbecco-MEM, Dulbecco's modified Eagle's Medium
EROS	Especies Reactivas de Oxígeno
FO	Fosforilación Oxidativa
FDA	Food and Drug Administration
GCO	Global Cancer Observatory
IC <sub>50</sub>	Concentración a la cual se inhibe el 50% de la proliferación
IR	Índice de Resistencia
IT	Índice Terapéutico
MCTS	Multicellular Tumor Spheroid
NSAIDs	Non steroidal anti-inflammatory drugs
PDH	Piruvato deshidrogenasa
RF	Reposicionamiento de fármacos
SDH	Succinato deshidrogenasa
VPH	Virus del Papiloma Humano

# Resumen

---

El reposicionamiento de fármacos (el uso de fármacos específicos dirigidos contra enfermedades para los que no fueron creados originalmente) aprobado por la FDA (EUA) se ha convertido en una estrategia prometedora y alternativa para acelerar la investigación translacional contra el cáncer. En el presente trabajo, se demostró que el fármaco experimental casiopeina II-gly (CasII-gly), y algunos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDs por sus siglas en inglés) como son el celecoxib y su análogo el dimetilcelecoxib (DMC) ejercen un efecto inhibitor muy potente sobre el crecimiento de los esferoides de tumores multicelulares HeLa (MCTS), un modelo que mimetiza los estadios iniciales avasculares en el crecimiento de los tumores sólidos, cuando se administran al inicio del cultivo (llamado protocolo preventivo;  $IC_{50}$  crecimiento de  $30 \pm 7.5$ ,  $1 \pm 0.3$  y  $10 \pm 2$  nM para CasII-gly, celecoxib y DMC, respectivamente) o una vez que los MCTS se formaron (llamado protocolo curativo;  $IC_{50}$  crecimiento de  $106 \pm 2$ ,  $7.5 \pm 2$  y  $32 \pm 10$   $\mu$ M para CasII-gly, celecoxib y DMC, respectivamente). Aplicando dos aproximaciones matemáticas: el modelo de aditivismo tipo Bliss (ATB) y el índice de resistencia (IR), se encontró que a concentraciones sub- $IC_{50}$  del celecoxib y del DMC aumentaron la eficiencia (inhibiendo el crecimiento tumoral), de cisplatino, paclitaxel y doxorubicina en un 80-96%, 70-90% y 20-60%, respectivamente, aumentando su toxicidad sobre la proliferación de los MCTS de HeLa al inicio del crecimiento del esferoide o una vez que se formó. Los resultados obtenidos indican que la terapia con inhibidores mitocondriales como los NSAIDS en combinación con los fármacos canónicos (cisplatino) utilizados en la clínica pueden ser alternativas efectivas para el tratamiento del cáncer cervicouterino.

# Abstract

---

Repurposing of existing USA-FDA approved drugs has emerged as a promising and alternative strategy to accelerate anti-cancer translational research. In the present study, it is shown that casiopeina II-gly (CasII-gly), the NSAIDs celecoxib and its analogue dimethylcelecoxib (DMC) exert a highly potent anti-growth effect on HeLa multi-cellular tumor spheroids (MCTS; a model that mimics the initial avascular stages of solid tumor growth), when added either at the beginning ("preventive protocol";  $IC_{50}$  of  $30 \pm 7.5$ ,  $1 \pm 0.3$  and  $10 \pm 2$  nM for CasII-gly, celecoxib and DMC, respectively) or after spheroid formation ("curative protocol";  $IC_{50}$  of  $106 \pm 2$ ,  $7.5 \pm 2$  and  $32 \pm 10$   $\mu$ M for CasII-gly, celecoxib and DMC, respectively). Using two drug combination screening assays for synergism identification, the Bliss-type additivity model (ATB) and the resistance index (IR) value, we identified that sub- $IC_{50}$  doses of celecoxib and DMC increased the potency (inhibits tumor growth) of cisplatin, paclitaxel and doxorubicin by 20-90%, 70-90% and 20-60%, respectively. Celecoxib increased cisplatin toxicity by 80-90%. These results indicated that antimetabolic drugs as celecoxib in combination with canonical anti-cancer drugs (cisplatin) may be effective alternatives for cancer treatment.

# CAPÍTULO 1

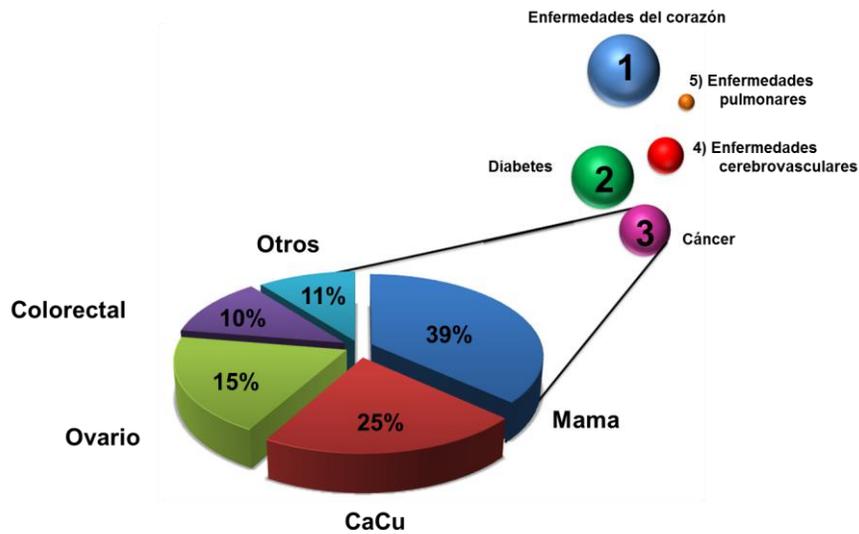
---

## Introducción

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracteriza por un aumento en la velocidad de proliferación celular mediada en parte por (1) un aumento en la expresión de factores de transcripción involucrados en el ciclo celular como: *NRF2*, *SOX4* o *PGC1 $\alpha$*  [Karin et al., 2016; Tan et al., 2016], (2) la sobre-expresión de oncogenes como *C-MYC*, *H-RAS* Y *K-RAS* [Vogelstein et al., 2004],(3) la disminución de genes supresores de tumor (*p53*, *PTEN*, *RB*, *INK4*), [Geoffrey et al., 2000; Aschauer et al., 2016] y (4) los efectos del microambiente tumoral (activación de fibroblastos, presencia de células pro-inflamatorias del sistema inmune, citocinas, factores de crecimiento y hormonas) [Beger et al., 2001; Siami et al., 2007; Chan et al., 2008; Zhao et al., 2008], lo cual desencadena una transformación celular, iniciando procesos de metástasis (procesos de invasión a órganos distantes en el cuerpo) [Narumiya et al., 2009; Hellquist et al., 2016].

## 1.1 Epidemiología de cáncer cervicouterino

En el 2016, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportó que la tercera causa de muerte en el país con 42,062 defunciones por año corresponde al cáncer. De ellos, el cáncer cervicouterino (CaCu) ocupa el segundo lugar de incidencia en mujeres después del de mama sobre todo en mujeres en edad reproductiva (Figura 1) [INEGI, 2016; GCO, 2018].



**Figura 1.** Causas principales de mortalidad en la población femenina mexicana en el 2016. Cada esfera de color representa las principales enfermedades en mujeres en edad reproductiva. El diagrama de pastel representa los principales tipos de cánceres en estas mujeres así como sus porcentajes de mortalidad [INEGI, 2016; GCO, 2018].

## 1.2 Características moleculares de las células tumorales

Las células cancerosas tienen características distintivas consideradas como firmas moleculares que no se expresan o no se encuentran tan enriquecidas en su tejido de origen (Figura 2) [Hanahan y Weinberg, 2011].



**Figura 2.** Características moleculares de las células cancerosas [modificado de Hanahan y Weinberg, 2011].

Además de estas firmas moleculares, la línea celular de CaCu, HeLa, se distingue por no expresar a la proteína p53 debido a que es continuamente degradada por la presencia del oncogen E6 del virus del papiloma humano [Thomas et al., 1999]. Interesantemente, la ausencia de la proteína p53 correlaciona con un aumento en (1) la incidencia de mutaciones en el ADN de la célula tumoral [Burns et al., 1993]; (2) la reprogramación celular y expresión de bombas de expulsión de fármacos y (3) un aumento substancial en la función mitocondrial [Hernández-Reséndiz et al., 2015]; todas ellas relacionadas con la aceleración del crecimiento tumoral y metástasis [Wawryk-Gawda et al., 2013; Hernández-Reséndiz et al., 2015].

### **1.3 Metabolismo energético de tumores metastásicos**

En 1956, Otto Warburg demostró que los tumores malignos mantienen una glucólisis acelerada (10 a 15 veces) comparada con las células normales [Warburg, 1956]. De lo anterior se hipotetizó que la aceleración de la glucólisis sostenía el suministro del ATP requerido para que la célula cancerosa realizara sus funciones celulares debido a una supuesta disfuncionalidad mitocondrial. Sin embargo, en los últimos años nuestro grupo de investigación y otros demostraron que la mitocondria es funcional en diversas líneas celulares tumorales, metastásicas y poco metastásicas [Zu y Guppy, 2004; Brandon et al., 2006; Marín-Hernández et al., 2006; Moreno-Sánchez et al., 2007; Rodríguez-Enríquez et al., 2009; Pacheco-Velázquez et al., 2018] y suministra el ATP requerido para procesos de metástasis y proliferación celular [Pacheco-Velázquez et al. 2018]. HeLa es una línea celular de origen epitelial, grado IV, altamente metastásica de cérvix que depende principalmente de la FO (fosforilación oxidativa) para la síntesis de ATP (>80%) en cultivos bidimensionales y en condiciones de normoxia (21% O<sub>2</sub>) [Rodríguez-Enríquez et al., 2010]. En modelos más fisiológicos como el de los esferoides multicelulares de HeLa (MCTS, por sus siglas en inglés: *multicellular tumor spheroid*), la proliferación y crecimiento inicial del esferoide depende principalmente de la FO (60% de la contribución de ATP). Por el contrario, en etapas avanzadas de crecimiento (cuando el MCTS alcanza un diámetro mayor a

500  $\mu\text{m}$  y genera un centro necro-apoptótico) la glucólisis es la que abastece mayormente la demanda de ATP (80%). Sin embargo, a pesar de que los MCTS ya maduros dependen más de la glucólisis, el crecimiento tumoral no se inhibe en su totalidad con inhibidores glucolíticos clásicos (gospol o 2-desoxiglucosa), 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]. Otras líneas transformadas y tumorales como: HEK-293 (células epiteliales embrionarias de riñón transformadas) y MCF7 (cáncer de mama, estadio 3) en cultivos bi, tridimensionales o modelos *in vivo* también dependen de la FO y de la glucólisis para su crecimiento (Tabla 1) [Rodríguez-Enríquez et al., 2008; Rodríguez-Enríquez et al., 2010].

**Tabla 1.** Aporte de ATP de la glucólisis y fosforilación oxidativa (FO) en diferentes tipos de células cancerosas

Célula tumoral/tejido	Aporte de ATP%		
	Glucólisis	FO	
<b>Monocapa</b>			
HeLa	Cáncer cervicouterino	21	79
HeLa-p53	sobreexpresión de p53wt	18	82
HeLa-p53R248Q	sobreexpresión de p53mutado (R248Q)	74	26
HEK-293	Células epiteliales embrionarias de riñón transformadas	14	82
MCF7	Cáncer de mama (ER+)	40	60
MDA-MB 231	Triple negativo	30	70
MDA-MB-468		65	35
<b>MCTS</b>			
HeLa	Jóvenes	37	63
	Maduros	83	17
HEK-293	Jóvenes	42	58
	Maduros	80	20
MCF7	Maduros	7	93
<b>Modelo <i>in vivo</i></b>			
Sarcoma 37	Ascitis de rata	32	68
AS-30D	Hepatocarcinoma de rata	2	98
Fibrosarcoma 1929	Fibrosarcoma de ratón	0.31	99.69
Neuroblastoma	Células transformadas de ratón	29	71
Tumor de Ovario		3.1	96.99
Tiroides	Carcinoma de rata	4	96
Pulmón		5.3	94.7
Melanoma	Melanoma de ratón	3.3	96.7

MCTS, esferoides multicelulares tumorales. Los MCTS jóvenes tienen un diámetro <500  $\mu\text{m}$  mientras que los MCTS maduros su tamaño es >500  $\mu\text{m}$ . Modificado de *Zu y Guppy, 2004* y *Moreno-Sánchez et al., 2014*.

#### **1.4 Terapias clínicas contra el Cáncer Cervicouterino (CaCu)**

En la clínica, la terapia dirigida contra el CaCu depende de su estadio de malignidad (Tabla 2). En las primeras etapas del desarrollo del CaCu, los tratamientos clínicos más utilizados son la cirugía (histerectomía, extracción quirúrgica del tejido canceroso y parte del tejido adyacente) y la radioterapia. Por el contrario, en los estadios avanzados se utiliza la cirugía para la reducción del tamaño del tumor seguido de quimioterapia con cisplatino (generador de aductos en el ADN), paclitaxel (inhibidor de la despolimerización de la tubulina), gemcitabina (inhibidor en la fase G1/S del ciclo celular) y topotecan (inhibidor de la topoisomerasa I) (Tabla 2). Sin embargo, el uso de estos compuestos acarrea numerosos efectos adversos en el paciente como son la náusea, vómito, daño permanente en diferentes órganos, inducción de 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]. Además, los pacientes desarrollan resistencia a los fármacos del tratamiento aumentando la expresión de la glicoproteína P, que es una bomba aniónica encargada de la expulsión masiva de drogas y/o compuestos químicos del citosol al espacio extracelular [Cerezo et al., 2012]. En consecuencia, se desarrolla una resistencia a los fármacos y una recurrencia del cáncer [Dhanalakshmi et al., 2003] por lo tanto, la búsqueda de nuevos fármacos selectivos contra el tumor resulta un tópico de interés en el campo clínico [Martínez-Outschoorn et al., 2016].

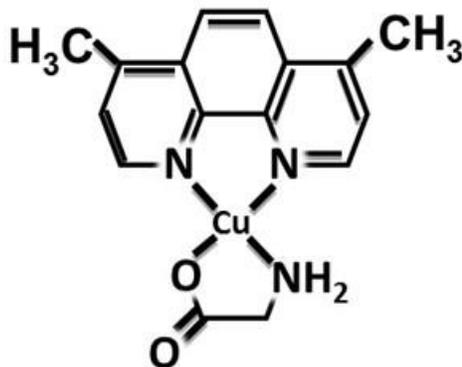
**Tabla 2.** Tratamientos usados actualmente en la clínica en las diferentes etapas de desarrollo del CaCu

Etapa	Estadio	Descripción	Tratamiento	Efectos secundarios	Recurrencia
I	A	Tumor confinado al cuello uterino < 7 mm	Histerectomía y RT 45 Gy	Fatiga, inflamación, alopecia.	10% después de 1 año de tratamiento
	B	Tumor confinado en el cérvix ≤ 4 cm	Histerectomía, RT: 65 – 75 Gy		
II	A	Tumor con invasión parametrial	Gemcitabina 125 mg/m <sup>2</sup> + cisplatino 40 mg/m <sup>2</sup> RT 40 – 45 Gy	Fiebre neutropénica trastornos cardiacos, neurotoxicidad, polineuropatía, insuficiencia renal, hiperpigmentación cutánea, disminución en el número de plaquetas, queratoplastia, neuritis óptica bilateral.	33% después de 1 año de tratamiento
	B	Tumor que ocupa 1/3 de la vagina.	Gemcitabina 100 mg/m <sup>2</sup> + cisplatino 50 mg/m <sup>2</sup>		
III	A	El tumor involucra el tercio inferior de la vagina.	Cisplatino 40 mg/m <sup>2</sup> + paclitaxel 1 mg/m <sup>2</sup> .RT 80 Gy	Fiebre neutropénica trastornos cardiacos, neurotoxicidad, polineuropatía, insuficiencia renal, hiperpigmentación cutánea, disminución en el número de plaquetas, queratoplastia, neuritis óptica bilateral.	20 – 50% después de 5 años de tratamiento
	B	Tumor se extiende a la pared pélvica.			
IV	A	El tumor invade a la vagina o recto y se extiende más allá de la pelvis.	Cisplatino 50 mg/m <sup>2</sup> + paclitaxel 135 mg/m <sup>2</sup>	Fiebre neutropénica trastornos cardiacos, neurotoxicidad, polineuropatía, insuficiencia renal, hiperpigmentación cutánea, disminución en el número de plaquetas, queratoplastia, neuritis óptica bilateral.	20 – 50% después de 5 años de tratamiento
	B	Metástasis a distancia (Recto ó ganglios)	Cisplatino 50 mg/m <sup>2</sup> + topotecan 0.75 mg/m <sup>2</sup>		

Después de la histerectomía, al paciente se le administra un tratamiento de radioterapia más quimioterapia por 3 semanas. RT, radioterapia. 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*.

## 1.5 Estrategias experimentales actuales contra el CaCu

Actualmente se han propuesto nuevos compuestos experimentales con mayor potencia contra una célula tumoral y con baja o nula toxicidad sobre la célula sana o del hospedero [Dhanalakshmi et al., 2003] para evitar la reincidencia del CaCu y los efectos secundarios de la quimioterapia. Entre estos, destaca la casiopeina II gly (CasII-gly, Cu (4,7-dimetil-1, 10 –fenantrolina-glicina NO<sub>3</sub>) (Figura 3) un compuesto sintetizado recientemente por la Dra. Lena Ruiz en la facultad de Química de la UNAM. La CasII-gly tiene un centro metálico de cobre, dos ligantes de tipo imina (N-N) que reaccionan con el ADN y un aminoácido glicina que interviene en la estabilización de la molécula. Este compuesto a concentraciones de 1-10 µM disminuye la velocidad de proliferación de diferentes tipos de tumores humanos y de roedor (HeLa, MCF7, C6, A549, H157) [Trejo-Solís et al., 2005; Rodríguez-Enríquez et al., 2006; Mandujano-Tinoco et al., 2013]. Aunque mantiene alta efectividad contra las células cancerosas, la CasII-gly es altamente cardiopélica [Hernández-Esquivel et al., 2006] limitando su uso en el sector clínico. Por lo tanto, surgen nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer como el reposicionamiento de fármacos (RF).



