



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
CARRERA DE BIOLOGÍA**

**LAS SALES DE LITIO COMO  
REGULADORAS DE LA  
AUTOFAGIA EN UN MODELO *IN  
VITRO* DE CÁNCER CERVICAL:  
UN ENFOQUE HACIA NUEVAS  
TERAPIAS.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**

**GARETH OMAR ROSTRO ALONSO**

**JURADO DE EXAMEN**

**DIRECTORA: DRA. GABRIELA FIGUEROA GONZÁLEZ**

**ASESOR: DR. OCTAVIO DANIEL REYES HERNÁNDEZ**

**ASESORA: DRA. MARIA LUISA ESCOBAR SÁNCHEZ**

**SINODAL: DRA. ROSA LINARES CULEBRO**

**SINODAL: M. EN C. MARÍA CRISTINA ALVARADO  
DOMÍNGUEZ**



**CD. MX. ABRIL DEL 2024**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTE PROYECTO SE CONTÓ CON EL APOYO FINANCIERO Y ACADÉMICO DEL PROYECTO PAPIIT – IA208422, PAPIIT - IA206724, PAPIIT - IN222321 Y PAPIIT - IN221824 POR PARTE DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADÉMICO (DGAPA).**

**EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE FARMACOGENÉTICA DE LA UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL ZARAGOZA (UMIEZ) DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. GABRIELA FIGUEROA GONZÁLEZ.**

A mi abuela y madre, quien tiene la  
sonrisa más bella de todas...

Antonia de la Rosa Hernández

A los pilares que siempre me  
brindaron su fe y apoyo  
incondicional, guiándome y  
enseñándome el camino a seguir  
durante estos 10 años.

A Magdalena, Guadalupe, Lourdes  
y Eric.

## AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Gabriela Figueroa González y el Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández por sus valiosas aportaciones para la realización de este trabajo, por aceptarme en su grupo de investigación, incluirme en sus proyectos, adoptarme como su hijo académico y permitirme adquirir conocimiento dentro y fuera del laboratorio, brindarme la oportunidad de conocer nuevas experiencias, así como el gran apoyo que me han dado desde el día 1, infinitas gracias.
- A la Dra. María Luisa Escobar Sánchez por nutrir este proyecto con sus observaciones y experiencia en el estudio de la autofagia.
- A la Dra. Rosa Linares Culebro por sus valiosas aportaciones para la mejora del presente trabajo.
- A la M. EN C. María Cristina Alvarado Domínguez por contribuir a este trabajo con sus valiosas aportaciones.
- Al Dr. Luis Sánchez Sánchez por apoyarme con el préstamo de equipo de su laboratorio para poder realizar este proyecto.
- A la generación 1: Dr. Yebrán, Alan, Karen, Isrra, y Carlos por ser mis amigos a pesar de todo, por las risas y por tener en común el deseo de echar a andar el laboratorio. Mención especial al Dr. Yebrán, Carlos e Isrra cuyos conocimientos y consejos fueron de gran ayuda para este trabajo.
- A la generación 2: Jorge, Jan, Axel y Pao por las risas, y experiencias juntos dentro del laboratorio.
- A la generación 3: Sam, Xime, Joana, Les y Evelin, por hacerme reír con sus ocurrencias. Mención especial para Evelin, quien fue una gran alumna y me apoyó con parte del experimento, muchas gracias.
- A mis compañeros del laboratorio 6, piso 2, UMIEZ, FES Zaragoza: Fer, Luis y Dani por apoyarme compartiéndome sus consejos y experiencias.
- A mi abuela Antonia de la Rosa Hernández por recibirme con un plato de comida siempre que volvía de la escuela, por criarme y alegrar mis días con sus carcajadas y sonrisa.

- A mi tía Magdalena, por adoptarme en una etapa complicada, por sentarse a estudiar conmigo todos los días, enseñarme el camino de la disciplina en el deporte, por apoyarme en cada actividad y emprendimiento nuevo que se me ocurría, por haberme sacado adelante sin rendirse, nada de esto habría sido posible sin ti. No ha sido fácil, pero aquí estamos.
- A mi madrina Guadalupe, por también haberme adoptado, por ayudarme a hacer mis disfraces desde pequeño, por sentarse a enseñarme inglés, por haber aportado todo lo que estuvo en sus manos durante estos 10 años. Gracias por seguir siendo mi madrina a pesar de todo.
- A mi tía Lourdes por siempre hacerme saber cuánta fe y confianza tenía en mí, por apoyarme incondicionalmente, por procurar mi salud, por siempre salvarme de emergencias, por siempre recordarme cuanto me quiere y sobre todo por motivarme con sus pláticas en las muchas ocasiones que quería rendirme en la escuela. “Nadie llega solo”.
- A mi tío Eric, por mostrarme el camino de la Biología, por adoptarme y permitirme vivir experiencias nuevas, por apoyarme en todo lo que ha podido sin dudar, por enseñarme que “hay que ser generosos con el conocimiento” y “ser gentil cuesta arriba, nunca sabes a quien podrías encontrarte cuesta abajo”. “This is the way”.
- A mis tíos que también me han apoyado enormemente desde antes de que tuviera uso de razón: tía Mónica, tío Germán, tío Jose Antonio, a mi tía Verónica, tía Patricia, tío Paco, tía Lidia, a mi abuela Santa y mi tía Laura,
- A mi primo Isaac, por ser mi hermano desde que somos bebés, por apoyarme y siempre ser relajado y sencillo conmigo. A mis primos Alexis, Karen, Fernanda, Getse, Dante y Elías.
- A mi preciosa perrita Candy, quien se levantaba a recibirme todas las noches que volvía tarde del laboratorio y a mi gato Evan a quien tanto quiero, por ser mi compañía, especialmente en las noches de velada por las tareas.
- A quien me enseñó a no conformarme y también a quien me inculcó la lectura, me habló de la relatividad, de la curvatura de la tierra, de las montañas, de peces, del espacio, etc. También gracias ellos.

# Índice general

<b>1. Abreviaturas</b> .....	<b>11</b>
<b>2. Resumen</b> .....	<b>12</b>
<b>3. Introducción</b> .....	<b>13</b>
<b>4. Marco teórico</b> .....	<b>15</b>
4.1 Cáncer.....	15
4.1.1 <i>Hallmarks del cáncer</i> .....	16
4.1.2 <i>Cáncer cervical</i> .....	17
4.1.3 <i>Cáncer cervical en México</i> .....	20
4.2 Autofagia .....	20
4.2.1 <i>Autofagia en células tumorales</i> .....	22
4.2.2 <i>Eje PI3K/AKT/mTOR</i> .....	23
4.2.3 <i>Maquinaria pre-autofagosomal</i> .....	25
4.2.4 <i>El flujo autofágico</i> .....	27
4.2.5 <i>Marcadores moleculares del flujo autofágico</i> .....	29
4.3 Reposicionamiento del litio como fármaco antitumoral .....	31
<b>5. Planteamiento del problema y Pregunta de investigación</b> .....	<b>34</b>
<b>6. Hipótesis</b> .....	<b>35</b>
<b>7. Objetivos</b> .....	<b>36</b>
7.1 Objetivo general.....	36
7.2 Objetivos particulares .....	36
<b>8. Material y métodos</b> .....	<b>37</b>
8.1 Cultivo celular .....	37
8.2 Western blot .....	38
8.3 Detección de Autofagia mediante CYTO-ID® .....	39
8.4 Análisis estadístico .....	39
<b>9. Resultados</b> .....	<b>40</b>
9.1 Patrones temporales en células HeLa: efecto de los estímulos en la inducción de autofagia. ....	41
9.1.1 <i>3 Horas</i> .....	41
9.1.2 <i>6 Horas</i> .....	43

9.1.3 12 Horas .....	45
9.1.4 24 Horas .....	48
9.1.5 El flujo autofágico mediado por LiCl en células HeLa.....	52
9.1.6 El flujo autofágico mediado por Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> en células HeLa. ....	54
9.1.7 Síntesis de autofagosomas durante 24 horas. ....	56
9.2 Patrones temporales en células SiHa: efecto de los estímulos en la inducción de autofagia. ....	57
9.2.1 3 Horas .....	57
9.2.2 6 Horas .....	59
9.2.3 12 Horas .....	61
9.2.4 24 Horas .....	63
9.2.5 El flujo autofágico mediado por LiCl en células SiHa. ....	66
9.2.6 El flujo autofágico mediado por Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> en células SiHa. ....	68
9.2.7 Síntesis de autofagosomas de células SiHa durante 24 horas. ....	70
<b>10. Discusión.....</b>	<b>71</b>
10.1 Inducción de autofagia en células HeLa y SiHa estimuladas con LiCl y Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....	71
10.2 El flujo autofágico en células HeLa y SiHa estimuladas con LiCl y Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> . ....	72
10.3 Mecanismos de acción de las sales de litio como inductoras de autofagia.....	74
10.4 Posibles aplicaciones terapéuticas del LiCl y Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> en cáncer. ....	78
10.5 Limitaciones del estudio y perspectivas a futuro. ....	79
<b>11. Conclusiones .....</b>	<b>81</b>
<b>12. Anexos .....</b>	<b>82</b>
<b>13. Bibliografía.....</b>	<b>84</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b>	Hallmarks del cáncer.....	<b>17</b>
<b>Figura 2</b>	Características del cáncer cervical. ....	<b>18</b>
<b>Figura 3</b>	Incidencia y mortalidad de diferentes tipos de cáncer a nivel mundial y nacional.....	<b>19</b>
<b>Figura 4</b>	Proceso autofágico.....	<b>21</b>
<b>Figura 5</b>	Papel dual de la autofagia.....	<b>23</b>
<b>Figura 6</b>	Vía de señalización de la autofagia dependiente de mTOR.....	<b>25</b>
<b>Figura 7</b>	Maquinaria pre-autofagosomal.....	<b>26</b>
<b>Figura 8</b>	Flujo autofágico.....	<b>28</b>
<b>Figura 9</b>	Marcadores del flujo autofágico.....	<b>30</b>
<b>Figura 10</b>	Estructura química condensada de las sales de litio.....	<b>32</b>
<b>Figura 11</b>	Evaluación mediante Western Blot de la actividad autofágica en células HeLa estimuladas por 3 horas.....	<b>41</b>
<b>Figura 12</b>	Evaluación mediante Cyto-ID de la actividad autofágica en células HeLa estimuladas por 3 horas.....	<b>42</b>
<b>Figura 13</b>	Evaluación mediante Western Blot de la actividad autofágica en células HeLa estimuladas por 6 horas.....	<b>43</b>
<b>Figura 14</b>	Evaluación mediante Cyto-ID de la actividad autofágica en células HeLa estimuladas por 6 horas.....	<b>44</b>
<b>Figura 15</b>	Evaluación mediante Western Blot de la actividad autofágica en células HeLa estimuladas por 12 horas.....	<b>46</b>
<b>Figura 16</b>	Evaluación mediante Cyto-ID de la actividad autofágica en células HeLa estimuladas por 12 horas.....	<b>47</b>
<b>Figura 17</b>	Evaluación mediante Western Blot de la actividad autofágica en células HeLa estimuladas por 24 horas.....	<b>49</b>
<b>Figura 18</b>	Evaluación mediante Cyto-ID de la actividad autofágica en células HeLa estimuladas por 24 horas.....	<b>50</b>
<b>Figura 19</b>	Comparativa del flujo autofágico en células HeLa mediado por LiCl durante 24 horas.....	<b>51</b>
<b>Figura 20</b>	Comparativa del flujo autofágico en células HeLa mediado por Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> durante 24 horas.....	<b>53</b>
<b>Figura 21</b>	Comparativa de los niveles de expresión de LC3β en células HeLa mediado por LiCl/CQ, Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /CQ y CQ durante 24 horas.....	<b>55</b>
<b>Figura 22</b>	Evaluación mediante Western Blot de la actividad autofágica en células SiHa estimuladas por 3 horas.....	<b>57</b>
<b>Figura 23</b>	Evaluación mediante Cyto-ID de la actividad autofágica en células SiHa estimuladas por 3 horas.....	<b>58</b>
<b>Figura 24</b>	Evaluación mediante Western Blot de la actividad autofágica en células SiHa estimuladas por 6 horas.....	<b>59</b>
<b>Figura 25</b>	Evaluación mediante Cyto-ID de la actividad autofágica en células SiHa estimuladas por 6 horas.....	<b>60</b>

<b>Figura 26</b>	Evaluación mediante Western Blot de la actividad autofágica en células SiHa estimuladas por 12 horas.....	<b>61</b>
<b>Figura 27</b>	Evaluación mediante Cyto-ID de la actividad autofágica en células SiHa estimuladas por 12 horas.....	<b>62</b>
<b>Figura 28</b>	Evaluación mediante Western Blot de la actividad autofágica en células SiHa estimuladas por 24 horas.....	<b>63</b>
<b>Figura 29</b>	Evaluación mediante Cyto-ID de la actividad autofágica en células SiHa estimuladas por 24 horas.....	<b>64</b>
<b>Figura 30</b>	Comparativa del flujo autofágico en células SiHa mediado por LiCl durante 24 horas.....	<b>65</b>
<b>Figura 31</b>	Comparativa del flujo autofágico en células SiHa mediado por Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> durante 24 horas.....	<b>67</b>
<b>Figura 32</b>	Comparativa de los niveles de expresión de LC3β en células SiHa mediado por LiCl/CQ, Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /CQ y CQ durante 24 horas.	<b>69</b>
<b>Figura 33</b>	Propuesta de las interacciones moleculares relacionadas con la inducción de autofagia mediada por sales de litio.....	<b>77</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1</b>	Concentraciones de los estímulos aplicados a cada línea celular.	<b>41</b>
----------------	--	-----------

## 1. Abreviaturas

<b>CQ</b>	Cloroquina
<b>R</b>	Rapamicina
<b>SE</b>	Sin estímulo
<b>LiCl</b>	Cloruro de litio
<b>Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Carbonato de litio
<b>R/ CQ</b>	Tratamiento combinatorio de rapamicina y cloroquina
<b>LiCl/CQ</b>	Tratamiento combinatorio de cloruro de litio y cloroquina
<b>Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/CQ</b>	Tratamiento combinatorio de carbonato de litio y cloroquina
<b>mTOR</b>	Blanco de rapamicina en mamíferos
<b>LC3B</b>	Proteína ligera 3B
<b>p62/SQSTM1</b>	Sequestosome-1
<b>VPH</b>	Virus del papiloma humano
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico
<b>RPMI</b>	Medio de cultivo
<b>IMPasa</b>	Inositol monofosfatasa
<b>PI</b>	Fosfatidil inositol
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol 1,4,5-trifosfato
<b>IP<sub>3</sub>R</b>	IP3 Receptor
<b>PIP<sub>3</sub></b>	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
<b>PI3P</b>	Fosfatidilinositol 3-fosfato
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
<b>AKT</b>	Proteína kinasa-Serina/Treonina
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-kinasa
<b>pRB</b>	Proteína del retinoblastoma
<b>p53</b>	Proteína 53

## 2. Resumen

Las células cancerosas carecen de un propósito específico dentro del organismo humano, cuentan con numerosas desregulaciones metabólicas, genéticas y epigenéticas que dan paso a un fenotipo celular carente de un ciclo celular común. En el caso del cáncer cervical, las desregulaciones anteriormente mencionadas están vinculadas, entre otras causas, a la presencia de material genético del VPH (Virus del Papiloma Humano), que origina mutaciones en proteínas supresoras de tumores, tales como pRB y p53, por lo que al igual que en otros tipos de cáncer, existe un gran interés por encontrar la forma de revertir los múltiples hallmarks que hacen que los tratamientos anticancerígenos tengan una eficacia baja.

Múltiples estudios se han centrado en la caracterización de la vía de la autofagia y su función en células de mamíferos, sin embargo, lo que aún permanece como una caja negra, es el papel dual que puede tener dicho proceso catabólico, particularmente en células cancerígenas, ya que dependiendo del contexto biológico en que se encuentre, puede inhibir o promover la progresión tumoral, por lo que el presente trabajo se centró en la evaluación de la inducción de autofagia y estatus del flujo autofágico mediado por sales de litio en células HeLa y SiHa a tiempos de 3, 6, 12 y 24 horas. Se analizó la expresión de las proteínas LC3 $\beta$  y p62 mediante Western Blot y se determinó si existía presencia de autofagosomas mediante microscopía epifluorescente. Los resultados obtenidos fueron diferentes entre los modelos *in vitro* utilizados.

### 3. Introducción

El cáncer reúne los trastornos metabólicos y moleculares más enigmáticos que existen dentro de la investigación científica, trastornos que se resumen a una rebelión de células que comienzan a dividirse tanto como sus telómeros se lo permiten, evadiendo la muerte celular programada y, en la mayoría de los casos, concluyendo en la muerte del individuo. Se trata de una rebelión tan ancestral que las células que conforman a los animales están dotadas de “interruptores” encargados de frenar dicho proceso mediante la inducción de suicidio celular. Tal como lo desveló Bruce Ames (Ames, 1962), se sabe que el cáncer es un conjunto de enfermedades diversas, cuyas causas son mayormente externas, pues agentes físicos y químicos tienen la capacidad de producir daños en el ADN (Ridley, 1999). En 1909, Peyton Rous propuso la existencia de un tercer agente involucrado en la progresión tumoral, demostró que un pollo afectado por un sarcoma podía transmitir la enfermedad a otro pollo sano, sugiriendo así que el cáncer podía contagiarse. Aunque su propuesta no fue aceptada, en los primeros años de la década de los 80's el Virólogo Alemán Harold zur Hausen demostró por primera vez la relación entre la infección genital por Virus del Papiloma Humano (VPH) y el cáncer cervical, y en 1996 la World Health Association reconoció el VPH como una causa importante del cáncer cervical (Burd, 2003).

El cáncer cervical es un conjunto de enfermedades cuyas características principales son el crecimiento, desarrollo y ausencia en el control y orden de la multiplicación de las células del cuello uterino, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, es el cuarto tipo de cáncer más frecuente en mujeres a nivel mundial,

causando el 1.09% de las muertes en el mundo en el año 2019 (Organización Mundial de la Salud, 2022).

Si queremos encontrar algún día la cura del cáncer, antes debemos comprender la función de los oncogenes, de genes supresores de tumores y de la compleja maquinaria metabólica característica de una célula cancerosa. Se tiene conocimiento de la desregulación metabólica que generan las oncoproteínas E6 y E7 del VPH sobre p53 y el control de la muerte celular programada por apoptosis (Bhattacharjee *et al.*, 2022), lo cual ha ocasionado que los estudios científicos se enfoquen a la exploración de rutas metabólicas alternas para reactivar esta vía, o bien, para inducir otro tipo de muerte celular, como lo es la autofagia, un proceso catabólico que puede jugar un rol dual, es decir, puede favorecer la progresión tumoral o puede actuar como supresora de tumores, esto depende en gran parte del contexto en que se encuentre la célula, pues si se logra inducir una autofagia sostenida o constante dentro de una célula, esta puede sucumbir ante el estrés y desencadenar una muerte celular programada (Lum *et al.*, 2005).

## 4. Marco teórico

### 4.1 Cáncer

El cáncer es el crecimiento anormal de células que carecen de un propósito funcional dentro del organismo, estas pueden propagarse hacia otras células, órganos adyacentes o incluso a otras partes del organismo (Roy & Saikia, 2016; Wang *et al.*, 2018.). El cáncer no era una enfermedad común hace 100 años, sin embargo, en décadas pasadas, su incidencia ha ido en aumento debido a cambios en el estilo de vida, hábitos e incremento de la expectativa de vida común. Actualmente es una de las mayores causas de muerte a nivel mundial, con más de 11 millones de casos diagnosticados (Wang *et al.*, 2018.). Ha ganado gran protagonismo como enfermedad debido a la complejidad metabólica que hay detrás de las células tumorales, dicho metabolismo llega a ser tan impredecible entre los distintos tipos de cáncer que la pregunta principal es: ¿el cáncer tiene cura?, la respuesta es que sí, cuando se trata en etapas tempranas, sin embargo, difícilmente es detectada alguna malignidad en estas fases, por lo que los esfuerzos por curarlo están más centrados en etapas tardías, donde células tumorales y el microambiente que las acompaña, se encuentra completamente desarrollados (Roy & Saikia, 2016).

Cirugía, radioterapia y quimioterapia son los tratamientos más comunes y efectivos para combatir la progresión tumoral, sin embargo, el tejido y células sanas también son dañadas en el proceso, por lo que se continúan explorando nuevos tratamientos

que tengan acción directa en los múltiples hallmarks del cáncer y la caracterización de sus respectivos mecanismos moleculares (Wang *et al.*, 2018.).

#### 4.1.1 Hallmarks del cáncer

El término “*hallmarks del cáncer*” hace referencia al conjunto de capacidades funcionales adquiridas por las células tumorales. Este concepto es una herramienta que permite una visualización resumida de la complejidad del cáncer. Como se observa en la **Figura 1**, se han propuesto 14 *hallmarks* que incluyen: evasión de la supresión del crecimiento, evasión de la destrucción inmune, inmortalidad replicativa, promoción de la inflamación tumoral, activación de la invasión y la metástasis, inducción de la vascularización, inestabilidad genómica y mutación, desregulación del metabolismo celular, desbloqueo de la plasticidad fenotípica, reprogramación epigenética no mutacional, senescencia celular, microbiomas polimórficos, señalizaciones de proliferación sostenidas y resistencia a la muerte celular (Hanahan, 2022). Este conjunto de características son objeto de estudio para comprender de mejor forma la compleja maquinaria que posee una célula cancerígena, y de esta forma dar paso al diseño de terapias más específicas, buscando mayor efectividad y menor cantidad de efectos secundarios.