**Figura 3.** Estructura química de la casiopeina II-gly

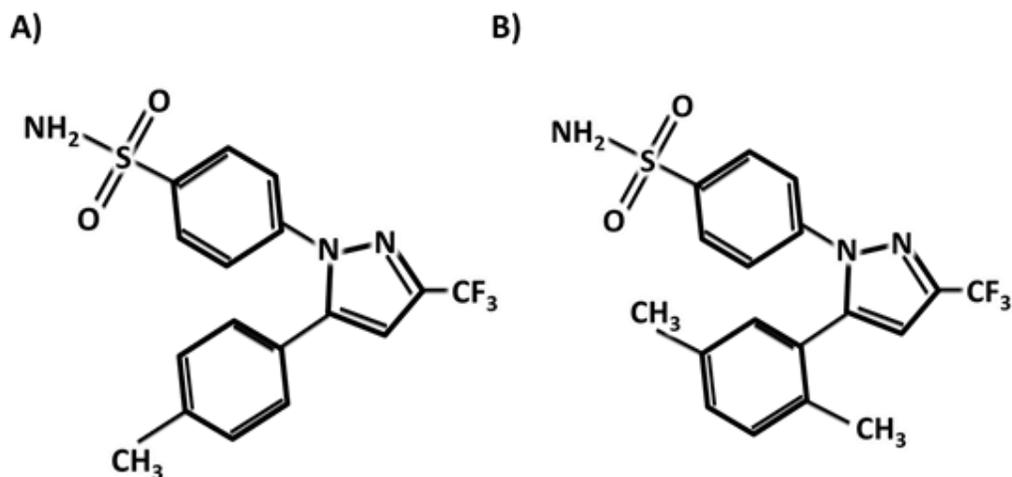
## 1.6 Reposicionamiento de fármacos para disminuir el crecimiento tumoral

Se estima que hasta la fecha se han sintetizado 5 millones de compuestos que disminuyen el crecimiento tumoral [NCI, 2018]. Sin embargo, la gran mayoría son compuestos que se encuentran en fase experimental y por lo tanto, permanecen sin la aprobación de la FDA. Además sus efectos adversos no han sido completamente evaluados en células sanas. Por lo tanto, para resolver estas complicaciones, surgen nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer como el reposicionamiento de fármacos (RF) en el cual, fármacos dirigidos contra una enfermedad específica son utilizados contra otras enfermedades para los cuales no fueron diseñados [Sekhon, 2013]. El RF tiene como ventaja que el fármaco ya fue aprobado por la FDA, sus efectos sobre las diferentes fases de tratamiento ya son conocidas [Novac, 2013; Brown y Patel., 2017]. Esta estrategia ha sido utilizada contra enfermedades infecciosas como la candidiasis [Borisy et al., 2003], donde se demostró que la combinación de pentamidina (un fungistático canónico contra *Cándida*) y fenazopiridina (analgésico vs. infecciones del tracto urinario) suprimió la proliferación celular y formación de colonias más del 95% comparado con *Cándida* expuesta a cada fármaco por separado (el tratamiento con sólo pentamidina o fenazopiridina suprimió la candidiasis menos del 60% en cada caso).

Con respecto al cáncer, se ha documentado que el antiinflamatorio no esteroideo (NSAID por sus siglas en inglés) celecoxib utilizado como fármaco de última generación contra el dolor, fiebre, inflamación y enfermedades reumáticas [McCormack, 2011], disminuye el crecimiento del cáncer de colon (Caco-2, SW-480 y HT29) [Lev-Ari et al., 2005] con concentraciones inhibitorias 50 (IC<sub>50</sub>) en el rango micromolar (20, 34 y 55  $\mu$ M, respectivamente). En otros tipos de células de cáncer como cérvix (SiHa), de piel (A431), de útero (SW962) y de hueso (MG63), el celecoxib (15  $\mu$ M) solo inhibió el crecimiento tumoral en un 25%. Sin embargo, al combinarlo con bajas dosis de cisplatino (5–20  $\mu$ M) la proliferación tumoral disminuyó del 50 al 85%. En monoterapia, el cisplatino solo inhibió el 10% [Lev-Ari et al., 2005; Liu et al., 2017]. Entre los mecanismos propuestos para explicar la inhibición de la proliferación tumoral por celecoxib se encuentra: (1) la posible

activación de la vía de señalización PI3K/Akt, que a su vez activa la apoptosis mitocondrial [Kuhar et al., 2007; Kim et al., 2009; Liu, et al., 2017]; (2) la inhibición de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) cuya sobreexpresión está ligada a un aumento en la proliferación celular, citotoxicidad y al desarrollo de un fenotipo metastásico [Tsuji et al., 1997] y (3) la activación directa de las caspasas 3 y 9 de la vía de apoptosis intrínseca [Ralph et al., 2015]. Recientemente nuestro grupo de trabajo en colaboración con el Dr. Steve Ralph de la Griffith University en Australia hemos encontrado que el celecoxib (20-200  $\mu\text{M}$ ) disminuye el flujo de fosforilación oxidativa en células de cáncer de cérvix (HeLa) y mama (MCF7, MDA MB 231 y MDA MB 468) actuando como un inhibidor de la cadena transportadora de electrones y abatiendo el potencial eléctrico transmembranal mitocondrial [Pritchard et al., 2018].

Un análogo de celecoxib, el 2,5-dimetil celecoxib (DMC) (Figura 4) también ha demostrado tener un efecto antitumoral potente contra varios cánceres malignos (linfoma de Burkitt, mieloma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinomas gástricos, mamarios y de colon) con valores de  $\text{IC}_{50}$  que oscilan entre 30-55  $\mu\text{M}$  [Backhus et al., 2005; Kardosh et al., 2005a; Kardosh et al., 2005b; Cianchi et al., 2006; Dai et al., 2012; Zhang et al., 2016]. A las mismas dosis a las que inhibe el crecimiento, el DMC también disminuyó la FO (60%) y a dosis menores (5-10  $\mu\text{M}$ ) el potencial transmembranal mitocondrial (40%) [Pritchard et al., 2018]. Estas observaciones indican que el efecto inhibitor del DMC sobre la proliferación tumoral puede ser a través de la inhibición de la función mitocondrial, sin embargo este fármaco es experimental ya que no se encuentra aprobado por la FDA.



**Figura 4.** Estructura química de los fármacos NSAIDs celecoxib (A) y dimetilcelecoxib (DMC) (B).

Aunque el celecoxib y el DMC pudieran ser considerados como antineoplásicos potentes contra el cáncer [Kuhar et al., 2007; Kim et al., 2009; Liu, et al., 2017] ambos afectan la función cardíaca [Howes et al., 2007]. Por lo tanto, para contrarrestar los efectos nocivos de este tipo de fármacos prometedores, se ha propuesto la llamada “terapia sinérgica” que se describe a continuación.

### 1.7 La terapia sinérgica como estrategia potencial contra tumores malignos

Los efectos secundarios que presenta un fármaco se relacionan con el tiempo de exposición y las concentraciones intracelulares que alcanza [Ambili, 2012]. El desarrollo de estrategias que incluye la aplicación conjunta de dos fármacos a bajas dosis para promover su potenciación con nulo efecto tóxico sobre una célula normal, ha sido un tema de debate en los últimos años [Jonhson et al., 2001; Tallarida, 2001; Kaelin et al., 2005; Keith et al., 2005]. En esta aproximación llamada “terapia sinérgica” ambos fármacos deben usarse en dosis sub-IC<sub>50</sub> [Borisy et al., 2003; Fouquier y Guedj, 2015] para disminuir los posibles efectos tóxicos en células sanas. El desarrollo de modelos matemáticos para describir si la combinación de dos fármacos promueve o no el efecto sinérgico de alguno de ellos ha contribuido importantemente en la selección de la terapia combinatoria apropiada para cada tipo de cáncer [Lehárd et al., 2009; Fouquier y

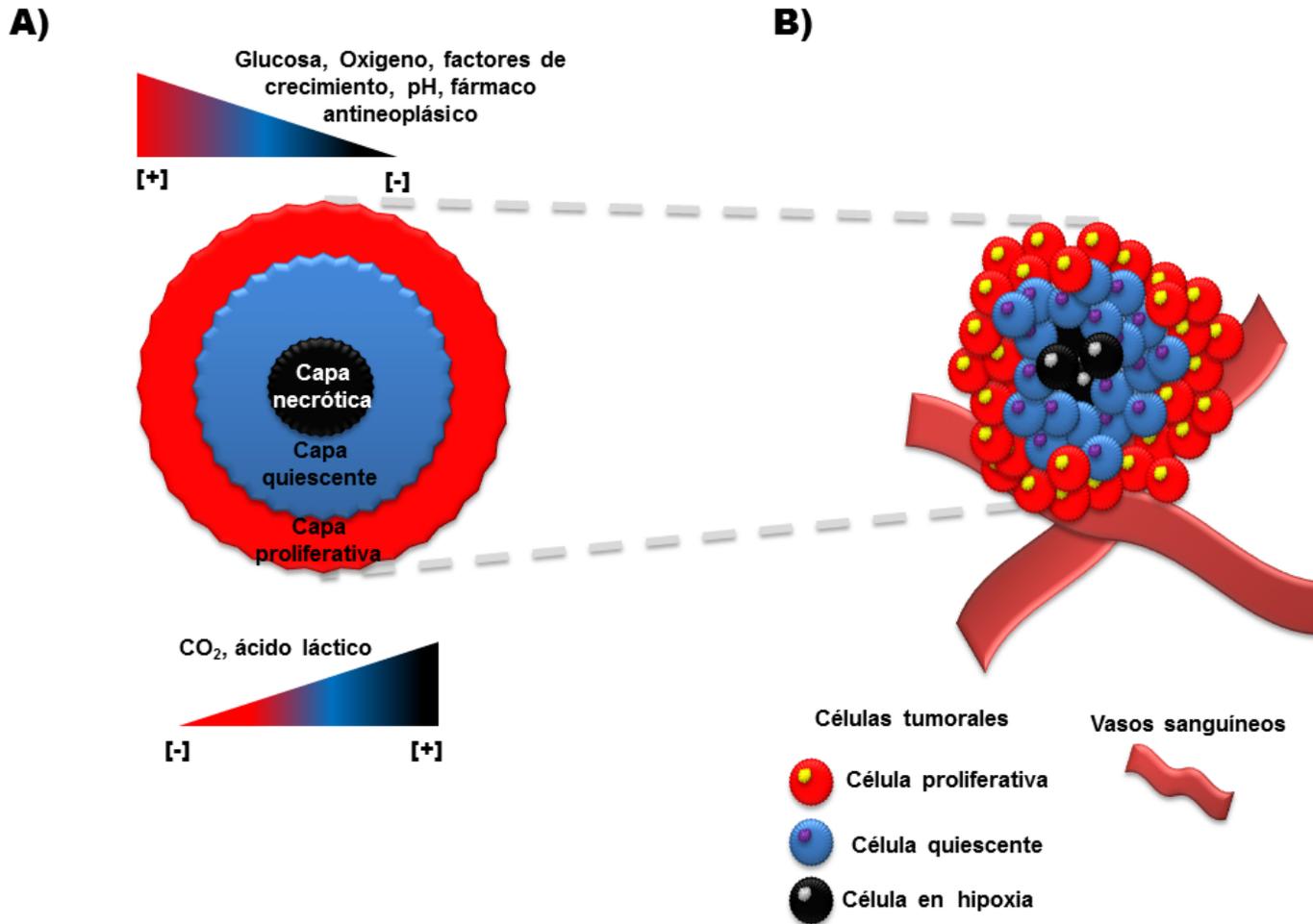
Guedj, 2015]. De éstos, los modelos que describen el aditivismo tipo Bliss (ATB) y el índice de resistencia (IR) son los más utilizados [Borisy et al., 2003; Fouquier y Guedj, 2015; Valencia-Cervantes et al., 2019] y reproducibles [Pikman et al., 2017]. El empleo de ambos modelos puede evidenciar los efectos sinérgicos de algunos fármacos de reposicionamiento (inhibiendo el crecimiento tumoral) sobre algunos fármacos anticancerígenos para ser empleados en pacientes con cáncer sin efectos adversos [Pikman et al., 2017].

Diferentes esquemas de tratamiento clínico que contemplan la combinación de cisplatino y paclitaxel son aplicados comúnmente contra el CaCu. Sin embargo, el tumor reincide en corto tiempo (10 meses) además de que el paciente presenta fiebre, dolor abdominal, o gastritis disminuyendo su calidad de vida [Ambili, 2012]. Por ello, se avanza en la implementación de la terapia sinérgica combinando diferentes tipos de fármacos para encontrar la combinación óptima tóxica contra el cáncer. Existen numerosos estudios donde se aplica esta aproximación para disminuir la proliferación tumoral. Sin embargo, en muy pocos se analiza en paralelo el efecto de la combinación de los fármacos en células no cancerosas. Por ejemplo, la combinación de celecoxib con algunos compuestos experimentales como el PD184161 o ZD6474 disminuyó significativamente la proliferación de células de osteosarcoma y melanoma [Liu et al., 2017; Deng et al., 2017; Gowda et al., 2017] pero se desconoce si esta combinación no afecta a las células no tumorales del paciente.

### **1.8 Los esferoides multicelulares tumorales como modelo de estudio**

La mayoría de los estudios toxicológicos que contemplan la combinación de fármacos se realiza en protocolos ya establecidos utilizando modelos de células cultivadas bidimensionalmente *in vitro*, así como una exposición controlada del fármaco por 24 h [Liu et al., 2017; Deng et al., 2017; Gowda et al., 2017]. Sin embargo, el cultivo bidimensional no mimetiza la fisiología de un tumor sólido *in vivo* [Li et al., 2008]. Por ello, el análisis toxicológico debe implementarse en modelos cuyo comportamiento se asemeje a lo que sucede en un tumor *in vivo*. Uno de estos modelos son los MCTS, que mimetizan los estadios iniciales

avasculares en la formación de un tumor sólido [Kunz-Schughart et al., 1998] (Figura 5). Los MCTS desarrollan gradientes de nutrientes (principalmente glucosa) y oxígeno así como variaciones en el pH desde la periferia hasta el centro del esferoide [Kunz-Schughart et al., 1998; Vaupel et al., 1981] y se distinguen 3 capas celulares metabólicamente diferentes dependiendo de la concentración de oxígeno y nutrientes disponibles. La capa interna constituye un centro con células en necrosis/apoptosis, la segunda capa está constituida por células con baja capacidad duplicativa y baja tasa metabólica y la tercer capa está constituida por células muy proliferativas y con alta tasa metabólica (Figura 5A) [Walenta et al., 2002; Rodríguez-Enríquez et al., 2008; Mandujano-Tinoco et al., 2013]. Debido a que la capa externa del esferoide está en contacto con el medio donde se encuentra alta concentración de oxígeno y nutrientes, se les ha comparado con las células tumorales cercanas (100-150  $\mu\text{m}$ ) a los vasos sanguíneos [Desoize et al., 2008]; por el contrario, las capas quiescentes son metabólicamente parecidas a las células tumorales alejadas (200  $\mu\text{m}$ ) de los vasos sanguíneos. La formación de vasos sanguíneos no organizados y frágiles promueve un flujo sanguíneo intermitente que está relacionado con la respuesta metabólica de cada capa celular. En las células de la periferia coexiste un ambiente normóxico (31 a 86  $\mu\text{M}$   $\text{O}_2$  disuelto) e hiperglucémico (5-10 mM de glucosa), la cual es alta comparada con las células en capa media o interna que se encuentra en un ambiente hipóxico con baja concentración de oxígeno (3-13  $\mu\text{M}$  de  $\text{O}_2$  disuelto) y glucosa (0.5–2.5 mM) [Vaupel et al., 1989; Tamulevicius y Streffer, 1995; Höckel y Vaupel, 2001; Hirayama et al., 2009].



**Figura 5.** Esferoides multicelulares tumorales (MCTS). A) Modelo tridimensional donde se observan 3 capas metabólicamente diferentes. (B) similitud del MCTS con células tumorales cercanas y lejanas a un vaso sanguíneo.

Nuestro grupo de investigación reportó en el 2006 que los MCTS del cáncer de cérvix (HeLa) mantienen una dependencia por parte de la mitocondria en el aporte de ATP [Rodríguez-Enríquez et al., 2006]. Así, los esferoides en crecimiento con un diámetro máximo de 500  $\mu\text{m}$  dependen principalmente de la FO (60%). Por el contrario, una vez que el esferoide alcanza un tamaño mayor a los 500  $\mu\text{m}$  (diámetro de 1200  $\mu\text{m}$ ) y genera un centro necrótico, la glucólisis es la que abastece mayormente la demanda de ATP (80%). Sin embargo, a pesar de que los MCTS maduros dependen principalmente de la glucólisis, el empleo de inhibidores glucolíticos como gossipol (inhibidor de GAPDH, con una  $\text{IC}_{50}$  70 $\mu\text{M}$ ) [Weiner, et al., 1996] o la 2-desoxiglucosa (análogo de la glucosa que inhibe a las enzimas HK y HPI) [Zhong et al., 2009] no afectó importantemente la proliferación tumoral 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].

Desde el punto de vista farmacológico, la respuesta de los MCTS a varios fármacos es semejante a la evaluada en los tumores sólidos de los pacientes, que la observada en cultivos bidimensionales (cultivo usado en la mayoría de los estudios toxicológicos) [Hermann et al., 2008; Dufau et al., 2012]. Esto se debe a la expresión de la glicoproteína P (proteína encargada de la expulsión de los fármacos antineoplásicos) cuya expresión es significativamente más baja en los MCTS que en los cultivos bidimensionales [Wartenberg et al., 1999; Michinton y Tannock, 2006]. La inhibición de la mitocondria podría tener una repercusión en los tejidos altamente aeróbicos como corazón o cerebro, el uso de compuestos altamente especializados a bajas dosis no afectaría los tejidos y órganos sanos.