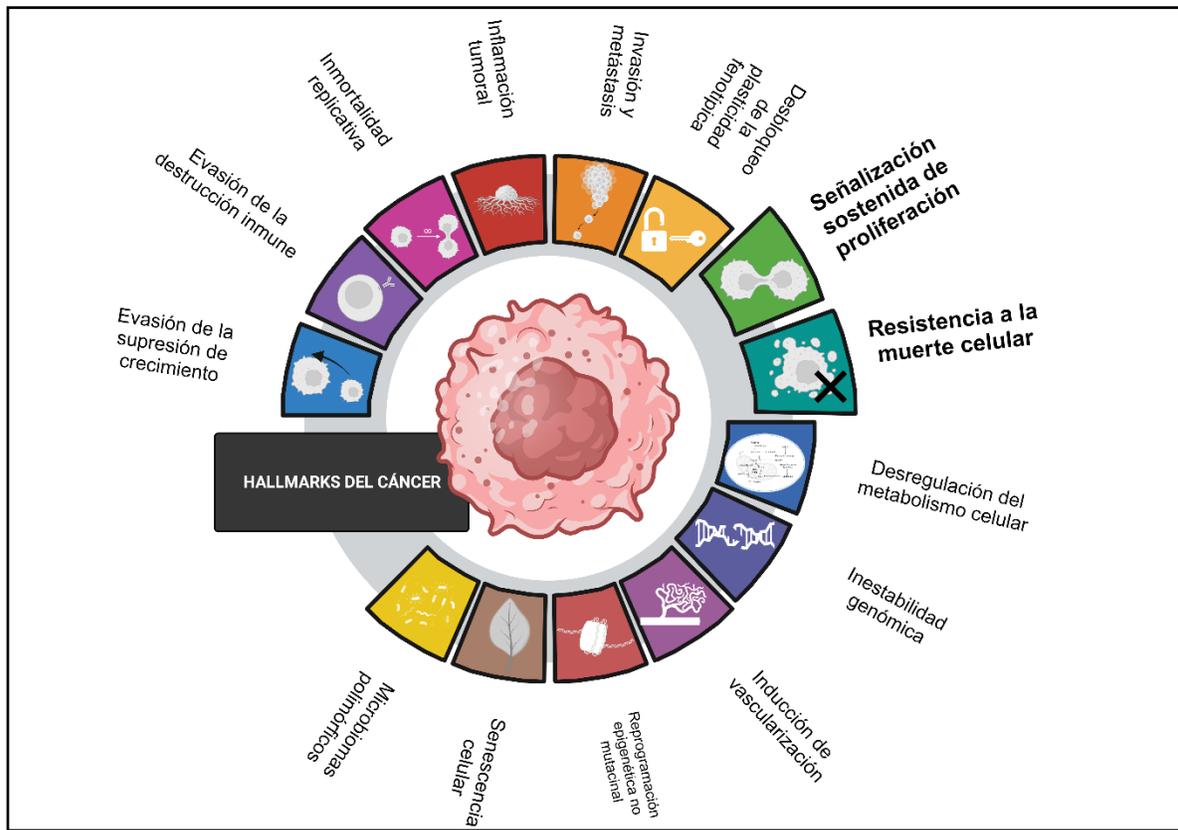


Figura 1. **Hallmarks del cáncer.** Los hallmarks son características comunes en el cáncer como un conjunto de enfermedades. Entre los múltiples hallmarks destacan la señalización sostenida de proliferación y la resistencia a la muerte celular como objetivos principales de múltiples terapias contra el cáncer. Imagen modificada de Hanahan, 2022.

#### 4.1.2 Cáncer cervical

El cáncer cervical es una enfermedad de progresión lenta, inicia cuando aparecen células anormales en el tejido cervical (displasia), que si no son destruidas, se convierten en células cancerígenas, proliferando de manera descontrolada en la región del cérvix, ubicada en la parte baja y angosta al final del útero.

La mayoría de los casos de cáncer de cérvix se desarrollan en la conjunción escamo-columnar, región límite entre el endocérvix y el ectocérvix (**Figura 2**) y la principal causa de esta enfermedad es la infección persistente con el VPH, el cuál ha sido detectado en el 99.7% de los pacientes con cáncer cervical alrededor de mundo, ocupando el tercer lugar entre las malignidades que padecen las mujeres, sólo por debajo del cáncer de mama y cáncer colorrectal, con cerca de 569,000 casos nuevos por año y 4,100 defunciones por año. La edad del primer encuentro sexual, parejas múltiples, fumar, co-infecciones, el uso prolongado de anticonceptivos orales y displasias cervicales son otros de los factores de riesgo asociados a la progresión del cáncer cervical (Johnson *et al.*, 2019).

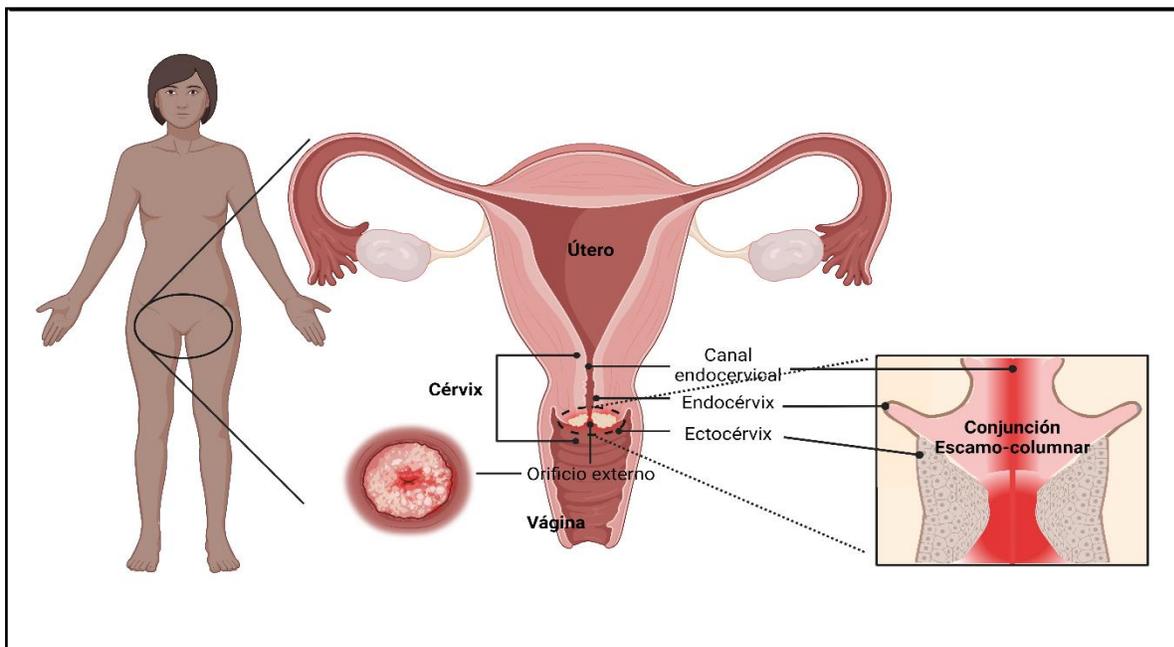


Figura 2. **Características del cáncer cervical.** El cérvix es un canal que conecta vagina con el útero. En la mayoría de los casos, el cáncer cervical se desarrolla en la conjunción escamo-columnar, región límite entre el endocérvix (células glandulares) y ectocérvix (células escamosas). Imagen modificada de NIH, S.F.

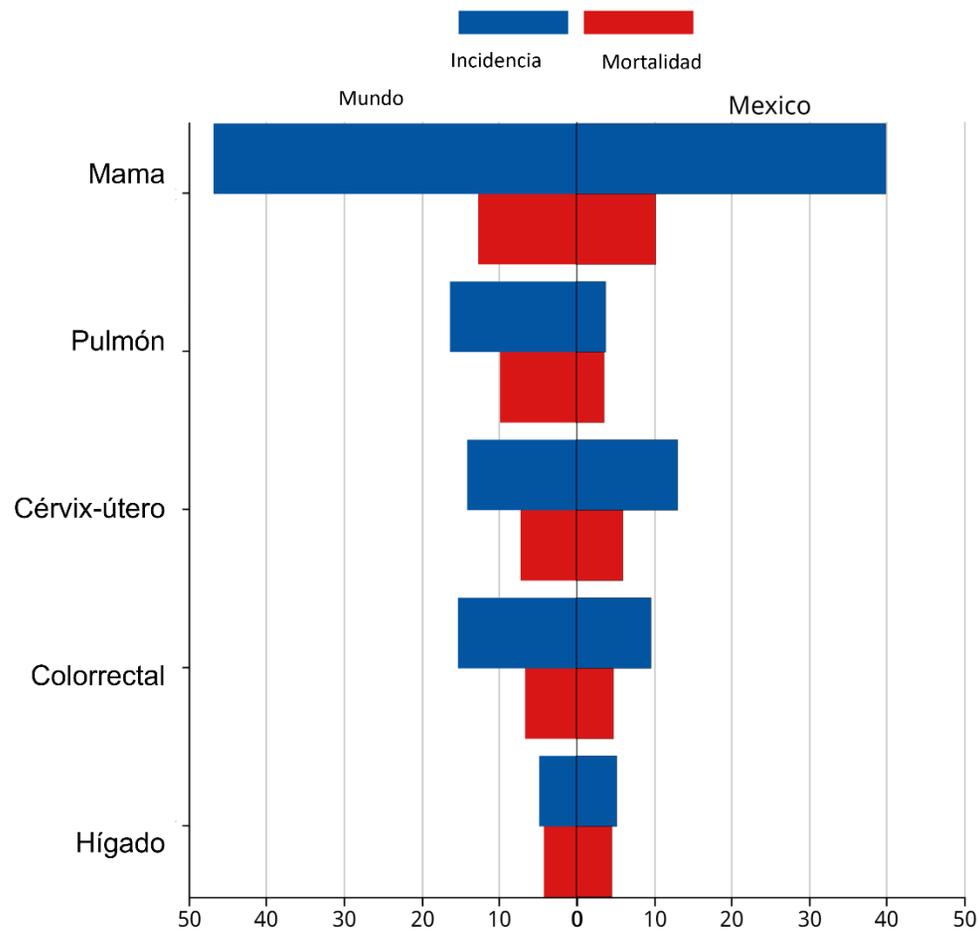


Figura 3. **Incidencia y mortalidad de diferentes tipos de cáncer a nivel mundial y nacional.** En México, el cáncer cervical ocupa el segundo lugar en incidencia y mortalidad. Modificado de Ferlay, 2024.

### 4.1.3 Cáncer cervical en México

En México, el cáncer cervical es el segundo tipo de cáncer más frecuente entre las mujeres (**figura 3**), registrándose 9,439 casos nuevos en 2020 y 4,335 muertes, representando el 12.6% y 5.7% respectivamente a nivel nacional (Ferlay, 2024).

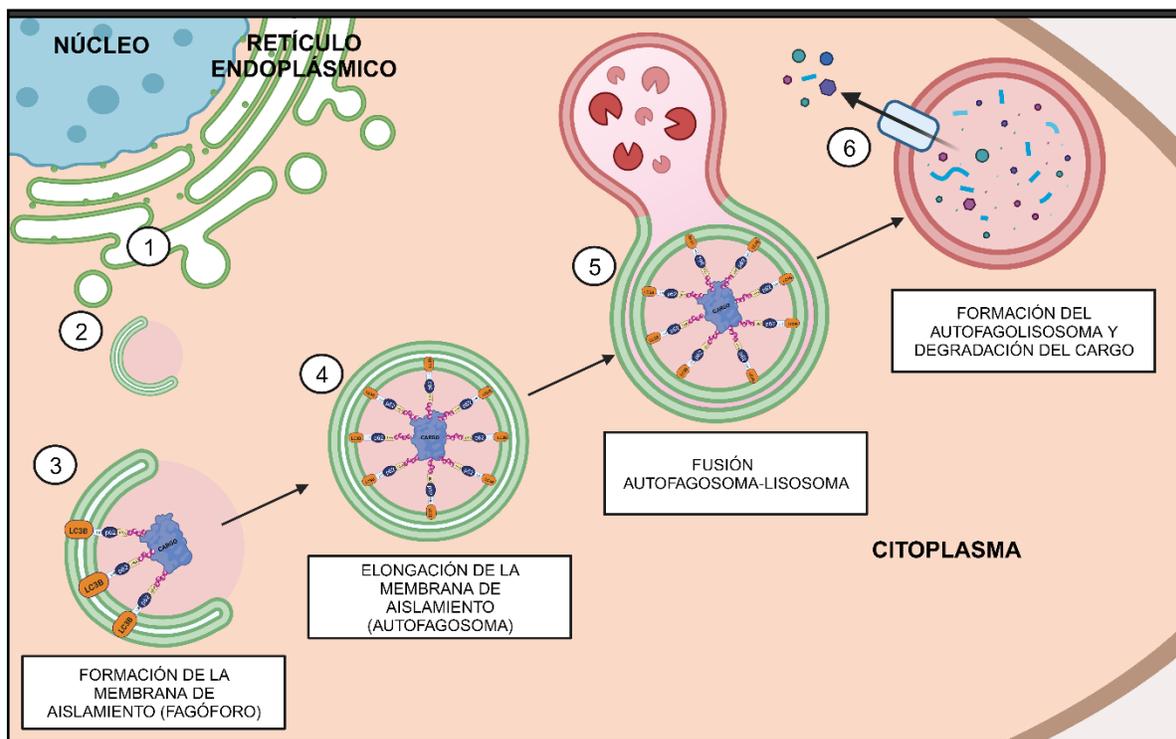
Se trata de un problema vigente en nuestro país y al igual que con los otros tipos de cáncer, se requiere de la suma de esfuerzos por encontrar tratamientos alternativos o blancos terapéuticos diferentes a los inductores de apoptosis, y un mecanismo candidato para esto es la autofagia, ya que la mayoría de las células cancerosas tienen la capacidad de evadir la muerte celular por apoptosis (Scarth *et al.*, 2021).

## **4.2 Autofagia**

Dentro de los procesos catabólicos celulares se encuentran diversos sistemas de degradación, el más común, el sistema proteosoma-ubiquitina, encargado de degradar de manera selectiva proteínas marcadas con ubiquitina, sin embargo, para la degradación de proteínas citoplasmáticas y organelos dañados se requiere de la activación de la autofagia y su maquinaria (Sarkar *et al.*, 2005). La autofagia es un proceso catabólico (**Figura 4**) que se induce bajo condiciones donde hay escasez de nutrientes, dicho proceso está relacionado con diversos procesos fisiológicos como la generación de aminoácidos durante el arresto celular, control de calidad de proteínas intracelulares y degradación de proteínas o patógenos (Lum *et al.*, 2005). Existen diversos tipos de autofagia tales como: autofagia canónica (macro

autofagia), autofagia mediada por proteínas chaperonas, micro autofagia, mitofagia, pexofagia y xenofagia (Mizushima *et al.*, 2011).

En todos los procesos autofágicos se genera una estructura de doble membrana conocida como autofagosoma, que contendrá al cargo (componentes intracelulares que se degradarán), posteriormente el autofagosoma se convierte en autofago-lisosoma al fusionarse con una estructura de una sola membrana conocida como lisosoma, que contiene enzimas ácidas tales como: glicosidasas, proteasas y sulfatasas (Chan *et al.*, 2012) que degradan al autofagosoma y cargo simultáneamente (Vázquez-Nin *et al.*, 2011).



**Figura 4. Proceso autofágico.** 1. A partir de cambios estructurales en el RE se forma una invaginación conocida como omegasoma. 2. El omegasoma, migra en dirección al cargo marcado por p62. 3. Las proteínas LC3B1 (fagóforo) y p62(cargo) se reconocen y forman un anclaje entre fagóforo y cargo. 4. Maduración de LC3B1 a LC3BII que genera la elongación y cierre de la membrana de aislamiento para formar el autofagosoma. 5. Autofagosoma y lisosoma se fusionan para formar el autofago-lisosoma. 6. Las enzimas proteolíticas del lisosoma catabolizan autofagosoma y cargo en macromoléculas para su posterior reciclaje. Modificado de Vázquez-Nin *et al.*, 2011.

#### 4.2.1 Autofagia en células tumorales

El papel de la autofagia en células cancerígenas aún es difuso, ya que puede promover la supervivencia tumoral o inhibirla (**Figura 5**), su función depende directamente del tipo de tejido y estadio del cáncer ( Xu *et al.*, 2020).

Por un lado la autofagia puede proporcionar un medio de reciclaje de nutrientes necesarios para que la célula pueda sobrevivir y generar el microambiente tumoral característico de la enfermedad, que en la mayoría de las veces, implica un estado de acidosis, inflamación y deficiencia de nutrientes, además de que se ha reportado que en cáncer de páncreas se reduce la muerte celular por apoptosis al promoverse la formación de autofagosomas mediante la disminución en la fosforilación de mTOR, cinasa involucrada al crecimiento, proliferación y supervivencia celular (Kim *et al.*, 2017). Por otro lado, la constante formación de autofagosomas que degraden distintos organelos celulares, o la inducción de tipos especiales de autofagia, como la cromatofagia (degradación autofágica de la cromatina) pueden a su vez generar un estrés que lleve a la célula hasta su colapso (Vázquez-Nin *et al.*, 2011).

El eje PI3K/AKT/mTOR es el principal regulador de la autofagia(Xu *et al.*, 2020), sin embargo, existe una vía independiente a mTOR que se relaciona con los niveles de expresión de la Inositol Monofosfatasa (IMPasa) (Sarkar & Rubinsztein, 2006).

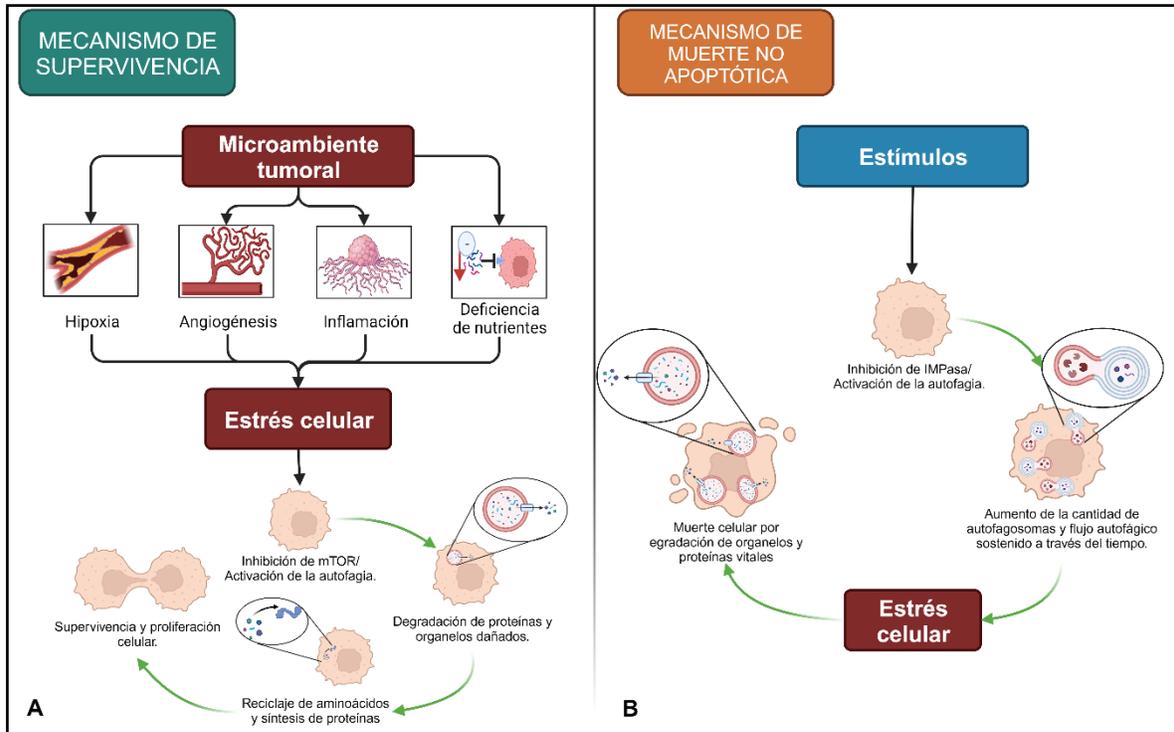


Figura 5. **Papel dual de la autofagia.** **A.** El microambiente tumoral genera un estrés constante en las células cancerígenas, activándose la vía de la autofagia por inhibición de mTOR, dicha autofagia se realiza en niveles bajos y periodos de tiempo cortos para favorecer el reciclaje de aminoácidos y promover la supervivencia celular. **B.** Estímulos específicos son capaces de activar la autofagia mediante la inhibición de IMPasa (vía independiente de mTOR) o la vía dependiente de mTOR, promoviendo un aumento en el flujo autofágico que se sostiene durante periodos de tiempo largos, culminando en un aumento del coste energético, estrés celular y degradación de organelos celulares vitales, induciendo muerte celular. Imagen basada de Kim et al., 2017.

#### 4.2.2 Eje PI3K/AKT/mTOR

El eje PI3K/AKT/mTOR generalmente se encuentra hiperactivo en diversos tipos de cáncer, lo cual le permite regular mecanismos celulares como supervivencia celular, metástasis, proliferación celular, crecimiento y angiogénesis. Se trata de una ruta que se regula negativamente de manera mutua con la ruta RAF/MEK/ERK (Ersahin et al., 2015).

La presencia de factores de crecimiento o aminoácidos intracelulares promueven que PI3K se active, mediante fosforilación a AKT, que a su vez fosforila proteínas

citoplasmáticas para promover el crecimiento y supervivencia celular, como lo es mTOR, uno de los principales efectores río abajo cuya característica principal es la de participar como una serina/treonina cinasa que funciona como sensor de nutrientes y que forma dos complejos multiproteicos: RAPTOR (asociado al complejo mTORC1) y RICTOR (asociado al complejo mTORC2) (Ersahin *et al.*, 2015; Lum *et al.*, 2005).

Cuando AKT inhibe a TSC1-TSC2, promueve a la GTPasa Rheb que activa el complejo mTORC1, promoviendo la síntesis de proteínas inactivando 4E-BP1 y activando S6K1, se induce la biogénesis de lípidos mediante la activación de SREBP1 y PPAR, y se inhibe la autofagia mediante el bloqueo de ULK1. También puede tener un papel fundamental en la progresión tumoral, pues la expresión de mTORC1 activa a RhoA, iniciando la remodelación de actinas del citoesqueleto, teniendo un rol pro-metastásico que también se asocia a alteraciones en la cinasa de adhesión focal (FAK) (Ersahin *et al.*, 2015; Klionsky *et al.*, 2008).

La inhibición de mTORC1 desencadena la activación de la vía de la autofagia ya que mTORC1 es negativamente regulada por SHOC2, uniéndose a RAPTOR y removiéndolo de mTORC1, ocasionando la inactivación de este complejo, y derivando en la activación mediante desfosforilación del complejo ULK1, induciendo el inicio del flujo autofágico (Klionsky *et al.*, 2008).