# CAPÍTULO 2

---

## 2.1 Justificación

Las terapias clínicas actuales contra el CaCu (cisplatino, doxorubicina, o gemcitabina) tienen efectos adversos en los pacientes. La vía energética de las células tumorales puede ser un blanco potencial terapéutico contra el CaCu debido a que la mitocondria es funcional y provee del 20-80% del ATP. El uso de fármacos ya utilizados en la clínica como el celecoxib que afectan esta vía de aporte de ATP podría ser un potencial tratamiento contra el cáncer.

## 2.2 Hipótesis

La terapia sinérgica aplicando fármacos dirigidos a diferentes vías importantes del tumor (*i.e.*, la mitocondria y las vía de proliferación canónicas) a dosis por debajo de su IC<sub>50</sub> de proliferación abatirá el crecimiento del cáncer CaCu.

## 2.3 Objetivos

### *Objetivo General*

Evaluar el efecto sinérgico del celecoxib, el DMC así como un compuesto antimitocondrial como CasII-gly con los fármacos antineoplásicos utilizados en la clínica en cultivos tridimensionales de la línea celular HeLa.

### *Objetivos Particulares*

1. Determinar la concentración inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ ) de los fármacos anti-mitocondriales y antineoplásicos sobre el crecimiento de los MCTS de HeLa.
2. Evaluar la combinación celecoxib, DMC y CasII-gly con los diferentes fármacos antineoplásicos sobre el crecimiento de los MCTS de HeLa.
3. Evaluar el efecto tóxico de las combinaciones de los fármacos con efecto supra aditivo en células no tumorales.

# CAPÍTULO 3

---

## Metodología

### 3.1 Cultivo de líneas celulares

La línea cancerosa HeLa (cáncer de cérvix humano estadio IV y metastásica) y no cancerosa 3T3 (fibroblastos de ratón) fueron obtenidas de la ATCC (American Type Culture Collection). El análisis de genotipificación del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) reveló que HeLa comparte los alelos respectivos reportados por la ATCC para la autenticación de la misma (Anexo 1).

Las células HeLa se cultivaron en 20 mL de Dulbecco-MEM, Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, número de catálogo: D5648; Sigma, MO, USA) que contiene glucosa 25 mM, bicarbonato de sodio 44 mM, HEPES (2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazina-1-yl] ácido etanosulfónico) 23 mM, piruvato de sodio 1 mM y glutamina 4 mM, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 10,000 unidades de penicilina en placas de cultivo celular 150x20 mm (SARSTEDT, Nümbrecht, Alemania) a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire.

Una vez que alcanzaron una confluencia del 80%, las células se lavaron con buffer de fosfatos PBS (por sus siglas en inglés de Phosphate Buffered Saline) pH 7.2 y se incubaron con 3 mL de tripsina/EDTA (0.25%) por 3 min. Posteriormente se añadió PBS fresco para neutralizar el efecto de la tripsina/EDTA y las células se cosecharon y centrifugaron a 2200 rpm. El botón celular se diluyó en 1 mL de DMEM. El número de células se cuantificó con una cámara de Neubauer reticulada en un microscopio invertido marca Zeiss (Thornwood, NY) y la viabilidad se determinó colorimétricamente con azul de tripano (1%) por espectrometría (la una longitud de onda de 595 nm). Este ensayo reveló que las células utilizadas para cada experimento planteado mantenían una viabilidad mayor al 90% [Rodríguez-Enríquez et al., 2008].

### **3.2 Modelo del esferoide multicelular tumoral (MCTS) de HeLa**

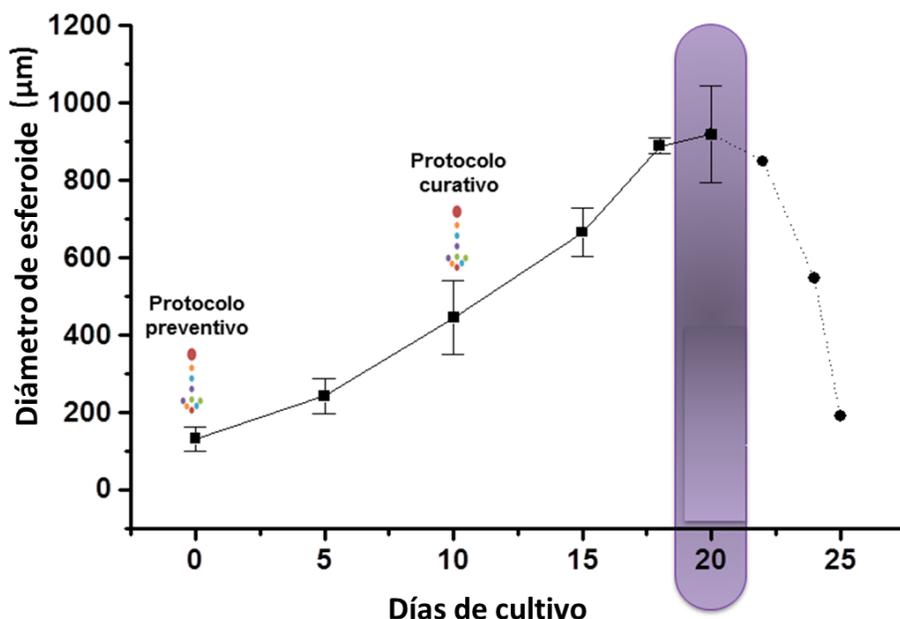
Los esferoides se formaron utilizando la técnica modificada de líquido sobrelapante [Kunz-Schughart et al., 1998] en la cual, las células de HeLa (20,000 células/mL) se sembraron en 5 mL de medio DMEM en cajas de Petri 60x15 mm (SARSTEDT) pre-cubiertas con agarosa al 2% (w/v) [Rodríguez-Enríquez et al., 2008]. La formación inicial del cúmulo de células se realizó en condiciones estáticas por 5 días. Posteriormente, las células se agitaron orbitalmente a una velocidad constante (20-50 rpm) durante 25 días en un agitador orbital dentro de una incubadora a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire. El medio de cultivo viejo se reemplazó por medio DMEM fresco cada tercer día para evitar la acumulación de células muertas. La proliferación de los MCTS se evaluó midiendo el diámetro de los esferoides diariamente por 25 días totales utilizando una retícula graduada (1/10 mm) en un microscopio invertido marca Zeiss.

### **3.3 Determinación de los valores de la IC<sub>50</sub> sobre el crecimiento de los MCTS en presencia de los diferentes fármacos**

Los fármacos celecoxib, DMC, cisplatino, doxorubicina, gemcitabina, ciclofosfamida y paclitaxel fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). La CasII-gly fue sintetizada por la Dra. Lena Ruiz de la Facultad de Química de la UNAM. Todos los fármacos ensayados se diluyeron en una mezcla de etanol/DMSO (70/30% v/v) excepto cisplatino, doxorubicina y CasII-gly que se disolvieron en agua bidestilada. La máxima cantidad de volumen de etanol/DMSO añadido a cada ensayo fue menor del 1% del volumen total del pozo. Esta concentración no afectó la viabilidad (>95%).

El efecto de los diferentes fármacos ensayados se determinó en esferoides cultivados en cajas de petri pre-cubiertas con agarosa [Rodríguez-Enríquez et al., 2008] utilizando dos estrategias experimentales dependiendo del tiempo en el que el fármaco se añadió al medio de cultivo (Tabla 3):

A) *Protocolo preventivo*, cuando el fármaco se añadió al inicio del cultivo ( $t=0$ ) y B) *protocolo curativo*, cuando el fármaco se añadió en la fase de crecimiento exponencial del MCTS (Figura 6). Los fármacos utilizados se enlistan en la tabla 3 donde se indica su blanco terapéutico y a las concentraciones utilizadas en este estudio. Los cambios en el diámetro del esferoide en ausencia y presencia de los fármacos se midieron con una retícula graduada (1/10 mm) en un microscopio invertido marca Zeiss. El análisis de crecimiento de los MCTS se realizó utilizando el software Origin 8 (Northampton MA, EUA). Cada curva de crecimiento se ajustó a un modelo matemático [Foucquier y Guedj, 2015] comúnmente utilizado para modelar el efecto de cada fármaco en experimentos de “dosis-respuesta”.



**Figura 6.** Curva de crecimiento de los esferoides de HeLa que muestra el tiempo en el que se añadió el fármaco en los protocolos preventivo y curativo. Cada punto representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de 30 esferoides medidos en 3 cultivos independientes ( $n=3$ ). La barra morada representa el día máximo de cultivo y el tiempo en el que se seleccionaron los esferoides para su análisis.

**Tabla 3.** Concentraciones de fármacos utilizados en los esferoides multicelulares en protocolo preventivo y curativo.

Fármacos	Blanco	Concentraciones Protocolo	
		Preventivo	Curativo
Celecoxib	Inhibidor de COX-2 y del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial		0.1, 1, 10, 100 $\mu$ M
DMC		0.01, 0.1, 1, 10,	0.1 1, 10, 50 $\mu$ M
<i>Antimitocondriales</i>		100 nM	
CasII-gly	Inhibidor de 2OGDH, PDH y SDH		1, 10, 100, 200 $\mu$ M
<i>Canonicos</i>			
Cisplatino	DNA (alquilante)		
Paclitaxel	Disfunción en el ensamblaje de los microtubulos		
Doxorrubicina	Inhibidor de la topoisomerasa II	0.01, 0.1, 1, 10,	1, 10, 100, 500
Gemcitabina	Análogo de pirimidinas	100, 200 nM	$\mu$ M
Ciclofosfamida	DNA (alquilante)		
Carboplatino			

Abreviaciones: 2OGDH, 2-oxoglutarato deshidrogenasa; COX-2, ciclooxigenasa isoforma 2; PDH, piruvato deshidrogenasa; SDH, succinato deshidrogenasa

### 3.4 Determinación del efecto sinérgico de los fármacos ensayados sobre el crecimiento de los MCTS de HeLa con el aditivismo tipo Bliss

Para evaluar el efecto sinérgico de los diferentes fármacos, se eligieron concentraciones por debajo de su  $IC_{50}$ . Las curvas de crecimiento de los MCTS en presencia de dos fármacos diferentes se analizaron en los dos protocolos previamente establecidos. Para ambos protocolos, los dos fármacos se añadieron al mismo tiempo, ya sea al inicio del cultivo (protocolo preventivo) o durante el crecimiento (protocolo curativo).

El crecimiento de los MCTS en presencia y ausencia de los dos fármacos se determinó midiendo el diámetro de cada esferoide con una retícula graduada (1/10 mm) en un microscopio invertido marca Zeiss.

La respuesta de la combinación entre los dos de fármacos se determinó con un modelo matemático llamado aditivismo tipo Bliss [Berenbaum, 1981; Borisy et al., 2003] y con la siguiente ecuación:

$$C = A + B (A * B)$$

donde C, es el efecto sinérgico de los fármacos sobre el crecimiento del esferoide sin considerar el efecto individual en cada uno de ellos; A y B, representan el efecto de cada fármaco sobre el crecimiento del esferoide cuando se aplica individualmente.

### **3.5 Determinación del efecto sinérgico de los fármacos ensayados sobre el crecimiento de células tumorales**

Para evaluar el efecto de la combinación de los diferentes fármacos sobre las células tumorales se utilizó el índice de resistencia (IR) con la siguiente ecuación:

$$IR = Se (1 * 2) / So (1 + 2)$$

donde el sobreviviente experimental (Se) es el producto de la supervivencia observada con el fármaco 1 y la supervivencia observada con el fármaco 2, mientras el sobreviviente observado (So) es la supervivencia observada con la combinación de fármacos de 1 y 2 [Foucquier y Guedj, 2015].

### **3.6 Interpretación de los valores de aditivismo tipo Bliss (ATB) e índice de resistencia (IR) en los modelos ensayados**

Para ambos modelos matemáticos, se identificaron tres tipos de sinergismo tipo Bliss dependiendo del efecto que tuvo la combinación de fármacos ensayados (Tabla 4).

En el sinergismo aditivo, la inhibición de la proliferación es del 100% cuando la suma de la inhibición individual de cada fármaco es del 50% (50+50= 100) y el índice de resistencia oscila entre 1 y 2. En el sinergismo supra aditivo, la inhibición de la proliferación es del 100% cuando la suma de la combinación de los

dos fármacos es mayor que la inhibición individual de cada fármaco ( $20+20= 100$ ) y el índice de resistencia es mayor o igual a 2. En el sinergismo infra aditivo, la inhibición de la proliferación no es del 100% porque la suma de la combinación de los fármacos es menor que la inhibición individual de cada fármaco ( $50+50=50$ ) y el índice de resistencia es igual a 1 [Borisy et al., 2003; Foucquier y Guedj, 2015] (Tabla 4).

**Tabla 4.** Clasificación de ATB e IR para cada combinación de fármaco.

Primer fármaco % inhibición	Segundo fármaco % Inhibición	% inhibición	Combinación	
			ATB	IR
50	50	100	Aditivo	$>1, <2$
20	20	100	Supra aditivo	$\geq 2$
50	50	20 ó -20	Infra aditivo	$=1$

ATB: Aditivismo Tipo Bliss; IR: Índice de resistencia.

### **3.7 Evaluación del efecto tóxico de la combinación de fármacos con potencia supra aditiva sobre el crecimiento de diferentes células no cancerosas: Cálculo del Índice Terapéutico (IT)**

Se intentó crecer la línea celular de fibroblastos de ratón (3T3), las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), los fibroblastos de embrión de ratón MEFs así como la línea celular de epitelio de mama MCF10A (Fig. suplementaria 1) en condiciones tridimensionales pero los cúmulos iniciales de células no se formaron debido probablemente a la baja expresión de proteínas de adhesión. Por lo tanto se realizaron los experimentos de toxicidad en cultivos bidimensionales de las células 3T3 (20,000 células/100  $\mu$ L) cultivadas en monocapa en cajas de 96 pozos incubadas con los diferentes fármacos (cisplatino, paclitaxel, doxorubicina, celecoxib y DMC) a las concentraciones ensayadas en células cancerosas (0.1, 1, 10 y 100  $\mu$ M) por 24 horas. La proliferación de los fibroblastos se determinó colorimétricamente utilizando el método de MTT utilizando una concentración inicial de sal de tetrazolio de 2 mM por 3 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire [Pacheco-Velázquez et al., 2019]. Los cristales de

formazan se disolvieron en 100  $\mu$ L de dimetilsulfóxido. La proliferación celular se detectó a 595 nm con un lector de placas de ELISA (BIO-RAD, Hercules, California, EUA).

El análisis de densidad celular se realizó con el software Origin 8, ajustando el efecto de los fármacos a un modelo logístico matemático considerando la muestra sin fármaco como el 100% tal como se realizó para el análisis en células cancerosas [Foucquier y Guedj, 2015].

La determinación de las concentraciones inhibitorias 50 ( $IC_{50}$ ) de cada fármaco se realizó como se indica en el apartado 3.3. La determinación del efecto de la combinación de los diferentes fármacos (NSAIDS, CasII-gly y fármacos canónicos) sobre la proliferación de 3T3 se evaluó por el ensayo de MTT y con el cálculo del aditivismo tipo Bliss indicado en el apartado 3.4 y 3.6.

El índice terapéutico (IT) de cada fármaco solo o en combinación se calculó utilizando la siguiente ecuación matemática:

$$IT = IC_{50}^1 / IC_{50}^2,$$

dónde el índice terapéutico (IT) es la relación de la concentración inhibitoria 50 de los fármacos en las células no cancerosas ( $IC_{50}^1$  de las células 3T3) entre la concentración inhibitoria 50 de los compuestos en las células cancerosas ( $IC_{50}^2$  de las células de HeLa). Un valor de  $IT > 3$  indica que la exposición al fármaco produce una toxicidad baja o nula para las células normales y una alta toxicidad para las células cancerosas [Deepa et al., 2012].

### **3.8 Análisis estadístico**

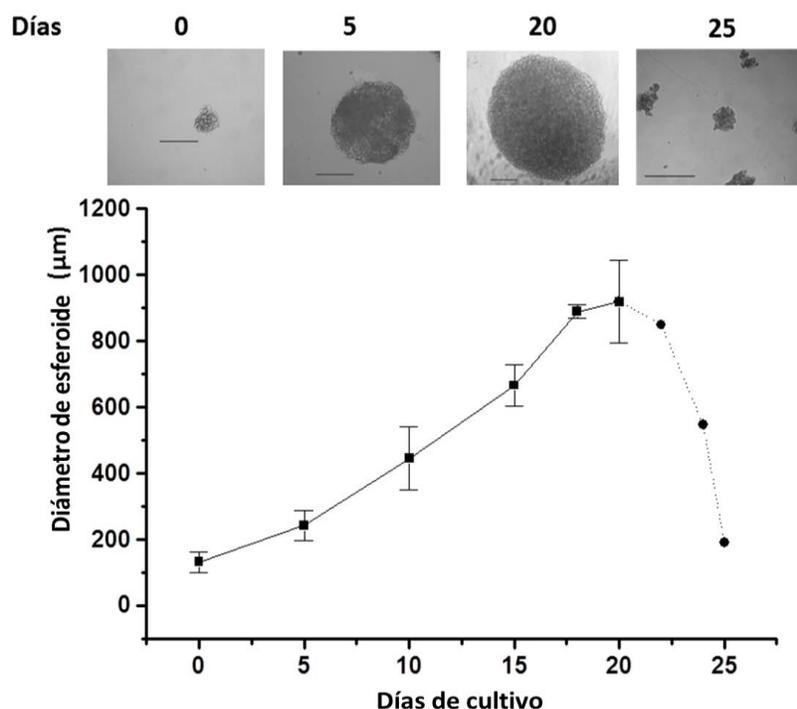
Los resultados muestran el promedio  $\pm$  desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. Las diferencias estadísticas se analizaron utilizando la prueba *t* de Student. Para esta prueba estadísticas su utilizó un valor de  $P < 0.05$  como criterio de significancia [Klockars et al., 2000; Krzywinski et al., 2014].

# CAPÍTULO 4

## Resultados

### 4.1 Crecimiento de los MCTS de HeLa

La curva de crecimiento de los MCTS de HeLa se muestra en la Figura 7. La proliferación de las células que constituyen el MCTS se analizó midiendo el diámetro del esferoide durante 25 días. A partir del día 5 y hasta el día 15 se registró un crecimiento exponencial en el tamaño del esferoide. El tamaño máximo alcanzado fue de  $910 \pm 210 \mu\text{m}$  ( $n=3$ , número de repeticiones= 10 esferoides, por cada  $n$ ) al día 20 de cultivo. Posterior a esta fecha los esferoides comenzaron a disgregarse.



**Figura 6.** Curva de crecimiento de los esferoides de HeLa. Cada punto representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de 30 esferoides medidos en 3 cultivos independientes. En la parte superior se muestran las micrografías de contraste de fase de los diferentes tamaños de los MCTS en los diferentes tiempos de cultivo. Barra = 200 µm.

## 4.2 Efecto de los NSAIDs, compuestos antimitocondriales y fármacos antineoplásicos sobre el crecimiento de los MCTS de HeLa

Independientemente del protocolo utilizado, el crecimiento de los MCTS mostró mayor sensibilidad a los NSAIDs que a los fármacos antineoplásicos. Además, la toxicidad observada en los MCTS fue mayor en el protocolo preventivo que en el protocolo curativo (Tabla 5) como se ha reportado anteriormente en otros trabajos [Rodríguez-Enríquez et al., 2009; Mandujano-Tinoco et al., 2013; Rodríguez-Enríquez et al., 2019].

**Tabla 5.** Valores de IC<sub>50</sub> de los diferentes compuestos y fármacos ensayados sobre el crecimiento de los MCTS de HeLa

<b>Compuestos</b>	<b>Preventivo (nM)</b>	<b>Curativo (µM)</b>
<b><i>Fármacos Canónicos</i></b>		
Cisplatino	50 ± 17*	270 ± 20
Paclitaxel	16 ± 5*	26.5 ± 0.1
Doxorrubicina	48 ± 7*	86 ± 5
Gemcitabina	65 ± 17*	128 ± 20
Ciclofosfamida	136 ± 87*	315 ± 30
Carboplatino	165 ± 28*	287 ± 43
<b><i>Anti-mitocondriales</i></b>		
CasII-gly	30 ± 7.5*	106 ± 2
<b><i>NSAIDs</i></b>		
Celecoxib	1 ± 0.3*	7.5 ± 2
DMC	10 ± 2*	32 ± 10

La IC<sub>50</sub> de los esferoides fue calculada en el día 20 de cultivo. Los datos muestran promedio ± desviación estándar de 30 esferoides medidos en 3 cultivos independientes (n=3). \*P <0.01 vs. Protocolo curativo. DMC, dimetilcelecoxib, NSAIDs; antiinflamatorios no esteroideos.

### **4.3 Efecto sinérgico de los NSAIDs y de CasII-gly sobre los fármacos antineoplásicos en el crecimiento de los MCTS de HeLa**

Para evaluar el efecto sinérgico de los NSAIDs y de CasII-gly sobre los antineoplásicos canónicos paclitaxel, doxorubicina y cisplatino se utilizó la aproximación del aditivismo tipo Bliss (ATB). Para ello, el crecimiento de los MCTS se tituló con concentraciones sub-IC<sub>50</sub> de cada compuesto (Tabla suplementaria 1) tanto en el protocolo curativo como en el preventivo.

Protocolo preventivo: La combinación de los dos NSAIDs con cisplatino (ATB=60-85%) y la combinación CasII-gly con cisplatino (ATB= 87-99%) fueron las más efectivas para suprimir el crecimiento de los MCTS con una respuesta de tipo supra aditiva. Las combinaciones de los NSAIDs con paclitaxel (ATB=20-45%) y doxorubicina (ATB=35-45%) fueron menos tóxicas para las células tumorales que se reflejó en un efecto supra aditivo menor al 50%. Por otro lado, la combinación de celecoxib con ciclofosfamida (ATB= de -10 a -48%) y gemcitabina (ATB= de -34 a -48%) o de DMC con carboplatino (ATB=de -6 a -20%) mostraron efectos infra aditivos, es decir, la combinación de estos compuestos potenció la proliferación del tumor indicando una posible interacción entre los fármacos (Tabla 6).

Protocolo curativo: La combinación de celecoxib o DMC con cisplatino (ATB=40-78%) y la combinación CasII-gly con cisplatino (ATB= 87-99%) fueron las más efectivas para suprimir el crecimiento de los MCTS con una respuesta de tipo supra aditiva. Por el contrario, la combinación de celecoxib o DMC con paclitaxel (ATB=10-20%) o con doxorubicina (ATB=10-45%) mostraron un efecto supra aditivo menor. En este protocolo, el efecto infra aditivo (es decir, una posible interacción entre los fármacos por su efecto bajo o nulo sobre el crecimiento) se observó en la combinación de celecoxib o DMC con la ciclofosfamida (ATB= de -4 a -15%); en la combinación de celecoxib con carboplatino (ATB=de -20 a -40%) y en la combinación de DMC con gemcitabina (ATB= de -10 a -15%), (Tabla 6).

**Tabla 6.** Efecto sinérgico tipo Bliss de las diferentes combinaciones de fármacos en los dos protocolos experimentales en MCTS de HeLa.

<b>Protocolo preventivo</b>				
<i>Fármacos</i>	<i>Rango de concentraciones (nM)</i>	<i>Fármacos antineoplásicos</i>	<i>Rango de concentraciones (nM)</i>	<i>Aditivismo tipo Bliss (%)</i>
Celecoxib	0.1-1	Cisplatino	10-43	75-85
		Paclitaxel	10-13	20-35
		Doxorrubicina	20-40	35-45
		Gemcitabina	30-50	-(18-54)
		Ciclofosfamida	10-100	-(-34-48)
		Carboplatino	100	20-23
DMC	1-10	Cisplatino	10-43	60-75
		Paclitaxel	10-13	20-45
		Doxorrubicina	25-40	45-55
		Gemcitabina	30-50	10
		Ciclofosfamida	10-100	-(10-20)
		Carboplatino	10-100	-(-6-20)
<i>Anti-mitochondrial</i>				
CasII-gly	1-30	Cisplatino	15-30	87-99
		Paclitaxel	10-13	40-45
		Doxorrubicina	20-40	30-45
		Gemcitabina	10-40	15-28
		Ciclofosfamida	28-110	-(10-15)
		Carboplatino	50-90	18-36

**Protocolo Curativo**

<i>Fármacos</i>	<i>Rango de concentraciones (<math>\mu M</math>)</i>	<i>Fármacos antineoplásicos</i>	<i>Rango de concentraciones (<math>\mu M</math>)</i>	<i>Aditivismo tipo Bliss (%)</i>
Celecoxib	1-7	Cisplatino	1-5	65-78
		Paclitaxel	10-25	10-20
		Doxorrubicina	30-50	15-35
		Gemcitabina	20-50	-(1-15)
		Ciclofosfamida	75-115	-(4-15)
		Carboplatino	60-190	-(20-40)
DMC	10-35	Cisplatino	1-50	40-60
		Paclitaxel	10-25	15-20
		Doxorrubicina	30-50	10-45
		Gemcitabina	20-50	-(10-15)
		Ciclofosfamida	75-115	-(5-10)
		Carboplatino	60-190	20-40
<i>Anti-mitocondrial</i>				
CasII-gly	10-220	Cisplatino	15-30	87-99
		Paclitaxel	10-25	48-58
		Doxorrubicina	10	20-35
		Gemcitabina	20-40	15-45
		Ciclofosfamida	10-80	-(19-25)
		Carboplatino	50-75	28-35

El Aditivismo tipo Bliss se calculó como se indica en la sección de Material y métodos. El efecto infra aditivo (crecimiento tumoral en presencia de la combinación) se encuentra representado entre paréntesis.

#### 4.4 Índice de Resistencia (IR) de las combinaciones supra aditivas de los fármacos canónicos y no canónicos sobre el crecimiento de los MCTS de HeLa

Las combinaciones de los fármacos con potencia supra aditiva (marcados en gris) mostraron valores del índice de resistencia (IR) mayores a 2 indicando que los NSAIDS y la CasII-gly potenciaron el efecto tóxico de los compuestos antineoplásicos canónicos (Tabla 7), excepto para la combinación de CasII-gly con doxorubicina.

**Tabla 7.** IR para el protocolo preventivo y curativo en las combinaciones de los NSAIDS con los fármacos antineoplásicos canónicos.

<b>Protocolo preventivo</b>				
<b>Fármaco</b>	<b>Dosis empleadas (nM)</b>	<b>Fármaco canónico</b>	<b>Dosis empleadas (nM)</b>	<b>IR</b>
Celecoxib	0.1-0.7	Cisplatino	11-12	2.2-5.5
	0.1-0.9	Paclitaxel	16-18	2.3-4.8
	0.1-0.5	Doxorrubicina	40	5-7.3
DMC	1-7	Cisplatino	30	5.2-8.8
	5	Paclitaxel	15-20	3.1-8.8
	1	Doxorrubicina	30-40	2.3-3
CasII-gly	10-25	Cisplatino	30	4.8-5.9
	13	Paclitaxel	13	7.6
	20-30	Doxorrubicina	20-23	2.4-4.5
<b>Protocolo curativo</b>				
<b>Fármaco</b>	<b>Dosis empleadas (µM)</b>	<b>Canónica</b>	<b>Dosis empleadas (µM)</b>	<b>IR</b>
Celecoxib	2-7	Cisplatino	3-5	2.1-7.4
	2	Paclitaxel	17-20	2.2-15.1
	2-4	Doxorrubicina	10-50	2.3-8.1
DMC	10-25	Cisplatino	1-5	2.7-7
	20-30	Paclitaxel	17-20	2.1-6.3
	32	Doxorrubicina	30-50	2.7-4
CasII-gly	50	Cisplatino	15-30	4.9-10.7
	50	Paclitaxel	20-30	2.8-3.9
	10	Doxorrubicina	10-15	1.2-1.3

El IR se calculó como se indica en la sección Material y métodos

El análisis del efecto sinérgico obtenido con el ATB fue corroborado con el modelo de índice de resistencia indicando que el efecto sinérgico de los fármacos evaluados es reproducible.

#### **4.5 Efecto de los NSAIDs sobre los valores de las concentraciones inhibitorias 50 (IC<sub>50</sub>) de los fármacos antineoplásicos canónicos en MCTS de HeLa**

La capacidad que tiene un fármaco A para aumentar la potencia de un fármaco B, es decir, la capacidad para disminuir el valor de su concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>), es una característica que define el efecto sinérgico de dicho fármaco [Borisly et al., 2003; Lehár et al., 2009]. Por lo tanto se evaluó la capacidad que tiene el celecoxib, DMC o CasII-gly de aumentar o disminuir la concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) de los fármacos antineoplásicos canónicos (Tabla 8) sobre los MCTS de HeLa.

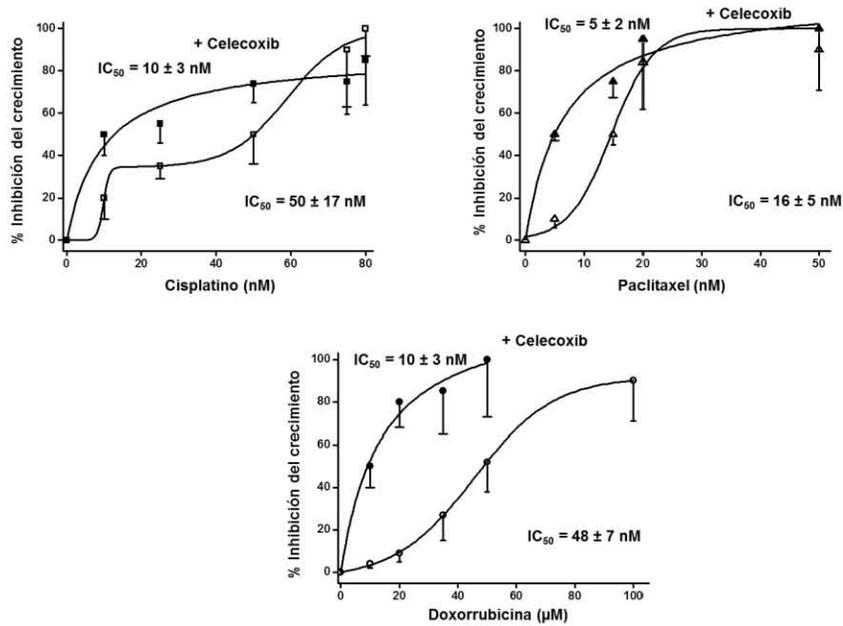
**Tabla 8.** Cambios en los valores de IC<sub>50</sub> de los fármacos antineoplásicos canónicos en presencia de celecoxib, DMC o CasII-gly en MCTS de HeLa

	Preventivo		Curativo	
	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
		+ celecoxib (0.4 –1 nM)		+ celecoxib (2-8 μM)
Cisplatino	50 ± 17	10 ± 3 <sup>a</sup>	270 ± 20	10.5 ± 0.5 <sup>a</sup>
Paclitaxel	16 ± 5	5 ± 2 <sup>b</sup>	26.5 ± 0.1	15 ± 3 <sup>b</sup>
Doxorrubicina	48 ± 7	10 ± 3 <sup>a</sup>	86 ± 5	10 ± 2 <sup>a</sup>
		+ DMC (1-10 nM)		+ DMC (25-30 μM)
Cisplatino	50 ± 17	24 ± 6 <sup>b</sup>	270 ± 20	148.5 ± 30 <sup>b</sup>
Paclitaxel	16 ± 5	7.2 ± 3 <sup>b</sup>	26.5 ± 0.1	7.1 ± 2 <sup>a</sup>
Doxorrubicina	48 ± 7	31.2 ± 9	86 ± 5	77.4 ± 20
		+ CasII-gly (11-30 nM)		+ CasII-gly (25-75 μM)
Cisplatino	50 ± 17	8 ± 3 <sup>a</sup>	270 ± 20	11.3 ± 4 <sup>a</sup>
Paclitaxel	16 ± 5	4.5 ± 1.5 <sup>a</sup>	26.5 ± 0.1	10 ± 2 <sup>b</sup>
Doxorrubicina	48 ± 7	16.5 ± 4 <sup>b</sup>	86 ± 5	30 ± 9 <sup>a</sup>

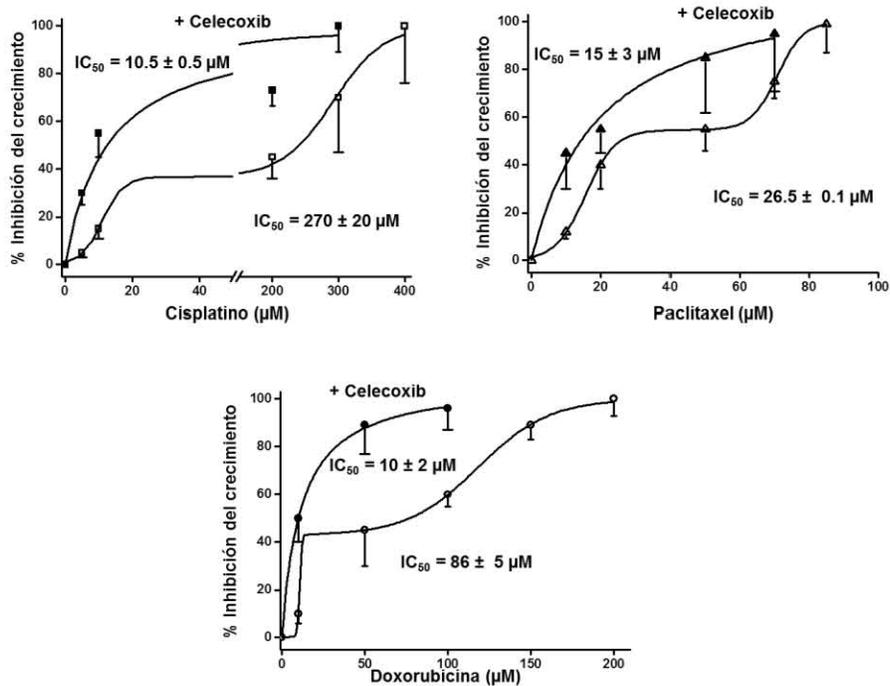
Los valores de IC<sub>50</sub> en MCTS fueron determinados al día 20 de cultivo. Los valores representan promedio ± desviación estándar de al menos 30 esferoides provenientes de 3 cultivos independientes. <sup>a</sup>P<0.001 y <sup>b</sup>P<0.05 vs. IC<sub>50</sub> en ausencia de NSAIDs o CasII-gly.

Los valores de IC<sub>50</sub> de cada fármaco canónico disminuyeron significativamente cuando las células fueron incubadas en presencia de celecoxib, DMC o CasII-gly. Es decir, la toxicidad de cada fármaco antineoplásico aumentó significativamente por los NSAIDs o la CasII-gly. De todas las combinaciones ensayadas, el cisplatino fue el único que mostró un aumento del 90% en su toxicidad después de combinarse con el celecoxib o con la CasII-gly en ambos protocolos ensayados (Figura 7).

### MCTS: protocolo preventivo



### MCTS: protocolo curativo



**Figura 7.** Curvas de inhibición de cisplatino, paclitaxel o doxorubicina en los protocolos preventivo y curativo de los MCTS en presencia (símbolos llenos) o en ausencia (símbolos vacíos) de celecoxib. Las curvas de inhibición de los fármacos canónicos se ajustaron a una función hiperbólica. En combinación con celecoxib el ajuste se realizó utilizando una función dosis-respuesta.