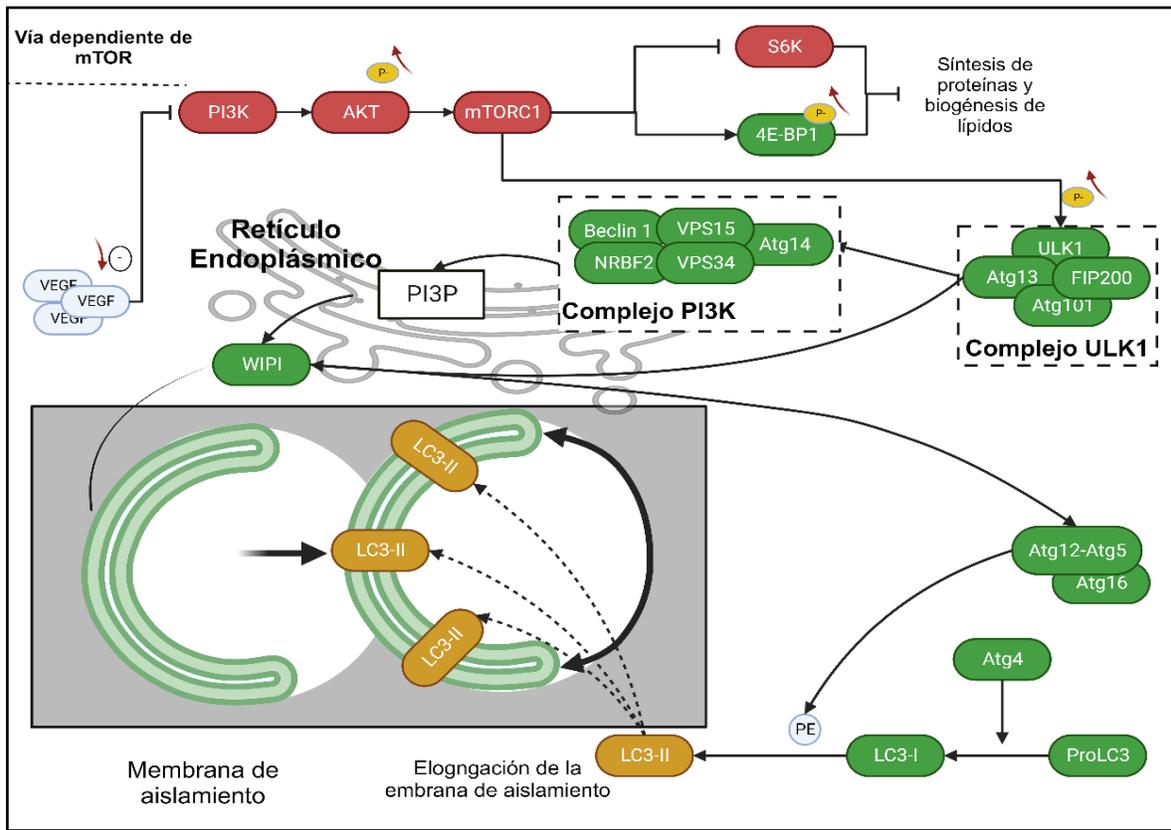


Figura 6. **Vía de señalización de la autofagia dependiente de mTOR.** La inactivación del eje PI3K/AKT/mTOR conduce a la inhibición de la síntesis de proteínas. Mediante desfosforilación, se activa el complejo ULK1, que actúa sobre el complejo PI3K y el complejo Atg12-Atg5/Atg16, el primero involucrado en la formación de la membrana de aislamiento, y el segundo implicado en la lipidación de LC3 para la maduración de la membrana de aislamiento. Modificado de Kegg pathway, 2023.

#### 4.2.3 Maquinaria pre-autofagosomal

El inicio de la autofagia está caracterizado por la formación de autofagosomas, los cuales aún no se sabe exactamente de qué organelo provienen, sin embargo, la hipótesis de que se generan a partir del RE es la más validada hasta ahora, pues se ha observado gran proximidad entre autofagosomas y el RE. En dicho proceso se encuentran involucradas múltiples proteínas ATG (AuTophagy) tales como ULK1, Atg9, el complejo Atg2-Atg18, el complejo PI3K y dos sistemas de

ubiquitinación (Mizushima *et al.*, 2011). Como se muestra en la **figura 7**, ULK1 es parte de un complejo conformado por ULK1-mAtg13-FIP200-Atg101, el cual es desfosforilado y activado cuando hay inducción de autofagia, ocasionando una translocación lateral del complejo PI3K a la sección especializada del retículo endoplásmico para producir PIP y generar la membrana de aislamiento mediante cambios en la composición de la membrana del RE. Pese a que PI3P no se encuentra usualmente en el RE, se cree que es Atg14 quien se encuentra en el RE y se encarga de reclutar el complejo de PI3K para producir una región enriquecida con PI3P conocida como omegasoma, cuya forma asemeja a la de la letra omega del alfabeto griego, indicando morfológicamente la biogénesis del autofagosoma (Mizushima *et al.*, 2011).

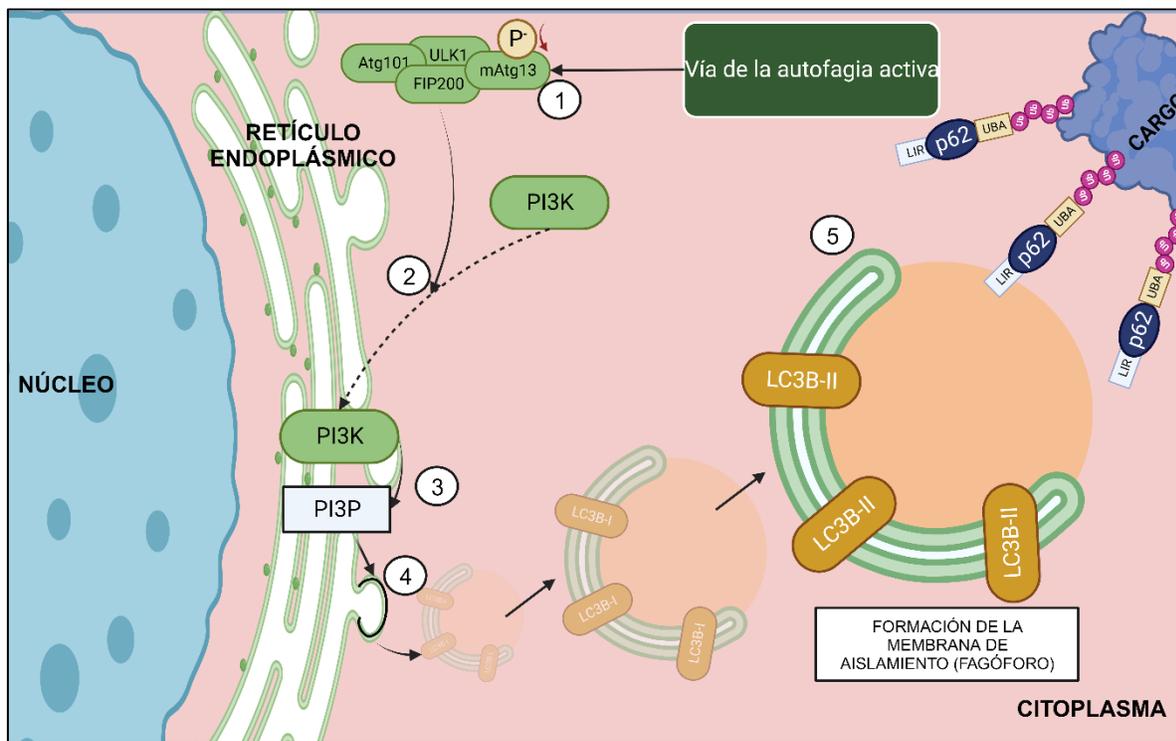


Figura 7. **Maquinaria pre-autofagosomal.** Atg13, que forma parte del complejo ULK1 interactúa con Atg14 para reclutar al complejo PI3K al RE, produciendo PI3P, encargado de realizar modificaciones en la membrana del RE para formar el omegasoma, posteriormente este se convierte en membrana de aislamiento, encargada de envolver el cargo. La membrana de aislamiento madurará gracias a la incorporación de la isoforma lipidada de LC3B(LC3B-II). Figura de autoría propia.

#### 4.2.4 El flujo autofágico

El flujo autofágico comprende la formación del omegasoma que posteriormente se convertirá en membrana de aislamiento, la formación del autofagosoma con el cargo marcado en su interior, la formación del autofagolisosoma a partir de la fusión autofagosoma-lisosoma y la degradación del cargo (Yoshii & Mizushima, 2017).

La autofagia puede ser inhibida en múltiples etapas: inicio de la autofagia, interrupción de la elongación de la membrana del fagóforo, inhibición de la fusión autofagosoma-lisosoma e inhibición de la degradación lisosomal como se muestra en la **figura 8** (Klionsky *et al.*, 2008). La activación o represión de la autofagia está acompañada por un cambio en el número de autofagosomas y lisosomas en las células (Rossi *et al.*, 2009). Existen múltiples compuestos cuya capacidad de interrupción del flujo autofágico está bien documentada. La cloroquina, por ejemplo, es comúnmente usada para estudiar el flujo autofágico ya que aumenta el pH lisosomal, inhibiendo la degradación del cargo y autofagosomas, originando una sobreexpresión de los marcadores moleculares LC3B-II y p62 ( Xu *et al.*, 2022).

Para medir el flujo autofágico es necesario determinar los niveles de expresión de LC3. p62 es otro marcador utilizado para monitorear el flujo autofágico ya que se une a LC3 y es selectivamente degradado por la autofagia. Es necesario el uso de inhibidores de degradación lisosomal para el monitoreo del flujo autofágico. La

diferencia en la cantidad de LC3 entre las muestras con y sin inhibidores lisosomales indican el nivel del flujo autofágico (Yoshii & Mizushima, 2017).