#### 4.6 Cálculo del índice terapéutico (IT) para evaluar la toxicidad de las combinaciones supra aditivas de fármacos canónicos y no canónicos sobre el crecimiento de HeLa

Las IC<sub>50</sub> calculadas en el cultivo bidimensional estuvieron en el rango micromolar, como se ha reportado anteriormente [Pritchard et al., 2018; Pacheco-Velázquez et al., 2019]. Para el cálculo de IT se emplearon los valores de IC<sub>50</sub> de HeLa en monoterapia y en combinación reportados previamente [Robledo-Cadena, 2016]; estos valores fueron significativamente menores a los obtenidos para la línea celular 3T3. El IT calculado para los fármacos en monoterapia fue menor a 3 (excepto paclitaxel, donde el IT=3.7) con un rango de 1.4-2.4. (Tabla 9).

**Tabla 9.** Índice terapéutico (IT) en cultivo bidimensional de células tumorales y no tumorales.

Compuestos	Cáncer de	Fibroblastos	IT
	Cérvix		
	HeLa	3T3	
	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)		
<i>NSAIDs</i>			
Celecoxib	55 $\pm$ 9*	119 $\pm$ 7	2.1
DMC	48 $\pm$ 2*	69 $\pm$ 8.5	1.4
<i>Fármacos antineoplásicos</i>			
Cisplatino	15 $\pm$ 3*	36 $\pm$ 3	2.4
Paclitaxel	21 $\pm$ 4*	80 $\pm$ 12	3.7
Doxorrubicina	26 $\pm$ 6	51 $\pm$ 18	1.9

Los valores de IC<sub>50</sub> de cada fármaco fueron determinados después de 24 horas de exposición. Los datos muestran promedio  $\pm$  desviación estándar de 3 cultivos independientes. \*P < 0.05 vs. fibroblastos 3T3.

La combinación de los NSAIDS con los fármacos antineoplásicos (Tabla suplementaria 2) tampoco tuvo un efecto tóxico sobre los fibroblastos (Tabla 10) y los valores calculados de IT fueron mayores a 5 indicando un efecto escaso o nulo sobre la célula no tumoral. De las combinaciones ensayadas, los IT más altos se alcanzaron con la combinación de NSAIDs con cisplatino (IT=5.7-7.2), seguido por la combinaciones de NSAIDs con paclitaxel (IT=4-4.5) o doxorubicina (IT=3.6-3.7).

**Tabla 10.** Índice Terapéutico de las combinaciones de celecoxib y DMC con los fármacos antineoplásicos en cultivos bidimensionales de Hela o 3T3

<i>NSAIDs</i>	<i>Antineoplásicos</i>	<i>IC<sub>50</sub> (μM)</i>		<i>IT</i>
		<i>HeLa</i>	<i>3T3</i>	
Celecoxib (5-10 μM)	Cisplatino	5 ± 2*	36 ± 4	7.2
	Paclitaxel	13 ± 4*	52 ± 10	4
	Doxorrubicina	14.5 ± 2*	54 ± 3	3.7
DMC (15-25 μM)	Cisplatino	5 ± 1*	28.5 ± 7	5.7
	Paclitaxel	13 ± 4*	58.5 ± 17	4.5
	Doxorrubicina	11 ± 4*	41 ± 5	3.6

Los valores de IC<sub>50</sub> fueron determinados después de 24 horas de exposición. Los datos muestran promedio ± desviación estándar de 3 cultivos independientes. \*P< 0.05 vs. fibroblastos 3T3.

# CAPÍTULO 5

---

## Discusión

La calidad de vida de los pacientes con cáncer se deteriora frecuentemente por el uso prolongado de fármacos antineoplásicos con efectos secundarios severos [Yang et al., 2013]. Por lo tanto, la identificación de nuevos blancos terapéuticos cuya inhibición contrarreste el crecimiento tumoral sin afectar a las células sanas es de vital importancia en el campo del cáncer. Nuestro grupo de investigación ha sido pionero en proponer a la fosforilación oxidativa (FO) de la célula de cáncer de cérvix HeLa como un biomarcador potencial porque este tipo de célula depende principalmente de esta vía para el suministro de ATP ya sea en cultivo bidimensional [Rodríguez-Enríquez et al., 2006; Moreno-Sánchez et al., 2010] o aún en el cultivo tridimensional del esferoide [Mandujano-Tinoco et al., 2013]. La inhibición de la proliferación tumoral con compuestos que afectan la función mitocondrial ya está documentado. La CasII-gly bloquea varias enzimas del ciclo de Krebs como son PDH,  $\alpha$ KGDH y SDH ( $K_i=2-5 \mu\text{M}$ ) y la respiración celular a concentraciones a las que se afecta la proliferación tumoral de 20-100  $\mu\text{M}$  [Pritchard et al. 2018; Pacheco-Velazquez et al., 2019]. El celecoxib y el DMC afectan la función mitocondrial a través de: (1) la disminución de las vías de señalización como PI3K/Akt, que a su vez activa la apoptosis [Kuhar et al., 2007; Kim et al., 2009; Liu, et al., 2017]; (2) la inhibición de la FO (40-60%) y el abatimiento del potencial transmembranal mitocondrial (60%) a concentraciones micromolares y en el rango de las  $IC_{50}$  calculadas para proliferación en HeLa (cáncer cervicouterino), MCF7 (cáncer de mama, receptor de estrógeno positivo), MDA-MB 231 y MDA MB 468 (cáncer de mama, triple negativo), [Pacheco-Velázquez et al., 2018; Pritchard et al., 2018].

El modelo fisiológico del esferoide tumoral (MCTS) que se analizó en este estudio ya ha sido utilizado en estudios previos como un modelo que asemeja las condiciones en las que se desarrolla un tumor sólido avascular [Rodríguez-Enríquez et al., 2008; Mandujano-Tinoco et al., 2013]. El mayor crecimiento

esferoidal de HeLa previamente reportado (1 mm al día 18 de crecimiento) [Rodríguez-Enríquez et al., 2008], coincide con lo medido en este proyecto (diámetro  $910 \pm 210 \mu\text{m}$  al día 20). También se observó que los MCTS de HeLa son altamente sensibles a inhibidores mitocondriales como la CasII-gly [Rodríguez-Enríquez et al., 2008].

En el presente proyecto, aparte de la CasII-gly otros compuestos no utilizados para el tratamiento contra el cáncer como son los NSAIDS celecoxib y DMC también fueron exitosos evitando la formación del esferoide (resultados con el protocolo preventivo, dosis en el rango nanomolar) o disminuyendo severamente su crecimiento (resultados con el protocolo curativo, dosis micromolar). La diferencia en sensibilidad del esferoide en los dos protocolos puede deberse a: (1) la expresión diferencial de la P-glicoproteína cuya expresión es significativamente menor en los esferoides cuando empiezan a formarse y alcanzan un diámetro esferoidal menor a  $100 \mu\text{m}$  [Wartenberg et al., 2000] comparados con esferoides más grandes (con diámetros  $>100 \mu\text{m}$ ); y (2) al incremento en la densidad celular observada en esferoides con diámetros mayores a  $350 \mu\text{m}$ , lo que conlleva una limitación en la difusión de algunos fármacos como la doxorrubicina desde el exterior hacia el interior del esferoide [Baek et al., 2016].

### **5.1 La inhibición de la mitocondria afecta el crecimiento de los MCTS de HeLa**

La CasII-gly tiene como mecanismo de acción inhibir selectivamente a varias enzimas del ciclo de Krebs como son la piruvato deshidrogenasa, la 2-oxoglutarato deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa [Marín-Hernández et al., 2003; 2006]. Sin embargo, este compuesto también afecta los procesos bioenergéticos de algunos órganos importantes como el corazón. La CasII-gly disminuye 70% el trabajo cardiaco así como los niveles de ATP y fosfocreatina (85%) promoviendo una falla general en el funcionamiento del corazón que depende exclusivamente de la oxidación de ácidos grasos por la  $\beta$ -oxidación

[Hernández-Esquivel et al., 2006]. Por ello, se estudió el efecto de fármacos re-direccionados al cáncer como son los anti inflamatorios no esteroideos. Tanto el celecoxib como el DMC afectan la función mitocondrial actuando como inhibidores de la succinato deshidrogenasa o complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial [Pritchard et al., 2018]. Además se ha evaluado que a concentraciones similares estos fármacos pueden desencadenar otros procesos de muerte celular como la apoptosis intrínseca o mitocondrial, liberando citocromo c al citosol [Trejo-Solís et al., 2005].

El DMC carece de la función de inhibir la COX-2 [Kardosh et al., 2005a]; pero inhibe la proliferación del cáncer, como ocurre en el linfoma de Burkitt, el mieloma, el cáncer de pulmón no microcítico y el cáncer gástrico [Backhus et al., 2005; Kardosh et al., 2005a; Zhang et al., 2016]. Por lo tanto, la inhibición de la proliferación de DMC puede estar asociada con otros mecanismos en los que no se requiere la función COX-2. En este sentido, se ha demostrado que a dosis micromolares (10-100  $\mu$ M), DMC induce apoptosis (proteínas Bcl-2 de regulación descendente) y detención del ciclo celular (regulación positiva del inhibidor del ciclo celular p27) [Schönthal, 2006; Sobolewski et al., 2015]. El efecto inhibitorio del celecoxib sobre la proliferación tumoral está vinculado a la inhibición de la actividad de la ciclooxygenasa tipo 2 (COX-2) a concentraciones micromolares ( $K_{i\text{COX-2}} = 10 \mu\text{M}$ ) [Gierse et al., 1999] así como a la activación de la apoptosis [Kardosh et al., 2005a; Ralph et al., 2015]. Sin embargo, otras vías importantes como la FO están severamente bloqueadas a dosis bajas de celecoxib [Pritchard et al., 2018]. De hecho, mis resultados indican que el celecoxib fue el compuesto anti-mitocondrial con mayor toxicidad (2-10 veces) comparado con DMC y CasII-gly. Al parecer, el celecoxib inhibe por su efecto multisitio: (a) afecta el consumo de oxígeno sensible a oligomicina, a través de la inhibición del complejo II de la cadena respiratoria [Pritchard et al., 2018], (b) promueve la apoptosis [Kuhar et al. 2005] (c) inhibe vías de señalización como PI3K/Akt [Lin et al., 2005]. Debido a que concentraciones similares (50-100  $\mu\text{m}$ ) de celecoxib inhiben el crecimiento esferoidal y la FO proponemos que las células tumorales arrestan su ciclo celular por el abatimiento de la FO y por lo tanto la disminución en el contenido de ATP

intracelular. Además, se ha reportado que el celecoxib actúa como pro-oxidante aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) en diferentes tipos de cánceres metastásicos y poco metastásicos [Pritchard et al., 2018]. Un aumento en la cantidad de EROS en la mitocondria y en el citosol está relacionado con la inhibición de la cadena respiratoria a nivel del complejo I, II y III [Rodríguez-Enríquez et al., 2012].

Comparado con algunos fármacos antineoplásicos, el celecoxib a dosis sub micromolares presenta poca toxicidad en células y tejidos normales [Simon et al., 1999; Silverstein et al., 2000; Pritchard et al., 2018], lo que fortalece su uso como fármaco potencial contra el cáncer [Henney, 2000; Ajith et al., 2005]. Sin embargo, algunas investigaciones demuestran que el celecoxib a las dosis utilizadas (rango micromolar) para bloquear la progresión del tumor también afecta algunas vías de señalización relacionadas con la supervivencia celular [Glebov et al., 2006], indicando que a estas dosis podría ser poco selectivo contra las células tumorales afectando el funcionamiento de las células normales. Es por ello, que este estudio enfocó su atención en la posible potenciación de algunos fármacos antineoplásicos en combinación con el celecoxib para disminuir el crecimiento tumoral sin afectar a las células sanas.

## **5.2 Efecto sinérgico del celecoxib, DMC y CasII-gly sobre fármacos antineoplásicos canónicos en MCTS de HeLa**

Para disminuir efectos colaterales o adversos en los pacientes, se han ensayado estrategias donde un compuesto a concentraciones sub-IC<sub>50</sub> (para inhibir la proliferación) logre potenciar el efecto inhibitor del otro [Borisy et al., 2003]. Aunque los mecanismos moleculares que explican cómo se lleva a cabo tal sinergia son poco conocidos, se ha documentado que la combinación de los fármacos empleados tiene como finalidad bloquear diferentes blancos (i.e., enzimas, vías de señalización, transportadores, factores de transcripción, etc.) dentro de la célula [Lehár et al., 2009]. En los últimos años, se han publicado varios estudios donde se evalúan los efectos sinérgicos de diferentes fármacos para disminuir el crecimiento tumoral [Milrot et al., 2013; Daker et al., 2016; Zheng

et al., 2016]; sin embargo, estos estudios son incompletos porque no se evalúa en paralelo el efecto de tales combinaciones sobre las células no-tumorales (o sanas) y cuando se analiza la aplicación de dicha combinación afecta severamente la fisiología de las células no-tumorales [El-Awady et al., 2016]. En otros estudios, la combinación de los fármacos resulta infructuosa porque los fármacos al combinarse interactúan uno con otro aboliendo su efecto inhibitor [Hendrick et al., 2008] tal como se observa en la sinergia infra-aditiva (Tabla 6).

El efecto sinérgico puede estudiarse utilizando varios enfoques matemáticos [Lehárd et al., 2009]. En este estudio se seleccionaron dos de estos enfoques: el aditivismo tipo Bliss (ATB) y el índice de resistencia (IR), ya que ambos se han utilizado ampliamente en pruebas farmacológicas con resultados reproducibles [Pikman et al., 2017]. Ambos enfoques mostraron que ambos NSAIDs así como la CasII-gly tienen un efecto sinérgico potente sobre los fármacos quimioterapéuticos ensayados. De acuerdo con Borisy (2003), el valor de ATB resultante por la combinación de 2 fármacos debe ser superior al 80% como indicativo de que existe sinergia de un primer compuesto sobre el segundo. El celecoxib, DMC y la CasII-gly mostraron valores positivos de ATB en rangos superiores al 80% cuando se combinan específicamente con cisplatino, paclitaxel y doxorubicina (Tabla 8), indicando que los tres promueven potenciación y sinergia [Borisy et al., 2003].

Hasta la fecha se han publicado pocos trabajos sobre el efecto sinérgico de celecoxib con fármacos anticancerígenos y 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 la línea celular de HeLa, la aplicación de celecoxib aumentó significativamente la eficacia de paclitaxel (10-35%), cisplatino (65-85%) y doxorubicina (15-45%) en ambos protocolos para inhibir el crecimiento tumoral (Tabla 6). De hecho, estos efectos observados con celecoxib con cisplatino ya han sido documentados en carcinomas de cérvix (SiHa), pulmón (A431), vulva

(SW962) y en osteosarcoma (MG63). Al parecer, los mecanismos moleculares de la combinación de ambos fármacos tiene que ver con un incremento en la formación de aductos en el ADN y con la activación de la apoptosis [Kuhar et al., 2007; Kim et al., 2009; Davila-Manzanilla et al., 2017; Liu, et al., 2017]. Aunque existe poca información sobre el tratamiento de celecoxib y paclitaxel en cultivos celulares, en el 2009 se documentó en un tratamiento preclínico en fase II contra cáncer de pulmón utilizando ambas drogas; sin embargo, los pacientes mostraron efectos adversos diversos [Mutter et al., 2009].

Hasta la fecha se han descrito algunos posibles mecanismos de acción de las combinaciones de fármacos [Kuhar et al., 2007; Kim et al., 2009], donde el efecto multisitio de ambos compuestos es exitoso para la inhibición del crecimiento tumoral. Por lo tanto, resulta de gran interés que las combinaciones entre los fármacos usados en este proyecto, tengan como blanco procesos celulares diferentes, afectando al metabolismo energético (celecoxib) e inhibiendo el ciclo celular (cisplatino, paclitaxel, y doxorubicina).

La CasII-gly mostró un efecto sinérgico más fuerte (en combinación con cisplatino, paclitaxel y doxorubicina) que el celecoxib o el DMC (Tablas 6 y 7). Sin embargo, la CasII-gly todavía está en evaluación experimental y, por lo tanto, tardará más tiempo en poder ser aplicado en estudios clínicos [Dávila-Manzanilla et al., 2017].

### **5.3 Las combinaciones de los fármacos con efecto infra aditivo aumentaron la proliferación de la línea celular de CaCu (HeLa)**

Las combinaciones de los fármacos con efecto infra aditivo que más aumentaron el crecimiento esferoidal de HeLa fueron carboplatino y ciclofosfamida en combinación con celecoxib (ATB= de -55 a -78%). Los valores negativos indicaron que ambos fármacos combinados pueden haber interferido entre sí o con sus blancos disminuyendo sus efectos inhibitorios [Borisy et al., 2003] y estimulando el crecimiento tumoral hasta un 80%.

En la clínica, las combinaciones de fármacos (evaluados en este proyecto como infra aditivas), se han utilizado para impedir el crecimiento del cáncer en pacientes con carcinoma de ovario o pulmón y adenocarcinoma pancreático sin un progreso positivo [André et al., 2008; Dragovich et al., 2008; Mutter et al., 2009]. No se ha realizado un estudio *in vitro* de las combinaciones usadas y por lo tanto no se descarta un efecto infra aditivo en los pacientes.

En este sentido, los fármacos canónicos evaluados en este estudio que presentaron efecto infra aditivo (gemcitabina, ciclofosfamida y carboplatino) no deben ser combinados con los NSAIDS en pacientes con cáncer como CaCu, debido a su fuerte efecto potenciador positivo sobre la proliferación del tumor.

#### **5.4 Efecto de las combinaciones de los fármacos con efecto supra aditivo en las células no tumorales**

El efecto de la combinación de nuevos fármacos antineoplásicos en células normales no se había evaluado en la mayoría de los estudios de citotoxicidad tumoral. Actualmente, el IT es un indicador cada vez más estudiado para proponer a un compuesto como un posible fármaco anti tumoral potencial sin efectos en células normales [Deepa et al., 2012; Pacheco-Velázquez et al., 2019].

Como control, el efecto de celecoxib y el DMC, tanto en monoterapia como en combinación con cisplatino, paclitaxel y doxorubicina se evaluó en el crecimiento de células no cancerosas (fibroblasto de ratón, 3T3). Con estos datos y los datos previamente reportados en monoterapia para HeLa, se determinaron los índices terapéuticos. A pesar de que el IT en monoterapia no fuera tan atractivo (Tabla 9), la combinación de celecoxib o DMC con cisplatino, paclitaxel o doxorubicina produjo valores de IT superiores a 3 (Tabla 10), lo que indica que los medicamentos examinados no mostraron toxicidad para las células sanas y producen el efecto deseado en células cancerosas [Deepa et al., 2012], siendo la combinación de celecoxib y cisplatino la que tuvo mejor IT (7.4).

En este proyecto el sinergismo supra-aditivo (Tabla 6) se evaluó en una línea celular sana observando un efecto específico sobre el tumor e inocuo para la célula no tumoral, lo que podría ser de potencial interés en el sector clínico (Tabla 10). Por lo anterior, el reposicionamiento de celecoxib como compuesto anticancerígeno resulta relevante como terapia contra el CaCu debido a que es un compuesto aprobado por la FDA y puede ser empleado en combinación con fármacos antineoplásicos de primera línea, específicamente el cisplatino, el paclitaxel y la doxorubicina.

# CAPITULO 6

---

## **Conclusión**

Se requirió bloquear la FO y otras vías canónicas (estabilización de ADN, microtubulos y la actividad topoisomerasa I) para la eliminación del crecimiento del HeLa. Además los medicamentos reposicionados ya son conocidos en la clínica y la evaluación de su eficacia en combinación con esquemas de tratamientos convencionales o experimentales, permitirán abrir una ventana de oportunidad en la que los efectos secundarios son mínimos, logrando una mayor especificidad hacia las células cancerosas.

# CAPITULO 7

---

## 7.1 Literatura citada

- Ajith T, Subin JP, Jacob J, Sanjay PS, Babitha NV. Antimutagenic and anti-oxidant activities of the non-steroidal anti-inflammatory drug celecoxib. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32: 888-893.
- Ambili R. Toxicities of anticancer drugs and its management. *Int J Basic Clin Pharmacol* 2012; 1: 2-12.
- Aschauer L, Muller PA. Novel targets and interaction partners of mutant p53 Gain-Of-Function. *Biochem Soc Trans* 2016; 44:460-466.
- Backhus LM, Petasis NA, Uddin J, Schönthal AH, Bart RD, Lin Y, Starnes VA, Bremner RM. Dimethyl celecoxib as a novel non-cyclooxygenase 2 therapy in the treatment of non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;v130: 1406-1412.
- Baek N, Seo OW, Kim M, Hulme J, An SS. Monitoring the effects of doxorubicin on 3D-spheroid tumor cells in real-time. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 7207-7218.
- 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; 79: 314-320.
- Berenbaum MC. Criteria for analyzing interactions between biologically active agents. *Adv Cancer Res* 1981; 35: 269-335.
- Borisy AA, Elliott PJ, Hurst NW, Lee MS, Lehar J, Price ER, Serbedzija G, Zimmermann GR, Foley MA, Stockwell BR, Keith CT. Systematic discovery of multicomponent therapeutics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 7977-7982.
- Brandon M, Baldi P, Wallace DC. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* 2006; 25: 4647-4662.
- Brown AS, Patel CJ. A standard database for drug repositioning. *Sci Data* 2017; 4: 170029.
- Burns JE, Baird MC, Clark LJ, Burns PA, Edington K, Chapman C, Mitchell R, Robertson G, Soutar D, Parkinson EK. Gene mutations and increased levels of p53 protein in human squamous cell carcinomas and their cell lines. *Br J Cancer* 1993; 67: 1274-1284.
- 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; 113: 1416-1422
- 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: 245-52.
- Cianchi F, Cortesini C, Magnelli L, Fanti E, Papucci L, Schiavone N, Messerini L, Vannacci A, Capaccioli S, Perna F, Lulli M, Fabbroni V, Perigli G, Bechi P, Masini E.

- Inhibition of 5-lipoxygenase by MK886 augments the antitumor activity of celecoxib in human colon cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 2716-2726.
- Dai Z-J, Ma X-B, Kang H-F. Antitumor activity of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, on breast cancer in Vitro and in Vivo. *Cancer Cell International* 2012; 12: 53.
- 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; 11: 2117-2126.
- Davila-Manzanilla SG, Figueroa-de-Paz Y, Mejia C, Ruiz-Azuara L. Synergistic effects between a copper-based metal Casiopeina III-ia and cisplatin. *Eur J Med Chem*. 2017; 129: 266-274.
- Deepa PR, Vandhana S, Jayanthi U, Krishnakumar S. Therapeutic and toxicologic evaluation of anti-lipogenic agents in cancer cells compared with non-neoplastic cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012; 110: 494-503.
- Deng M, Qin Y, Chen X, et al. Combination of celecoxib and PD184161 exerts synergistic inhibitory effects on gallbladder cancer cell proliferation. *Oncology Letters* 2017; 13: 3850-3858.
- Desoize B, Jardillier JC. Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Crit Rev Oncol Hematol* 2000; 36:193-207.
- 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; 106: 699-705.
- Dufau I, Frongia C, Sicard F, Dedieu L, Cordelier P, Ausseil F, Ducommun B, Valette A. Multicellular tumor spheroid model to evaluate spatio-temporal dynamics effect of chemotherapeutics: application to the gemcitabine/CHK1 inhibitor combination in pancreatic cancer. *BMC Cancer* 2012; 12: 15.
- 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.
- Foucquier J, Guedj M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol Res Perspect Pharmacology* 2015; 3: e00149.
- Gierse JK, Koboldt CM, Walker MC, Seibert K, Isakson PC. Kinetic basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases. *Biochem J* 1999; 339: 607-614.
- Glebov OK, Rodriguez LM, Lynch P, Patterson S, Lynch H, Nakahara K, Jenkins J, Cliatt J, Humbyrd CJ, Denobile J, Soballe P, Gallinger S, Buchbinder A, Gordon G, Hawk E, Kirsch IR. Celecoxib treatment alters the gene expression profile of normal colonic mucosa. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15:1382-1391.
- Gowda R, Sharma A, Robertson GP. Synergistic inhibitory effects of celecoxib celecoxib and plumbagin on melanoma tumor growth. *Cancer Lett* 2017; 28: 243-250.
- Hanahan D; Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 114: 646-674.

- 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, Strojan P, Shah JP, Hamoir M, Bradley PJ, Silver CE, Slootweg PJ, Vander Poorten V, Teymoortash A, Medina JE, 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. *Adv Ther* 2016; 33: 357-368.
- Hendrick 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: 494-506.
- Henney JE. From the Food and Drug Administration. *JAMA* 2000; 283: 1131.
- Hernández-Esquivel L, Marín-Hernández A, Pavón N, Carvajal K, Moreno-Sánchez R. Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs casiopeinas is related to inhibition of energy metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 212: 79-88.
- Hernández-Reséndiz I, Román-Rosales A, García-Villa E, López-Macay A, Pineda E, Saavedra E, Gallardo-Pérez JC, Alvarez-Ríos E, Gariglio P, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. Dual regulation of energy metabolism by p53 in human cervix and breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1853: 3266-3278.
- Hirayama A, Kami K, Sugimoto M, Sugawara M, Toki N, Onozuka H, Kinoshita T, Saito N, Ochiai A, Tomita M, Esumi H, Soga T. Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res* 2009; 69: 4918-4925.
- Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 266-276.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/PC.asp?t=14&c=11817>
- 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; 84: 1424-1431.
- Kaelin WG Jr. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 689-698.
- Kardosh A, Soriano N, Liu YT, Uddin J, Petasis NA, Hofman FM, Chen TC, Schönthal AH. Multitarget inhibition of drug-resistant multiple myeloma celllines by dimethyl-celecoxib (DMC), a non-COX-2 inhibitory analog of celecoxib. *Blood* 2005a; 106: 4330-4338.
- Kardosh A, Wang, W, Uddin, J, Petasis, N. A, Hofman, F.M, Chen, T.C, Schonthal, A.H. Dimethyl-celecoxib (DMC), a derivative of celecoxib that lacks cyclooxygenase-2-inhibitory function, potently mimics the anti-tumor effects of celecoxib on Burkitt's lymphoma in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 2005b; 4: 571-582.
- Karin M, Dhar D. Liver Carcinogenesis: From Naughty Chemicals to Soothing Fat-and the Surprising Role of NRF2. *Carcinogenesis* 2016; 37: 541-546.

- Keith CT, Borisy AA, Stockwell BR. Multicomponent therapeutics for networked systems. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 71–78.
- Kim SH, Kim SH, Song YC, Song YS. Celecoxib potentiates the anticancer effect of cisplatin on vulvar cancer cells independently of cyclooxygenase. *Ann N Y AcadSci*. 2009; 1171: 635-41.
- Kuhar M, Imran S, Singh N. Celecoxib Enhances the Chemotherapeutic Response of Cisplatin and TNF- $\alpha$  in SiHa Cells through Reactive Oxygen Species-Mediated Mitochondrial Pathway. *Int J Biomed Sci* 2007; 3: 176-184.
- 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: 659-666.
- Lev-Ari S, Strier L, Kazanov D, Madar-Shapiro L, Dvory-Sobol H, Pinchuk I, Marian B, Lichtenberg D, Arber N. Celecoxib and curcumin synergistically inhibit the growth of colorectal cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 6738-6744.
- Li CL, Tian T, Nan KJ, Zhao N, Guo YH, Cui J, Wang J, Zhang WG. Survival advantages of multicellular spheroids vs. monolayers of HepG2 cells in vitro. *Oncol Rep* 2008; 20: 1465-1471.
- Liu B, Yan S, Qu L, Zhu J. Celecoxib enhances anticancer effect of cisplatin and induces anoikis in osteosarcoma via PI3K/Akt pathway. *Cancer Cell International*. 2017;17:1.
- Narumiya S, Tanji M, Ishizaki T. Rho signaling, ROCK and mDia1, intransformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28: 65-76.
- Novac N. Challenges and opportunities of drug repositioning. *Trends PharmacSci* 2013; 34: 267-272.
- Mandujano-Tinoco EA, Gallardo-Pérez JC, Marín-Hernández A, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. Anti-mitochondrial therapy in human breast cancer multicellular spheroids. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833: 541-551.
- Marín-Hernández A, Gracia-Mora I, Ruiz-Ramírez L, Moreno-Sánchez R. Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas) on mitochondrial functions. *Biochem Pharmacol* 2003; 65: 1979-1989.
- 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: 1975-1988.
- Martinez-Outschoorn UE, Peiris-Pagés M, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol* 2017; 14: 11-31.
- McCormack PL. Celecoxib: a review of its use for symptomatic relief in the treatment of osteoarthritis, rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Drugs* 2011; 71: 2457–2489.
- Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 583-692.
- 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: 333-344.

- Montalvo-Esquivel G, Coronel-Martínez JA, Alvarado-Zermeño A, Cántú de León DF, Flores-Altriste D, Ortega-Rojo A, González-Enciso A, Isla-Ortiz 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. Oncoguía, 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: 1393-418.
- 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.
- Pacheco-Velázquez SC, Robledo-Cadena DX, Hernández-Reséndiz I, Gallardo-Pérez JC, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. Energy Metabolism Drugs Block Triple Negative Breast Metastatic Cancer Cell Phenotype. *Mol Pharm* 2018; 15: 2151-2164.
- Pikman Y, Alexe G, Roti G, Conway AS, Furman A, Lee ES, Place AE, Kim S, Saran C, Modiste R, Weinstock DM, Harris M, Kung AL, Silverman LB, Stegmaier K. Synergistic Drug Combinations with a CDK4/6 Inhibitor in T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Cancer Res* 2017; 23: 1012-1024.
- Pritchard R, Rodríguez-Enríquez S, Pacheco-Velázquez SC, Bortnik V, Moreno-Sánchez R, Ralph S. Celecoxib inhibits mitochondrial O<sub>2</sub> consumption, promoting ROS dependent death of murine and human metastatic cancer cells via the apoptotic signalling pathway. *Biochem Pharmacol* 2018; 154: 318-334.
- Ralph SJ, Pritchard R, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R, Ralph RK. Hitting the Bull's-Eye in Metastatic Cancers-NSAIDs Elevate ROS in Mitochondria, Inducing Malignant Cell Death. *Pharmaceuticals (Basel)* 2015; 8: 62-106.
- Robledo-Cadena, Diana Xochiquetzal (2016) *Efecto sinérgico de la Casiopeina II gly con drogas empleadas en el sector clínico sobre la proliferación del cáncer cervicouterino (CCU) HeLa* (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM. Ciudad de México, México.
- Rodríguez-Enríquez S, Vital-González PA, Flores-Rodríguez FL, Marín-Hernández A, Ruiz-Azuara L, Moreno-Sánchez R. Control of cellular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast-growing tumor cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 215: 208-217.
- 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 Cell Physiol* 2008; 216: 189-197.
- Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Carreño-Fuentes L, Moreno-Sánchez R. Targeting of cancer energy metabolism. *Mol Nutr Food Res*. 2009; 53: 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, Moreno-Sánchez R. Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42: 1744-1751.
- Rodríguez-Enríquez S, Hernández-Esquivel L, Marín-Hernández A, Dong LF, Akporiaye ET, Neuzil J, Ralph SJ, Moreno-Sánchez R. Molecular mechanism for the selective

- impairment of cancer mitochondrial function by a mitochondrially targeted vitamin E analogue. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1817: 1597-1607.
- Rodríguez-Enríquez S, Hernández-Esquivel L, Marín-Hernández A, El Hafidi M, Gallardo-Pérez JC, Hernández-Reséndiz I, Rodríguez-Zavala JS, Pacheco-Velázquez SC, Moreno-Sánchez R. Mitochondrial free fatty acid  $\beta$ -oxidation supports oxidative phosphorylation and proliferation in cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2016; 65 :209-221.
- Rodríguez-Enríquez S, Pacheco-Velázquez SC, Marín-Hernández Á, Gallardo-Pérez JC, Robledo-Cadena DX, Hernández-Reséndiz I, García-García JD, Belmont-Díaz J, López-Marure R, Hernández-Esquivel L, Sánchez-Thomas R, Moreno-Sánchez R. Resveratrol inhibits cancer cell proliferation by impairing oxidative phosphorylation and inducing oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2019; 370: 65-77.
- Rowinsky EK, Eisenhauer EA, Chaudhry V, Arbuck SG, Donehower RC. Clinica toxicities encountered with paclitaxel (Taxol). *Semin Oncol* 1992; 20: 1-15.
- Schönthal AH. Antitumor properties of dimethyl-celecoxib, a derivative of celecoxib that does not inhibit cyclooxygenase-2: implications for glioma therapy. *Neurosurg Focus* 2006; 20: E21.
- 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; 31: 1759-1763.
- Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T, Whelton A, Makuch R, Eisen G, Agrawal NM, Stenson WF, Burr AM, Zhao WW, Kent JD, Lefkowitz JB, Verburg KM, Geis GS. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. *Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. JAMA* 2000; 284: 1247-1255.
- Simon LS, Weaver AL, Graham DY, Kivitz AJ, Lipsky PE, Hubbard RC, Isakson PC, Verburg KM, Yu SS, Zhao WW, Geis GS. Anti-inflammatory and upper gastrointestinal effects of celecoxib in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *JAMA* 1999; 282: 1921-1928.
- Sobolewski C, Rhim J, Legrand N, Muller F, Cerella C, Mack F, Chateauvieux S, Kim JG, Yoon AY, Kim KW, Dicato M, Diederich M. 2,5-Dimethyl-celecoxib inhibits cell cycle progression and induces apoptosis in human leukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2015; 355: 308-328.
- Tallarida RJ. Drug synergism: its detection and applications. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 865-872.
- Tamulevicius P, Streffer C. Metabolic imaging in tumours by means of bioluminescence. *Br J Cancer* 1995; 72: 1102-1112.
- Tan Z, Luo X, Xiao L, Tang M, Bode AM, Dong Z, Cao Y. The Role of PGC1 $\alpha$  in Cancer Metabolism and its Therapeutic Implications. *Mol Cancer Ther* 2016; 15: 774-782.
- 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 II $\gamma$  induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia* 2005;7: 563-574.

- Tsujii M, Kawano S, DuBois RN: Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997; 94: 3336-3340.
- Vaupel PW, Frinak S, Bicher HI. Heterogeneous oxygen partial pressure and pH distribution in C3H mouse mammary adenocarcinoma. *Cancer Res* 1981; 41: 2008-2013.
- Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 1989; 49: 6449-6465.
- Valencia-Cervantes J, Huerta-Yepez S, Aquino-Jarquín G, Rodríguez-Enríquez S, Martínez-Fong D, Arias-Montaña JA, Dávila-Borja VM. Hypoxia increases chemoresistance in human medulloblastoma DAOY cells via hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ -mediated down regulation of the CYP2B6, CYP3A4 and CYP3A5 enzymes and inhibition of cell proliferation. *Oncol Rep* 2019; 4: 178-190.
- Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004; 10: 789-799.
- Walenta S, Schroeder T, Mueller-Klieser W. Metabolic mapping with bioluminescence: basic and clinical relevance. *Biomol Eng* 2002; 18: 249-262.
- Warburg, O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956; 124: 269–270.
- Wartenberg M, Frey C, Diedershagen H, Ritgen J, Hescheler J, Sauer H. Development of an intrinsic P-glycoprotein-mediated doxorubicin resistance in quiescent cell layers of large, multicellular prostate tumor spheroids. *Int J Cancer* 1999; 75: 855-863.
- Wawryk-Gawda E, Chylińska-Wrzos P, Lis-Sochocka. P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells. *Protoplasma* 2013; 251: 525-533.
- 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.
- Yang S, Guo R, Huang L, Yang L, Jiang D. Nimesulide inhibits the proliferation of HepG2 by up-regulation of Smad4. *Indian J Pharmacol* 2012; 44: 599-601.
- Zhang B, Yan Y, Li Y, Zhang D, Zeng J, Wang L, Wang M, Lin N. Dimethyl celecoxib sensitizes gastric cancer cells to ABT-737 via AIF nuclear translocation. *J Cell Mol Med* 2016; 20: 2148-2159.
- 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: 414-417.
- 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. *J Biol Chem* 2009; 284: 23225–23233.
- Zu XL, Guppy M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 459-465.