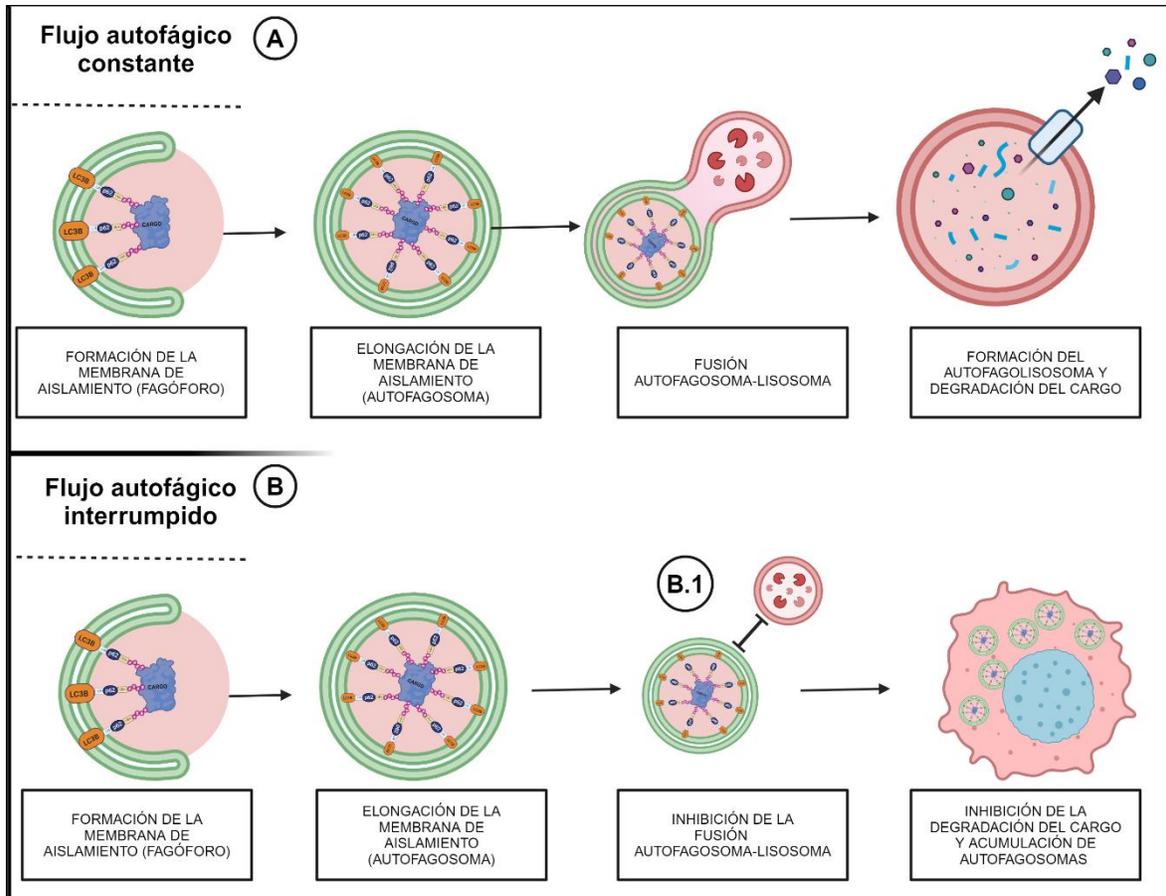


Figura 8. **Flujo autofágico.** A. Se muestra las etapas de un flujo autofágico sin interrupciones, logrando concretarse la degradación del cargo. B. El flujo autofágico se ve interrumpido cuando no se da la fusión autofagosoma-lisosoma(B.1), por lo que tanto autofagosomas como cargo carecen de degradación, ocasionando acumulación de estos. Modificado de Vázquez-Nin et al., 2011.

#### 4.2.5 Marcadores moleculares del flujo autofágico

El marcador principal para el estudio de los autofagosomas es LC3-II, el cual se encuentra escindido en su término C por Atg4 para formar LC3-I, y es covalentemente conjugado a PE para formar LC3-II, el cual permanece asociado a las membranas de autofagosomas hasta su degradación (Evans *et al.*, 2019). Otro marcador que es de gran relevancia para el monitoreo de la actividad autofágica es p62, que es característico de la autofagia selectiva, el cual vincula el cargo que se degradará en conjunto con LC3-II, ubicado en la superficie del fagóforo en crecimiento (**Figura 9A**). La autofagia selectiva depende directamente del marcaje del cargo, dicho marcaje suele estar determinado por colas de ubiquitina y cargo, que, en conjunto, forman largas estructuras que permiten la elongación del fagóforo, ocasionando que el cargo marcado quede anclado a la parte interior de la membrana del fagóforo (**Figura 9C**). Bajo condiciones normales p62 es continuamente producido y degradado mediante autofagia selectiva, sin embargo, cuando hay acumulación de sustratos autofágicos, p62 es redirigido para actuar como un receptor de autofagia (Lamark *et al.*, 2017).

Los niveles de LC3-II y p62 pueden ser medidos por Western Blot (Inmunoblot), un incremento de los niveles de LC3-II o de la cantidad de autofagosomas puede indicar un incremento en la actividad autofágica, y al mismo tiempo puede sugerir una reducción en la degradación de los autofagosomas, causando su acumulación (Evans *et al.*, 2019). Disminución en los niveles de LC3-II indican una disminución en la síntesis de autofagosomas, incremento en niveles de LC3-II indican un

incremento en la síntesis de autofagosomas o un posible bloqueo del flujo autofágico (Evans *et al.*, 2019). Un incremento en la expresión de p62 puede indicar un arresto en el flujo autofágico, mientras que la disminución en la expresión de p62 puede indicar que el cargo se está degradando y por lo tanto el flujo autofágico se está llevando a cabo de principio a fin (**Figura 9B**) (Lamark *et al.*, 2017).

Aunque la actividad autofágica es baja en condiciones basales, puede ser sobre-regulada cuando la célula se ve sometida a condiciones de estrés como el arresto de nutrientes, hipoxia, disminución de energía, alteraciones en el RE y temperatura elevada (Chan *et al.*, 2012).

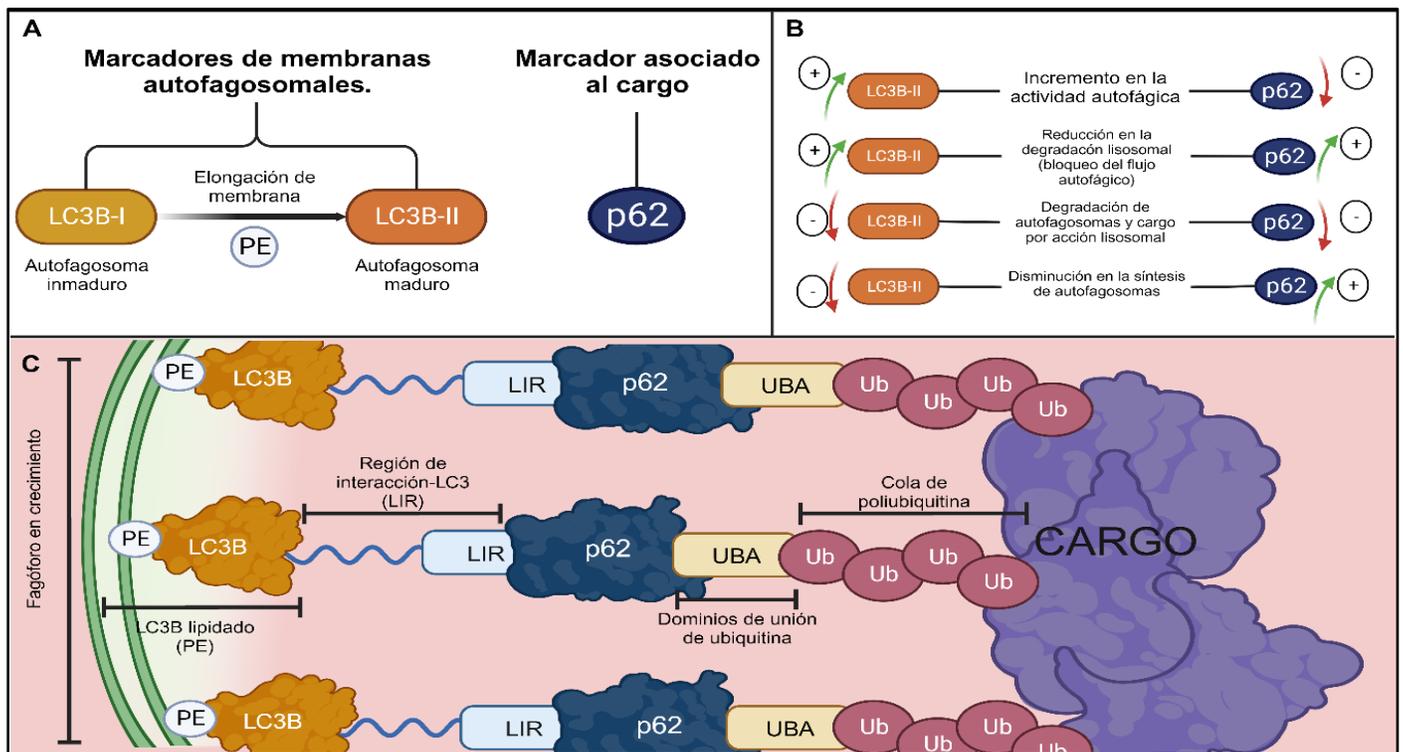


Figura 9. **Marcadores del flujo autofágico.** A. Proteínas asociadas a estructuras en la autofagia. B. Interpretación de los niveles de expresión de LC3B y p62. C. Estructura interna del autofagosoma. Modificado de Lammark *et al.*, 2017.

### 4.3 Reposicionamiento del litio como fármaco antitumoral

El costo y tiempo requerido para el desarrollo de nuevos fármacos significan ganancias de dinero menores que el que invierten las farmacéuticas, por lo que el reposicionamiento de fármacos cobra gran relevancia. El reposicionamiento de fármacos es una estrategia que consiste en la identificación de nuevos usos para fármacos aprobados o en etapas de desarrollo. Esta estrategia ofrece varias ventajas, tales como: riesgo de error menor, marco de desarrollo menor, menor investigación y la inversión que conlleva (Pushpakom *et al.*, 2018). Para una eficiente reposición de fármacos se requiere de una selección cuidadosa, seguido por una demostración de su efectividad en contextos biológicos, algunos de estos métodos son: reposicionamiento de fármacos basados en actividad, reposicionamiento de fármacos basado en literatura y reposicionamiento de fármacos *in silico* (Masuda *et al.*, 2020).

Bajo este contexto, el estudio de los efectos de las sales de litio ha ganado popularidad en los últimos años. En 1817, Johan Arfwedson descubrió el litio, un metal alcalino, y catión monovalente en solución (Snitow *et al.*, 2021) . A mediados del siglo XIX los físicos, mediante estudios *in vitro*, observaron que el litio tenía la capacidad de disolver el ácido úrico del riñón, por lo que rápidamente se iniciaron estudios para tratar enfermedades como la gota. Transcurridos los años, las sales de litio ganaron terreno como tratamiento en desórdenes mentales, tales como manía o desórdenes bipolares, en donde aún se reporta una alta eficacia como tratamiento (Damri *et al.*, 2021; Sarkar & Rubinsztein, 2006). Múltiples estudios han revelado diferentes mecanismos de acción del litio, entre los efectos reportados se

encuentran: inducción de apoptosis e inhibición de crecimiento celular en melanomas (Nordenberg *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 2021), inhibición de apoptosis e inducción de necroptosis en schwannomas (Wang *et al.*, 2017), neuroprotección en pacientes con cáncer, mediante la reducción de niveles de calcio intracelulares (Khasraw *et al.*, 2012), reducción de viabilidad celular e inducción de autofagia en diferentes fases del ciclo celular en células HCC-29 (Taskaeva *et al.*, 2020),

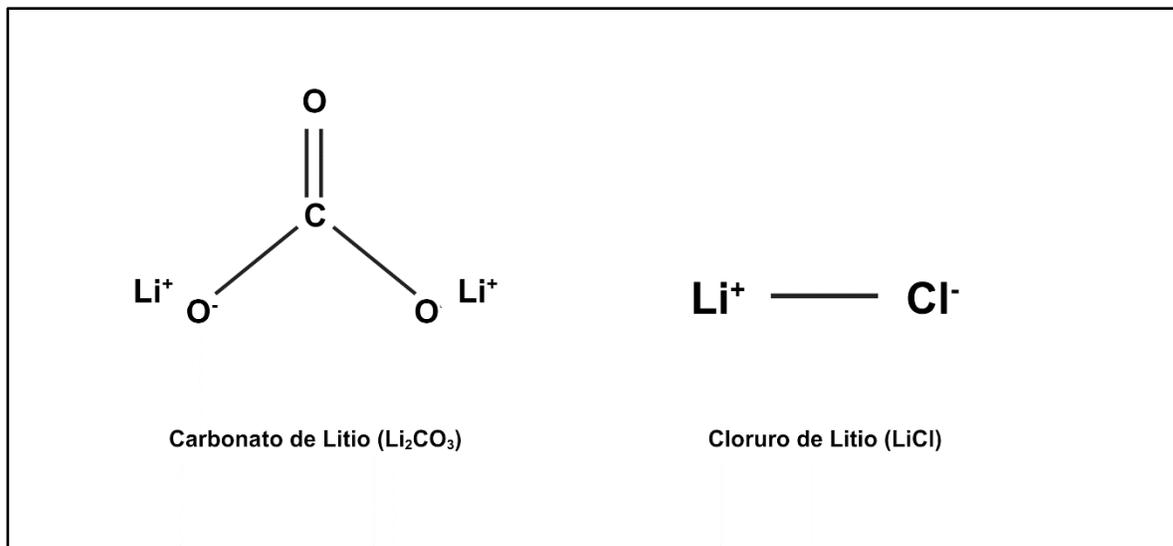


Figura 10. **Estructura química condensada de las sales de litio.** Sarkar & Rubinsztein, 2006

El presente estudio se centró en la evaluación de la inducción de autofagia mediada por sales de litio en un modelo *in vitro* de cáncer cervical, usando las líneas celulares HeLa y SiHa, células cancerosas con múltiples desregulaciones metabólicas.