## 7.2 Anexo 1

### Análisis de genotipificación del Instituto Nacional de Medicina Genómica



**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      Resultado emitido el: 24 de Noviembre del 2015, 17:32 horas  
Entrego: Dra. Diana Xochiquetzal Robledo

**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		
NO. CASO LDG	00832	PERFIL GENÉTICO REPORTADO PARA:	
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. Beatriz E. 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 Tepepan, Delegación Tlalpan, México, D.F., C.P. 14610,  
Tel.: 52 (55) 53 50 19 31, [www.inmegen.gob.mx](http://www.inmegen.gob.mx)

### 7.3 Tabla suplementaria 1

Efecto supraaditivo de los fármacos antineoplásicos en combinación con celecoxib, DMC y CasII-gly sobre los MCTS

Efecto sobre el crecimiento de los MCTS (Protocolo preventivo)												
	A (nM)		B (nM)		A + B		A (nM)		B (nM)		A + B	
		%	Celecoxib	%		%	DMC	%		%	CasII-gly	%
<b>Control</b>	<b>Cisplatino</b>		<b>0.4</b>		<b>Cisplatino</b>		<b>1</b>		<b>Cisplatino</b>		<b>10</b>	
100	0	100	100	95	0	100	100	81	0	100	100	100
100	10	99	95	64	10	95	81	55	15	95	96	52
100	11	98	98	55	20	97	85	38	25	92	95	32
100	12	96	96	20	30	96	86	15	30	91	97	21
			<b>Celecoxib</b>				<b>DMC</b>				<b>CasII-gly</b>	
			<b>1</b>				<b>7</b>				<b>10</b>	
100	27	99	95	55	0	100	100	98	20	91	95	45
100	28	98	98	44	10	95	81	32	21	85	94	35
100	29	96	96	35	20	97	85	21	22	95	88	32
100	30	95	94	64	30	96	86	5	23	98	98	18
			<b>Celecoxib</b>				<b>DMC</b>				<b>CasII-gly</b>	
	<b>Paclitaxel</b>		<b>0.9</b>		<b>Paclitaxel</b>		<b>5</b>		<b>Paclitaxel</b>		<b>25</b>	
100	0	100	98	95	0	97	100	95	0	100	99	98
100	12	100	95	34	5	91	98	65	10	99	98	65
100	13	98	93	32	10	84	86	25	11	98	97	55
100	14	95	91	31	15	87	88	5	12	100	96	31
100	15	94	92	19	16	86	100	99	13	98	95	15
			<b>Celecoxib</b>				<b>DMC</b>				<b>CasII-gly</b>	
	<b>Doxorrubicina</b>		<b>0.5</b>		<b>Doxorrubicina</b>		<b>1</b>		<b>Doxorrubicina</b>		<b>15</b>	
100	0	99	98	87	0	99	99	99	0	100	99	97
100	10	94	97	65	10	95	98	62	10	97	95	45
100	20	92	94	54	20	92	97	51	20	89	92	32
100	30	96	93	32	30	91	96	34	30	85	89	24

100	40	93	90	10	40	81	95	25	35	100	100	98
			<b>Celecoxib</b>				<b>DMC</b>				<b>CasII-gly</b>	
100			<b>0.5</b>				<b>1</b>				<b>1</b>	
100	0	99	100	86	10	96	89	22	0.1	98	95	90.26
100	22	93	100	99	29	92	77	34	1	96	96	74.6
100	23	86	93	75	30	90	81	9	10	95	91	24.23
100	24	91	94	84	40	87	89	45	13	94	92	18.16

### Efecto sobre el crecimiento de los MCTS (Protocolo Curativo)

	A (µM)		B (µM)	A + B	A (µM)		B (µM)	A + B	A (µM)		B (µM)	A+B
		%	<b>Celecoxib</b>	%		%	<b>DMC</b>	%		%	<b>CasII-gly</b>	%
<b>Control</b>	<b>Cisplatino</b>		<b>0.7</b>		<b>Cisplatino</b>		<b>25</b>		<b>Cisplatino</b>		<b>50</b>	
100	0	100	100	89	0	98	100	84	0	100	100	100
100	1	98	95	65	1	96	98	35	10	99	95	35
100	3	96	94	25	2	95	95	24	11	98	97	27
100	5	95	92	14	5	91	96	8	12	97	96	9
			<b>Celecoxib</b>				<b>DMC</b>				<b>CasII-gly</b>	
	<b>Paclitaxel</b>		<b>2</b>		<b>Paclitaxel</b>		<b>30</b>		<b>Paclitaxel</b>		<b>10</b>	
100	0	100	100	94	0	100	100	98	0	99	98	99
100	15	98	95	65	15	95	98	65	5	98	95	74
100	17	97	94	42	17	96	96	35	10	96	94	72
100	20	96	91	15	20	91	94	10	15	95	96	70
			<b>Celecoxib</b>				<b>DMC</b>				<b>CasII-gly</b>	
	<b>Doxorrubicina</b>		<b>4</b>		<b>Doxorrubicina</b>		<b>35</b>		<b>Doxorrubicina</b>		<b>50</b>	
100	0	100	98	98	0	100	99	100	0	100	99	97
100	10	98	97	45	10	95	94	42	10	98	98	45
100	30	97	94	21	30	94	92	35	20	96	94	40
100	50	87	93	11	50	90	95	25	30	97	96	35

Las combinaciones fueron realizadas como se indica en la sección de material y métodos. A= fármacos canónicos (cisplatino, paclitaxel y doxorubicina), B= celecoxib, DMC y CasII-gly, A+B= es el efecto de la combinación sobre el crecimiento de los MCTS. DMC, Dimetilcelecoxib.

## 7.4 Tabla suplementaria 2

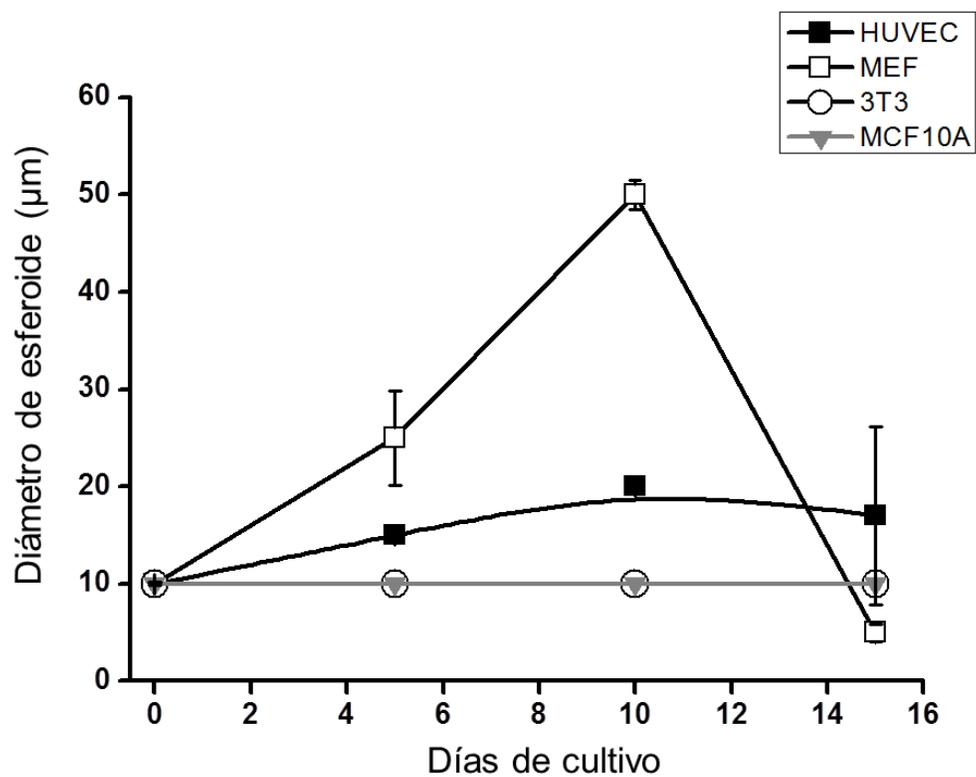
Efecto supraaditivo de los fármacos antineoplásicos (cisplatino, paclitaxel y doxorubicina) en combinación con celecoxib, DMC y CasII-gly sobre el cultivo bidimensional de HeLa

	A (µM)		B (µM)	A + B	A (µM)		B (µM)	A+B
		%	<b>Celecoxib</b>	%		%	<b>DMC</b>	%
<b>Control</b>	<b>Cisplatino</b>		<b>5</b>		<b>Cisplatino</b>		<b>15</b>	
100	0	100	98	100	0	100	100	100
100	1	95	95	100	1	95	81	100
100	2	97	99	94	2	97	85	80
100	3	96	94	35.9	3	96	86	25.89
100	4	94	93	24	4	91	97	17.23
100	5	89	94	5	5	86	94	10.89
			<b>Celecoxib</b>				<b>DMC</b>	
			<b>10</b>				<b>25</b>	
100	0	100	98	100	0	100	100	100
100	1	95	95	98.64	1	95	81	99.3
100	2	97	99	64.9	2	97	85	87.5
100	3	96	94	23.09	3	96	86	35.67
100	4	94	93	15.09	4	91	97	25.89
100	5	89	94	2.6	5	86	94	15.9
			<b>Celecoxib</b>				<b>DMC</b>	
	<b>Paclitaxel</b>		<b>50</b>		<b>Paclitaxel</b>		<b>20</b>	
100	0	100	87	100	0	100	100	100
100	10	98	85	97	10	99	98	100
100	12	97	84	65	12	95	96	69.08
100	14	85	95	76	14	98	95	76
100	16	87	87	53	16	84	98	53
			<b>Celecoxib</b>				<b>DMC</b>	
			<b>59</b>				<b>40</b>	
100	0	100	87	100	0	100	100	100

100	10	98	85	89.15	10	99	98	98.15
100	12	97	84	65.48	12	95	96	79.14
100	14	85	95	35.78	14	98	95	55.91
100	16	87	87	25.14	16	84	98	14.72
			<b>Celecoxib</b>				<b>DMC</b>	
	<b>Doxorrubicina</b>		<b>64</b>		<b>Doxorrubicina</b>		<b>25</b>	
100	0	100	87	100	0	100	99	100
100	10	94	88	96	10	99	98	95.9
100	12	95	85	86	12	96	97	75
100	14	87	95	54.9	14	92	96	34.9
100	16	88	81	55.9	16	91	95	55.9
			<b>Celecoxib</b>				<b>DMC</b>	
			<b>80</b>				<b>50</b>	
100	0	100	87	100	0	100	99	100
100	10	94	88	78.56	10	99	98	89.14
100	12	95	85	68.14	12	96	97	74.6
100	14	87	95	20.18	14	92	96	65.15
100	16	88	81	20.14	16	91	95	55.47

Las combinaciones fueron realizadas como se indica en la sección de material y métodos. A= fármacos canónicos (cisplatino, paclitaxel y doxorubicina), B= celecoxib, DMC y CasII-gly, A+B= es el efecto de la combinación sobre el crecimiento en monocapa de la línea celular HeLa. DMC, Dimetilcelecoxib.

## 7.5 Figura suplementaria 1



Crecimiento de los MCTS de diferentes líneas celulares no tumorales humanas (fibroblastos HUVEC, células epiteliales de glándula mamaria MCF10A) y de ratón (fibroblastos embrionarios MEF, fibroblastos 3T3). Cada punto representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de 30 esferoides provenientes de 3 cultivos independientes.

# Hypoglycemia Enhances Epithelial-Mesenchymal Transition and Invasiveness, and Restrains the Warburg Phenotype, in Hypoxic HeLa Cell Cultures and Microspheroids

ÁLVARO MARÍN-HERNÁNDEZ,\* JUAN CARLOS GALLARDO-PÉREZ, ILEANA HERNÁNDEZ-RESÉNDIZ, ISIS DEL MAZO-MONSALVO, DIANA XOCHIQUETZAL ROBLEDO-CADENA, RAFAEL MORENO-SÁNCHEZ, AND SARA RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ\*

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, México, Mexico

The accelerated growth of solid tumors leads to episodes of both hypoxia and hypoglycemia (HH) affecting their intermediary metabolism, signal transduction, and transcriptional activity. A previous study showed that normoxia (20% O<sub>2</sub>) plus 24 h hypoglycemia (2.5 mM glucose) increased glycolytic flux whereas oxidative phosphorylation (OxPhos) was unchanged versus normoglycemia in HeLa cells. However, the simultaneous effect of HH on energy metabolism has not been yet examined. Therefore, the effect of hypoxia (0.1–1% O<sub>2</sub>) plus hypoglycemia on the energy metabolism of HeLa cells was analyzed by evaluating protein content and activity, along with fluxes of both glycolysis and OxPhos. Under hypoxia, in which cell growth ceased and OxPhos enzyme activities, ΔΨ<sub>m</sub> and flux were depressed, hypoglycemia did not stimulate glycolytic flux despite increasing H-RAS, p-AMPK, GLUT1, GLUT3, and HK1 levels, and further decreasing mitochondrial enzyme content. The impaired mitochondrial function in HH cells correlated with mitophagy activation. The depressed OxPhos and unchanged glycolysis pattern was also observed in quiescent cells from mature multicellular tumor spheroids, suggesting that these inner cell layers are similarly subjected to HH. The principal ATP supplier was glycolysis for HH 2D monolayer and 3D quiescent spheroid cells. Accordingly, the glycolytic inhibitors iodoacetate and gossypol were more effective than mitochondrial inhibitors in decreasing HH-cancer cell viability. Under HH, stem cell-, angiogenic-, and EMT-biomarkers, as well as glycoprotein-P content and invasiveness, were also enhanced. These observations indicate that HH cancer cells develop an attenuated Warburg and pronounced EMT- and invasive-phenotype.

J. Cell. Physiol. 232: 1346–1359, 2017. © 2016 Wiley Periodicals, Inc.

Hypoxia (0.1–1% atmospheric O<sub>2</sub>) is considered the principal inducer of the glycolytic phenotype in fast growing tumor cells, in a process mediated by HIF-1α stabilization (Gatenby and Gillies, 2004; Okuyama et al., 2010; Rodríguez-Enríquez et al., 2010; Marín-Hernández et al., 2011). Prolonged and severe hypoxia (0.1–1% O<sub>2</sub> for 12–24 h) increases HIF-1α protein levels in several cancer cell lines (BxPC3, PCI-43, MiaPaCa2, HepG2, HCT116, HT 1080, and HeLa), which in turn promote substantial increases in the mRNA and protein levels of controlling and non-controlling glycolytic enzymes and transporters (2 to 18-fold), as well as in the glycolytic flux (1.5–6 times) versus normoxia (21% O<sub>2</sub>) (Ebert et al., 1996; Natsuizaka et al., 2007; Okuyama et al., 2010; Rodríguez-Enríquez et al., 2010; Marín-Hernández et al., 2011). Furthermore, prolonged and severe hypoxia decreases OxPhos flux (50–80%) in several cancer cell lines (Froese, 1962; Ebert et al., 1996; Papandreou et al., 2006; Rodríguez-Enríquez et al., 2010; Tello et al., 2011) by (i) lowering (50–70%) the mRNA content of several genes that encode functional subunits of cytochrome c oxidase (COXIII), NADH dehydrogenase (ND1), and ATP synthase (ATPase 6); and (ii) decreasing the content and activity (20–70%) of OxPhos (2OGDH, respiratory complex I and cytochrome c oxidase) and glutaminolysis (GA) enzymes.

In parallel to oxygen limitation from 31–86 μM to 3–13 μM dissolved O<sub>2</sub> in normoxia versus hypoxia, respectively (Vaupel

**Abbreviations:** 2-DG, 2-deoxyglucose; 2OG, 2-oxoglutarate; 2OGDH, 2-oxoglutarate dehydrogenase; CasII-gly, casiopeina II gly; CS, citrate synthase; EMT, epithelial-mesenchymal transition; Fru6P, fructose 6 phosphate; GDH, glutamate dehydrogenase; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; GLUT, glucose transporter; Glc, glucose; HH, hypoxia/hypoglycemia; HK, hexokinase; HPI/AMF, hexosephosphate isomerase/autocrine motility factor; ICDH, isocitrate dehydrogenase; IAA, iodoacetate; LDH, lactate dehydrogenase; MCTS, multicellular tumor spheroid; MDH, malate dehydrogenase; MMP-1, matrix metalloproteinase-1; NN, normoxia/normoglycemia; OxPhos, oxidative phosphorylation; PDH, pyruvate dehydrogenase; PRL, proliferative layer; QS, quiescent cell layer; SDH, succinate dehydrogenase.

The authors declare no conflicts of interest.

Contract grant sponsor: CONACyT-México;  
Contract grant numbers: 180322, 107183, 243249, 239930.

\*Correspondence to: Sara Rodríguez-Enríquez and Álvaro Marín Hernández, Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano No. 1, Col. Sección XVI, Tlalpan, México D.F. 14080, Mexico. E-mail: saren960104@hotmail.com (SR-E), marinhernandez@yahoo.com.mx (AM-H)

Manuscript Received: 14 July 2016

Manuscript Accepted: 22 September 2016

Accepted manuscript online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com): 23 September 2016.