Por un lado las células HeLa son de tipo epitelial, provenientes de un adenocarcinoma del cervix, contienen secuencias del VPH 18+, expresa niveles bajos de p53 y niveles normales de pRB (Scheffner *et al.*, 1991) mientras las células

SiHa son de tipo epitelial, provenientes de un carcinoma de células escamosas, contiene secuencias de VPH 16+ y expresa p53+ y pRB+ como genes mutados (Baker *et al.*, 1987).

## 5. Planteamiento del problema y Pregunta de investigación

Los tratamientos actuales contra el cáncer de cérvix incluyen cirugías, radiación, quimioterapia e inmunoterapia (Wang *et al.*, 2018.). Sin embargo, el uso de cualquiera de estos procedimientos está condicionado al estado de desarrollo del cáncer, siendo en las etapas más avanzadas donde se registra un menor porcentaje de supervivencia en las pacientes, por lo que la exploración de tratamientos alternos lleva a plantear si las sales de litio, que han demostrado tener influencia en diversas vías de señalización, pueden inducir autofagia sostenida la cual pueda concluir en muerte no apoptótica en células de cáncer cervical y de esta forma contribuir en la caracterización de nuevos blancos terapéuticos para el desarrollo de tratamientos que ofrezcan mayor porcentaje de éxito y menos efectos adversos que los tratamientos anticancerígenos actuales.

## 6. Hipótesis

Se ha reportado la inducción de autofagia mediada por sales de litio como el LiCl en múltiples modelos *in vitro*, por lo que las sales de litio (LiCl y Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) regularán la vía de la autofagia en células HeLa y SiHa, promoviendo, a nivel celular, un flujo autofágico ininterrumpido, y a nivel molecular se inducirá un aumento de los niveles de expresión de LC3 $\beta$  y una disminución de p62.

## **7. Objetivos**

### **7.1 Objetivo general**

Evaluar el papel de las sales de litio ( $\text{LiCl}$  y  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ ) en la regulación de autofagia en células HeLa y SiHa.

### **7.2 Objetivos particulares**

- Evaluar, la expresión de LC3 $\beta$  y p62 en células HeLa y SiHa estimuladas con sales de litio en intervalos de tiempo de 3, 6, 12 y 24 horas.
- Analizar el flujo autofágico mediante la relación entre los niveles de expresión de LC3 $\beta$  y p62 en presencia de sales de litio.
- Observar la formación de vesículas asociadas a la actividad autofágica.

## 8. Material y métodos

### 8.1 Cultivo celular

Se seleccionaron células HeLa (VPH 18+), SiHa (VPH 16+) que fueron cultivadas en medio RPMI suplementado con Suero de Ternera de Neonato al 10% a una temperatura de 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> / 95% de aire. Para la extracción de proteínas se resembraron 100,000 células por pozo en placas de 12 pozos y para visualizar la formación de autofagosomas con el kit de detección de autofagia CYTO-ID® se resembraron 7,000 células por pozo en placas de 96 pozos, 24 horas después de la siembra, se les aplicaron diferentes estímulos: SE (Sin estímulo) , R (Rapamicina 10uM) como control positivo de autofagia, CQ (cloroquina 50uM) como inhibidor de fusión lisosomal para arresto del flujo autofágico, R/CQ (rapamicina + cloroquina) y dos sales de litio, donde las concentraciones utilizadas se obtuvieron a partir de resultados previos en el grupo de trabajo, en donde se determinaron las IC50 para cada línea: LiCl (HeLa, 23.14 mM y SiHa, 23.43mM) y Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (HeLa, 11.52 mM y SiHa 20.57 mM). La concentración de rapamicina y cloroquina fue establecida a partir de experimentos preliminares partiendo de los rangos propuestos por *Klionsky et al., 2008*. Se escogieron las concentraciones que mayor producción de autofagosomas exhibieron. Finalmente e establecieron tiempos de análisis de 3, 6, 12 y 24 horas.

## 8.2 Western blot

Para la extracción de proteína total, se lisaron las células con buffer de lisis RIPA (sc-24948, Santa Cruz Biotechnology) + Coctel de inhibidores de proteasas (Complete Roche 11697498008). La concentración final de las proteínas se determinó a una longitud de onda de 280nm usando el equipo EPOC Bio Tek. Se desnaturalizaron 50 µg de proteína en buffer de carga Laemmli por 10 minutos a 100°C. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis, usando geles de poliacrilamida-SDS al 18%, se transfirieron a membranas de PVDF (0.45µM). Las membranas se bloquearon con TBS-tween 20 al 1% y leche libre de grasas al 5%, se lavaron con TBS-Tween 20. Se incubaron las membranas con anticuerpos rabbit anti-p62/SQSTM1 (Cat.No: A19700, dilución 1:1,000, ABclonal), mouse anti-LC3β (Cat.No: sc-376404, dilución 1:1,000, Santa Cruz Biotechnology), y mouse anti β-actina (Cat.No: AC004, dilución 1:10,000, ABclonal), durante toda la noche a 4°C. Luego de lavar las membranas con TBS-Tween 20 se incubaron las membranas con anticuerpo secundario antirabbit igG (7074s, dilución 1:10,000, Cell Signaling Biotechnology) y antimouse igG (7076s, dilución 1:10,000, Cell Signaling Biotechnology) por 1h a temperatura ambiente y agitación constante. Se realizaron lavados con TBS-Tween 20 y se revelaron las bandas usando un sustrato Clarity Max™ Western ECL (Cat. #1705062, Bio Rad) y un scanner C-DiGit Blot, LI-COR. Los análisis semicuantitativos de los resultados se realizaron usando el software Image J.

### **8.3 Detección de Autofagia mediante CYTO-ID®**

Se retiró de manera cuidadosa el medio y los estímulos de las placas de 96 pozos, se agregaron 100 uL de buffer de ensayo 1x por pozo. Se retiró el buffer y se agregaron 100 uL de solución de detección dual de color, protegiendo la muestra de la luz y se incubaron por 30 minutos a 37°C, se realizaron lavados a cada pozo con 200 uL de buffer de ensayo 1X y se agregaron 100 uL de buffer ensayo fresco. Se observaron las placas bajo un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse TS2R-FL, JAP).

### **8.4 Análisis estadístico**

Todos los experimentos se realizaron por triplicados. Los datos se presentan como medias. El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism versión 9.0 (GraphPad software, inc., La Jolla, Ca, USA). Se analizó la normalidad de los datos obtenidos con una prueba de Shapiro-Wilk, posteriormente se analizaron las diferencias intergrupales mediante t de student. El valor de  $p$  menor a 0.05 se consideró como indicador de diferencias estadísticamente significativas.

## 9. Resultados

Se evaluó el flujo autofágico en las líneas celulares HeLa y SiHa mediante Kit de Detección de Autofagia CYTO-ID® y Western blot en intervalos de tiempo de 3, 6, 12 y 24 horas. Los modelos *in vitro* fueron estimulados como se muestra en la **tabla 1**, siendo LiCl y Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> los compuestos de principal interés en el presente estudio.

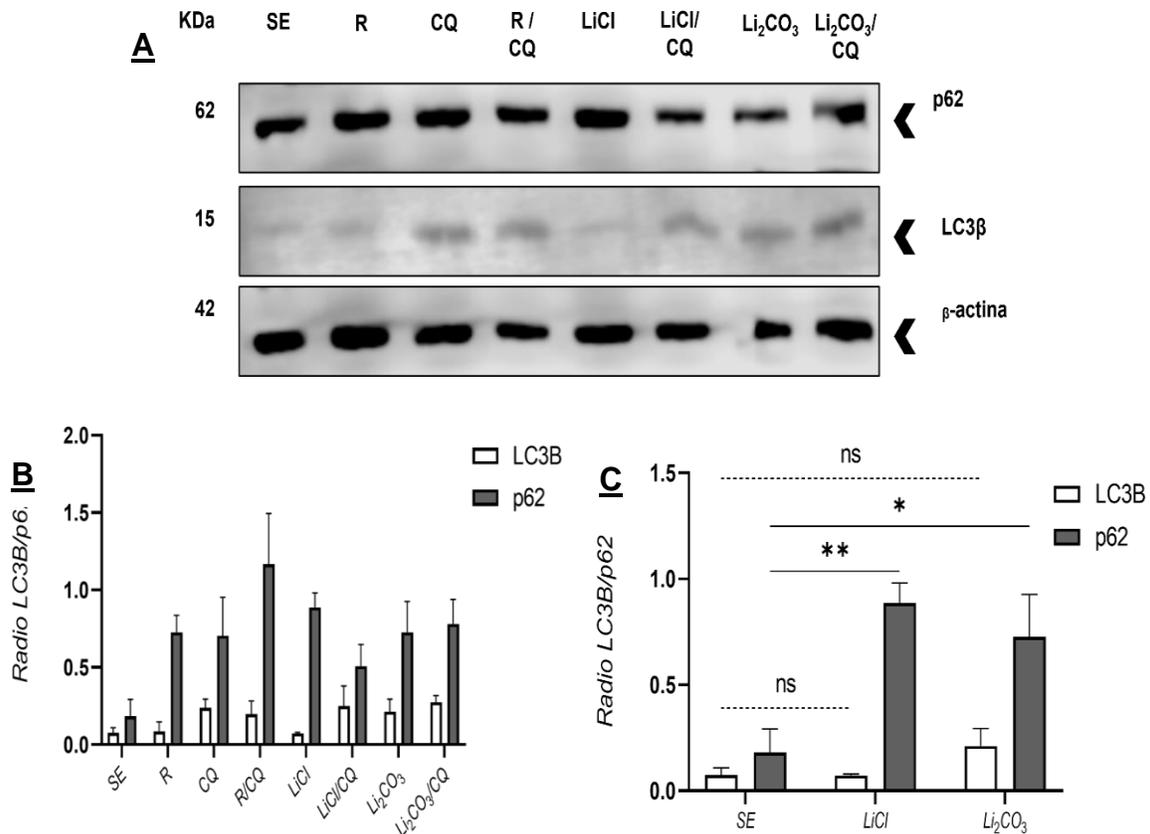
Tabla 1. Concentraciones de los estímulos aplicados a cada línea celular.