DOI: 10.1002/jcp.25617

## Energy Metabolism Drugs Block Triple Negative Breast Metastatic Cancer Cell Phenotype

Silvia Cecilia Pacheco-Velázquez,<sup>†</sup> Diana Xochiquetzal Robledo-Cadena,<sup>†</sup> Ileana Hernández-Reséndiz,<sup>†</sup> Juan Carlos Gallardo-Pérez,<sup>†</sup> Rafael Moreno-Sánchez,<sup>†</sup> and Sara Rodríguez-Enríquez<sup>\*,†,‡,§</sup>

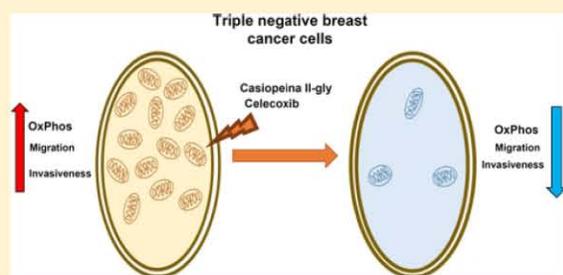
<sup>†</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, 14080 Tlalpan, CDMX, Mexico

<sup>‡</sup>Laboratorio de Medicina Traslacional, Instituto Nacional de Cancerología, 14080 Tlalpan, CDMX, Mexico

### Supporting Information

**ABSTRACT:** To establish alternative targeted therapies against triple negative (TN) breast cancer, the energy metabolism and the sensitivity of cell growth, migration, and invasiveness toward metabolic, canonical, and NSAID inhibitors were analyzed in MDA-MB-231 and MDA-MB-468, two TN metastatic breast cancer cell lines, under both normoxia (21% O<sub>2</sub>) and hypoxia (0.1% O<sub>2</sub>). For comparative purposes, the analysis was also carried out in the less-metastatic breast MCF-7 cancer cells. Under normoxia, oxidative phosphorylation (OxPhos) was significantly higher (2-times) in MDA-MB-468 than in MDA-MB-231 and MCF-7, whereas their glycolytic fluxes and OxPhos and glycolytic protein contents were all similar. TN cancer cell lines mainly depended on OxPhos (62–75%), whereas MCF-7 cells equally depended on both pathways for ATP supply. Hypoxia for 24 h promoted a significant increase (>20 times) in the glycolytic transcriptional master factor HIF1- $\alpha$  in its target proteins GLUT-1, HK1 and II, and LDH-A (2–4 times) as well as in the glycolytic flux (1.3–2 times) vs normoxia in MDA-MB-468, MDA-MB-231, and MCF-7. On the contrary, hypoxia decreased (15–60%) the contents of COXIV, 2OGDH, ND1, and ATP synthase as well as the OxPhos flux (50–75%), correlating with a high mitophagy level in the three cell lines. Under hypoxia, the three cancer cell lines mainly depended on glycolysis (70–80%). Anti-mitochondrial drugs (oligomycin, casiopeina II-gly, and methoxy-TEA) and celecoxib, at doses used to block OxPhos, significantly decreased TN cancer cell proliferation (IC<sub>50</sub> = 2–20  $\mu$ M), migration capacity (10–90%), and invasiveness (25–65%). The present data support the use of mitochondrially targeted inhibitors for the treatment of TN breast carcinoma.

**KEYWORDS:** breast cancer, celecoxib, glycolysis, energy metabolism drugs, oxidative phosphorylation, metastasis



### INTRODUCTION

The lack of specific chemotherapeutic treatments for the triple negative (TN) breast cancer subtype, as compared to estrogen receptor (ER)- and human epidermal growth factor receptor-2 (HER2)-positive breast cancer subtypes, has become a widespread public health problem that requires further research.<sup>1–3</sup> The current TN breast cancer treatments may be based on the combination of anthracyclines plus taxanes plus anti-metabolites.<sup>4,5</sup> However, the overall survival rates are significantly low in comparison to ER-positive patients.<sup>6</sup> Recently, novel adjuvant monotherapies or combination therapies have been tested in TN patients, including poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors, platinum-based drugs, monoclonal antibodies, and tyrosine kinase inhibitors.<sup>6,7</sup> TN patients under these other treatment schemes have shown high response (85% effectiveness) compared to the rest of the cancer subtypes (40–70%) after the first 3 months.<sup>8</sup> However, after a longer treatment (9 months), tumor recurrence in 34% of patients has emerged.<sup>1</sup>

Therefore, to improve TN patient treatment schemes, a better understanding of the illness is mandatory. In this regard, therapeutic

strategies based on their metabolic properties have been proposed for deterring TN breast cancer growth and metastasis.<sup>9,10</sup> There are several evidences indicating that high mitochondrial activity correlates with metastatic progression.<sup>11</sup> For instance, a higher mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) has been determined in TN metastatic breast cancer cell lines (BT20, MDA-MB-468, MDA-MB-231, and MDA-MB-436) vs ER and progesterone receptor (PR) positive breast cancer cell lines (BT474, MCF-7, T47D, and ZR751).<sup>12</sup>

Metastatic colon carcinoma also develops higher  $\Delta\psi_m$  compared to nonmetastatic colon cancer cells.<sup>13</sup> It has been observed that high  $\Delta\psi_m$  in colon cancer cells correlates with high levels of the canonical metastatic markers VEGF and MMP-7 as well as with enhanced invasiveness rate and chemoresistance.<sup>14</sup> Thus,  $\Delta\psi_m$  has been proposed as a potential marker for an acquired

Received: January 5, 2018

Revised: May 7, 2018

Accepted: May 10, 2018

Published: May 10, 2018



## REVIEW ARTICLE

WILEY *Journal of Cellular Physiology*

# Mutant p53<sup>R248Q</sup> downregulates oxidative phosphorylation and upregulates glycolysis under normoxia and hypoxia in human cervix cancer cells

Ileana Hernández-Reséndiz<sup>1</sup> | Juan Carlos Gallardo-Pérez<sup>1</sup> | Ambar López-Macay<sup>2</sup> |  
Diana Xochiquetzal Robledo-Cadena<sup>1</sup> | Enrique García-Villa<sup>3</sup> | Patricio Gariglio<sup>3</sup> |  
Emma Saavedra<sup>1</sup> | Rafael Moreno-Sánchez<sup>1</sup> | Sara Rodríguez-Enríquez<sup>1,4</sup> <sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Ciudad de México, México<sup>2</sup>Laboratorio de Enfermedades Neuromusculares, Instituto Nacional de Rehabilitación, Ciudad de México, México<sup>3</sup>Laboratorio de Biología y Genética Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional-Zacatenco, Ciudad de México, México<sup>4</sup>Laboratorio de Medicina Translacional, Instituto Nacional de Cancerología, Ciudad de México, México**Correspondence**Sara Rodríguez-Enríquez, Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano No. 1, Col. Sección XVI, Tlalpan, México 14080, Mexico.  
Email: sara.rodriguez@cardiologia.org.mx; saren960104@hotmail.com**Funding information**

CONACyT-México, Grant/Award Numbers: 239930, 281428, 283144, 243249

**Abstract**

Mutations in p53 are strongly associated with several highly malignant cancer phenotypes but its role in regulating energy metabolism has not been completely elucidated. The effect on glycolysis and oxidative phosphorylation (OxPhos) of mutant p53<sup>R248Q</sup> overexpression in HeLa cells (HeLa-M) was analyzed and compared with cells overexpressing wild-type p53 (HeLa-H) and nontransfected cells containing negligible p53 levels (HeLa-L). p53<sup>R248Q</sup> overexpression induced early cell detachment during in vitro growth; however, detached HeLa-M cells showed high viability, shorter generation time and significant diminution in the adhesion proteins E-cadherin and  $\beta$ -catenin versus HeLa-H and HeLa-L cells. Under normoxia, a lower growth rate of attached HeLa-M cells correlated with decreased levels of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), mitochondrial proteins (20–80%) and OxPhos flux (69  $\pm$  12%). On the contrary, HeLa-M also showed increased contents of CDKN1A, nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), c-MYC, hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ; 1–4 times), glycolytic HIF-1 $\alpha$  targets (2–4 times), and glycolysis flux (2-fold) versus HeLa-H. In consequence, glycolysis provided ~70% of the cellular adenosine triphosphate (ATP) in HeLa-M cells under normoxia whereas, OxPhos predominated (65–82%) in HeLa-H and HeLa-L cells. Pifithrin- $\alpha$ , a specific p53 inhibitor, did not alter the p53<sup>R248Q</sup> target protein contents and OxPhos and glycolytic fluxes, and a poor HIF-1 $\alpha$ -p53<sup>R248Q</sup> interaction was attained, in HeLa-M cells. These observations suggested that p53<sup>R248Q</sup> deficiently interacted with pifithrin- $\alpha$  and HIF-1 $\alpha$ . Therefore, lower mitochondrial biogenesis, deficient HIF-1 $\alpha$ /mutant p53 interaction, and development of a pseudohypoxic state under normoxia were the apparent biochemical mechanisms underlying glycolysis activation and OxPhos downregulation in HeLa-M cells.

**Abbreviations:** ATPs, ATP synthase; COXIV, cytochrome c oxidase subunit 4; GA-L, glutaminase-L; GLUT, glucose transporter; HeLa-H, HeLa cells overexpressing nonmutant p53 protein; HeLa-L, wild-type HeLa cells containing negligible p53 protein level; HeLa-M, HeLa cells overexpressing mutant p53<sup>R248Q</sup> protein; HK, hexokinase; ND1, NADH dehydrogenase subunit 1; OxPhos, oxidative phosphorylation; PDH, pyruvate dehydrogenase; PFK1, phosphofructokinase 1; PFT- $\alpha$ , pifithrin- $\alpha$ ; PGAM, phosphoglycerate mutase; TIGAR, TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator;  $\Delta\Psi_m$ , the electrical potential difference across the inner mitochondrial membrane; ZOGDH, 2-oxoglutarate dehydrogenase.



## Resveratrol inhibits cancer cell proliferation by impairing oxidative phosphorylation and inducing oxidative stress

Sara Rodríguez-Enríquez<sup>a,\*</sup>, Silvia Cecilia Pacheco-Velázquez<sup>a</sup>, Álvaro Marín-Hernández<sup>a</sup>, Juan Carlos Gallardo-Pérez<sup>a</sup>, Diana Xochiquetzal Robledo-Cadena<sup>a</sup>, Ileana Hernández-Reséndiz<sup>a</sup>, Jorge Donato García-García<sup>a</sup>, Javier Belmont-Díaz<sup>a</sup>, Rebeca López-Marure<sup>b</sup>, Luz Hernández-Esquivel<sup>a</sup>, Rosina Sánchez-Thomas<sup>a</sup>, Rafael Moreno-Sánchez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Fisiología, Instituto Nacional de Cardiología, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Antioxidant response  
Cancer  
Oxidative phosphorylation  
ROS production  
Mitophagy

### ABSTRACT

The resveratrol (RSV) efficacy to affect the proliferation of several cancer cell lines was initially examined. RSV showed higher potency to decrease growth of metastatic HeLa and MDA-MB-231 (IC<sub>50</sub> = 200–250 μM) cells than of low metastatic MCF-7, SiHa and A549 (IC<sub>50</sub> = 400–500 μM) and non-cancer HUVEC and 3T3 (IC<sub>50</sub> ≥ 600 μM) cells after 48 h exposure. In order to elucidate the biochemical mechanisms underlying RSV anti-cancer effects, the energy metabolic pathways and the oxidative stress metabolism were analyzed in HeLa cells as metastatic-type cell model. RSV (200 μM/48 h) significantly decreased both glycolysis and oxidative phosphorylation (OxPhos) protein contents (30–90%) and fluxes (40–70%) vs. non-treated cells. RSV (100 μM/1–5 min) also decreased at a greater extent OxPhos flux (net ADP-stimulated respiration) of isolated tumor mitochondria (> 50%) than of non-tumor mitochondria (< 50%), particularly with succinate as oxidizable substrate. In addition, RSV promoted an excessive cellular ROS (2–3 times) production corresponding with a significant decrement in the SOD activity (but not in its content) and GSH levels; whereas the catalase, glutathione reductase, glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase activities (but not their contents) remained unchanged. RSV (200 μM/48 h) also induced cellular death although not by apoptosis but rather by promoting a strong mitophagy activation (65%). In conclusion, RSV impaired OxPhos by inducing mitophagy and ROS over-production, which in turn halted metastatic HeLa cancer cell growth.

### 1. Introduction

The beneficial role of several phytochemicals for multiple illnesses (cardiovascular events, obesity, diabetes and cancer) has been widely documented (Szkudelska and Szkudelski, 2010; Jiang et al., 2017). Particularly, resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene, RSV) a natural polyphenol found in large quantities in grapes, berries and peanuts has shown multiple positive effects on normal cells (Mukherjee et al., 2010; Baarine et al., 2011). At 0.1–50 μM doses, RSV (a) activates signaling and transcription factors involved in cell-cycle regulation, apoptosis, angiogenesis, antioxidant mechanism; and down-regulates

cyclooxygenase 2 and NF-κB in immune cells (Gao et al., 2001; Švajger and Jeras, 2012); (b) shows ROS scavenger capacity (increasing NOS expression and SIRT1 activation) improving mitochondrial function in heart (Turan et al., 2012) whereas in neurons, RSV shows a protective role against Alzheimer's and Parkinson's diseases in aging models (Richard et al., 2011); and (c) inhibits initiation, promotion and progression of cancer development with apparent low toxicity for normal cells (Kueck et al., 2007; Gwak et al., 2015).

In cancer cells, RSV (15–50 μM for 24–72 h) arrests the cellular cycle, induces apoptosis and promotes a massive reactive oxygen species (ROS) production (García-Zepeda et al., 2013). RSV also decreases

**Abbreviations:** ATPS, ATP synthase; ANT, adenine nucleotide translocase; CAT, catalase; Cys, cysteine; CS, citrate synthase; COX, cytochrome c oxidase; CHP, cumene hydroperoxide; DHE, dihydroethidium; GA, glutaminase; GLUT1, glucose transporter 1; GLUT2, glucose transporter 2; GSH, glutathione; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GDH, glutamate dehydrogenase; GST, glutathione S-transferase; HKI, hexokinase I; HKII, hexokinase II; HPI, hexose phosphate isomerase; MCTS, multi-cellular tumor spheroids; NBT, nitroblue tetrazolium; NDI, NADH dehydrogenase subunit 1; RSV, resveratrol; SOD, superoxide dismutase; *t*-BHP, *tert*-butylhydroperoxide; 2OGDH, 2-oxoglutarate dehydrogenase; γ-EC, gamma-glutamylcysteine.

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [sara.rodriguez@cardiologia.org.mx](mailto:sara.rodriguez@cardiologia.org.mx) (S. Rodríguez-Enríquez), [rafael.moreno@cardiologia.org.mx](mailto:rafael.moreno@cardiologia.org.mx) (R. Moreno-Sánchez).

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.03.008>

Received 19 November 2018; Received in revised form 5 March 2019; Accepted 11 March 2019

Available online 13 March 2019

0041-008X/© 2019 Published by Elsevier Inc.



## Heart myxoma develops oncogenic and metastatic phenotype

Silvia Cecilia Pacheco-Velázquez<sup>1</sup> · Juan Carlos Gallardo-Pérez<sup>1</sup> · Daniel Díaz<sup>2</sup> · Alhelí Adán-Ladrón de Guevara<sup>1</sup> · Diana Xochiquetzal Robledo-Cadena<sup>1</sup> · Emma Saavedra<sup>1</sup> · Luz Ruiz-Godoy<sup>3</sup> · Luis Roberto Jimenez-Hernández<sup>4</sup> · Jesús Vargas-Barrón<sup>4</sup> · José Luis Aguilar-Ponce<sup>3</sup> · Sara Rodríguez-Enríquez<sup>1</sup>

Received: 22 November 2018 / Accepted: 13 March 2019  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

### Abstract

**Purpose** Heart myxomas have been frequently considered as benign lesions associated with Carney's complex. However, after surgical removal, myxomas re-emerge causing dysfunctional heart.

**Methods** To identify whether cardiac myxomas may develop a metastatic phenotype as occurs in malignant cancers, a profile of several proteins involved in malignancy such as oncogenes (c-MYC, K-RAS and H-RAS), cancer-associated metabolic transcriptional factors (HIF-1 $\alpha$ , p53 and PPAR- $\gamma$ ) and epithelial–mesenchymal transition proteins (fibronectin, vimentin,  $\beta$ -catenin, SNAIL and MMP-9) were evaluated in seven samples from a cohort of patients with atrial and ventricular myxomas. The analysis was also performed in: (1) cardiac tissue surrounding the area where myxoma was removed; (2) non-cancer heart tissue (NCHT); and (3) malignant triple negative breast cancer biopsies for comparative purposes.

**Results** Statistical analysis applying univariate (Kruskal–Wallis and Dunn's tests) and multivariate analyses (PCA, principal component analysis) revealed that heart myxomas (7–15 times) and myxoma surrounding tissue (22–99 times) vs. NCHT showed high content of c-MYC, p53, vimentin, and HIF-1 $\alpha$ , indicating that both myxoma and its surrounding area express oncogenes and malignancy-related proteins as occurs in triple negative breast cancer.

**Conclusions** Based on ROC (receiver operating characteristics) statistical analysis, c-MYC, HIF-1 $\alpha$ , p53, and vimentin may be considered potential biomarkers for malignancy detection in myxoma.

**Keywords** Heart myxoma · Malignancy · Metastasis · Metastatic biomarkers · Oncogenic profile

### Introduction

Myxomas are the most common benign primary heart tumors followed by lipomas and papillary fibroelastomas (Singh et al. 2015). They can be developed in the four heart chambers (Vargas-Barron et al. 1991), being left atrium (80%) the most common site (Tarelo-Saucedo et al. 2016; Kothari et al. 2016). The disorder is transmitted within families in an autosomal dominant manner with higher occurrence in young women (Siltanen et al. 1976). Myxoma is also a primary component of the Carney's complex, a multiple familial neoplasia/lentiginous syndrome (Carney 1985; Vargas-Alarcón et al. 2008).

Although its origin is not clear, it is hypothesized that heart myxoma arises from sub-endothelial cells or primitive cells residing in the *fossa ovalis* and surrounding endocardium (Burke et al. 2007). Additionally, it has been proposed that Herpes simplex virus DNA infection may be involved in the pathogenesis of atrial myxoma (Pateras et al. 2012).

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00432-019-02897-0>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Sara Rodríguez-Enríquez  
saren960104@hotmail.com;  
sara.rodriquez@cardiologia.org.mx

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano No. 1. Col Sección XVI, Tlalpan, Mexico City, Mexico

<sup>2</sup> Centro de Ciencias de la Complejidad (C3), UNAM, Mexico City, Mexico

<sup>3</sup> Banco de Tumores, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City, Mexico

<sup>4</sup> Dirección de Investigación, Instituto Nacional de Cardiología, Mexico City, Mexico