	HeLa	SiHa
Compuesto	Concentración	Concentración
SE	-	-
R	10 µM	10 µM
CQ	50 µM	50 µM
R/CQ	10 µM/50 µM	10 µM/50 µM
LiCl	23.14 mM	23.43 mM
LiCl/CQ	23.14 Mm/50 µM	23.43 mM/50 µM
Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	11.52 mM	20.57 mM
Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /CQ	11.52 mM /50 µM	20.57 mM /50 µM

## 9.1 Patrones temporales en células HeLa: efecto de los estímulos en la inducción de autofagia.

### 9.1.1 3 Horas

Como se observa en la **figura 11**, de LC3 $\beta$  fueron constantes entre los estímulos aplicados mientras que p62 mostró mayor expresión frente al grupo SE durante las primeras 3 horas, observándose mayor expresión de p62 frente a LC3 $\beta$ . Al mismo tiempo, en la **figura 12**, sólo se observó presencia de autofagosomas en los grupos CQ, R/CQ, LiCl, Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/CQ, en este último se logró detectar una señal más intensa que en el resto de los grupos



**Figura 11. Evaluación mediante Western Blot de la actividad autofágica en células HeLa estimuladas por 3 horas.** **A.** Imagen representativa de los niveles de expresión de las proteínas LC3 $\beta$  y p62, usando  $\beta$ -actina como control de carga. **B** Análisis densitométrico de los niveles de expresión de LC3 $\beta$  y p62. **C.** Comparación de los niveles de expresión de LC3 $\beta$  y p62 de SE vs LiCl y Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. (\* $p$  < 0.0332, \*\* $p$  < 0.0021).

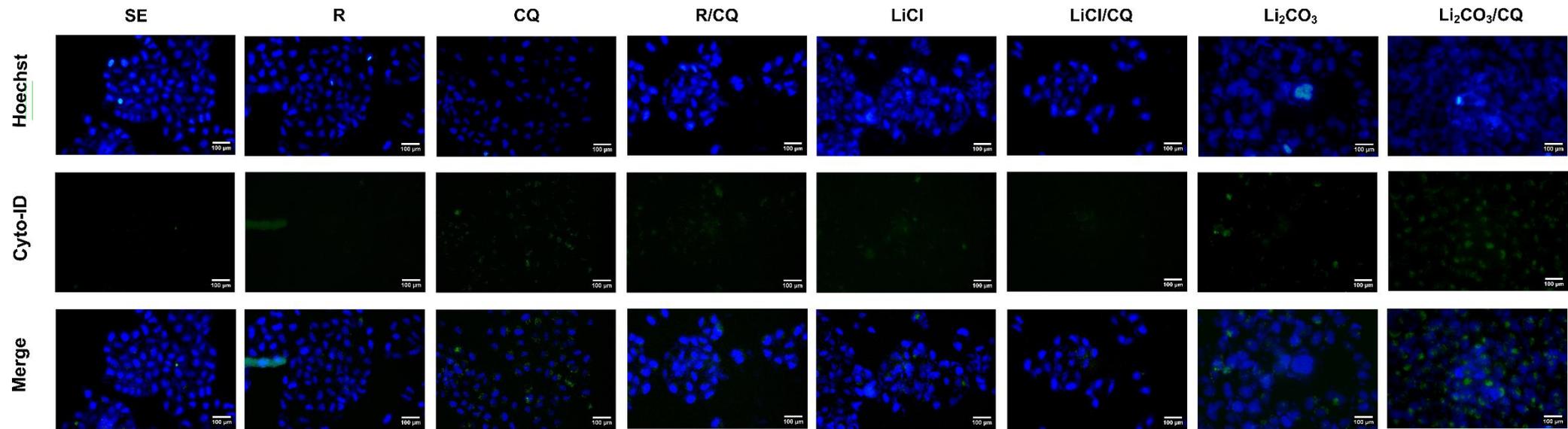
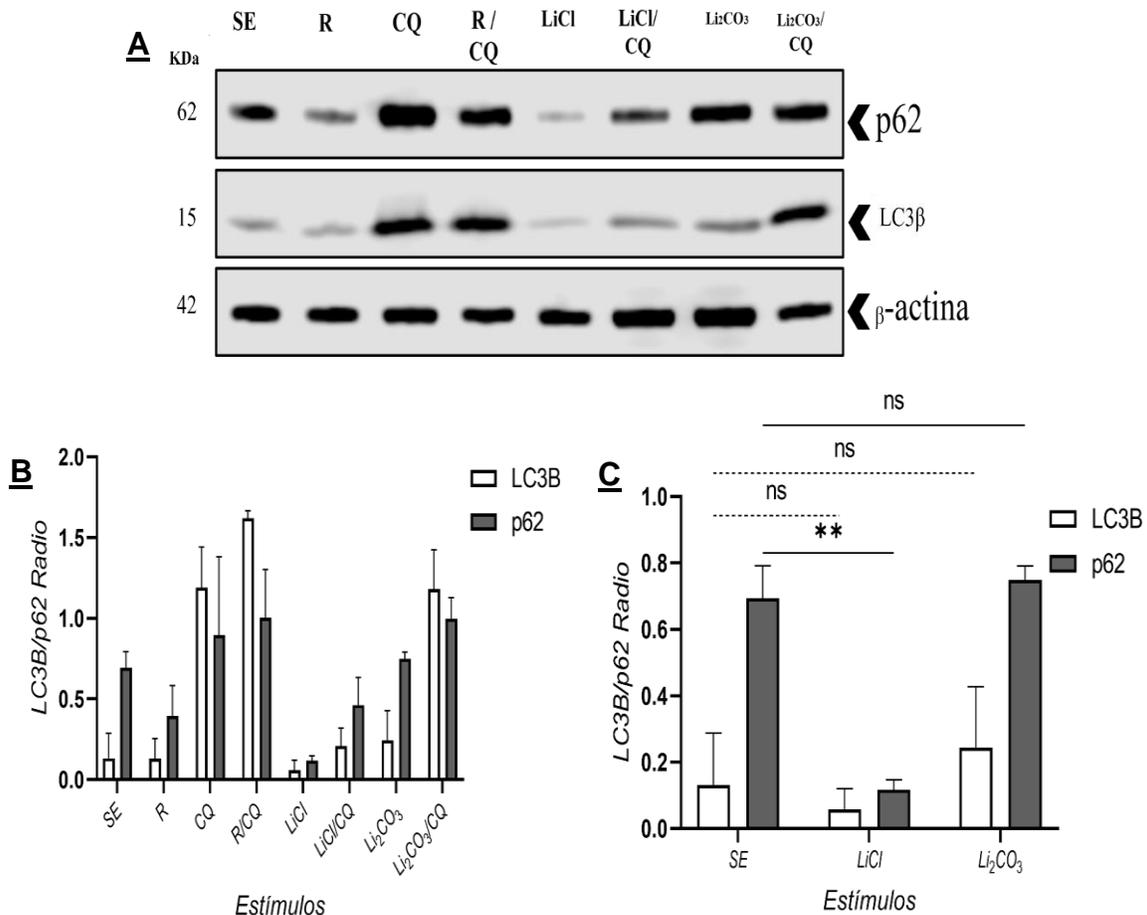


Figura 12. ***Evaluación mediante Cyto-ID de la actividad autofágica en células HeLa estimuladas por 3 horas.*** A. La acumulación de autofagosomas únicamente es visible en células estimuladas con Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

### 9.1.2 6 Horas

Se detectó disminución gradual en la expresión de p62 en estímulos como R, LiCl y LiCl/CQ, así como un aumento gradual en niveles de expresión de LC3β y mantenimiento de los niveles de p62 en estímulos que contenían CQ. En la **figura 14**, la presencia de autofagosomas únicamente fue observada en las células estimuladas con CQ y en los grupos LiCl y Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. La **figura 13** muestra que en el grupo LiCl disminuyó la expresión de p62 y LC3β en contraste con el grupo LiCl de 3 horas.



**Figura 13. Evaluación mediante Western Blot de la actividad autofágica en células HeLa estimuladas por 6 horas.** **A.** Imagen representativa de los niveles de expresión de las proteínas LC3β y p62, usando β-actina como control de carga. **B** Análisis densitométrico de los niveles de expresión de LC3β y p62. **C.** Comparación de los niveles de expresión de LC3β y p62 de SE vs LiCl y Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. (\*p= <0.0332, \*\*p= <0.0021).

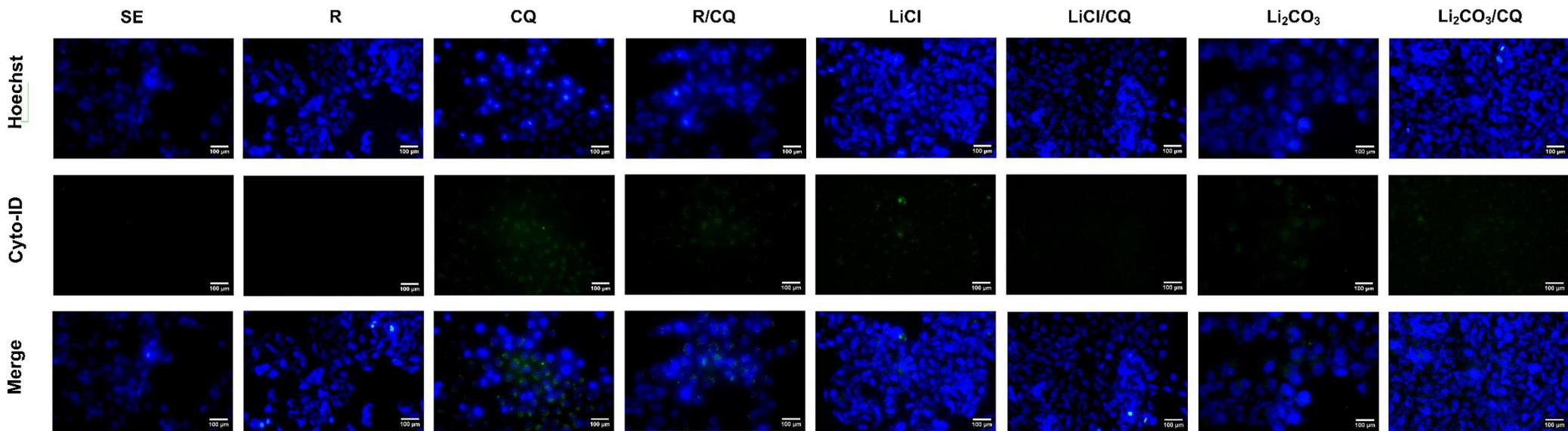


Figura 14. **Evaluación mediante Cyto-ID de la actividad autofágica en células HeLa estimuladas por 6 horas.** A. La acumulación de autofagosomas únicamente es visible en células estimuladas con CQ.

### 9.1.3 12 Horas

Se observó aumento en la expresión de LC3 $\beta$  de los grupos estimulados con Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y LiCl vs el grupo SE, por otro lado, en la **figura 15** la degradación de p62 es notable al verse disminuidos sus niveles de expresión, excepto en los grupos de CQ, R/CQ, donde los niveles son más elevados que en tiempos anteriores, los grupos LiCl/CQ y Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/CQ mostraron aumento de expresión relativa de LC3 $\beta$  y p62, aunque este último en menor proporción que los grupos CQ y R/CQ, indicando que aun en arresto del flujo autofágico, las sales de litio favorecen la degradación de p62. En la **figura 16**, se detectó señal únicamente en el grupo R/CQ, de manera débil.

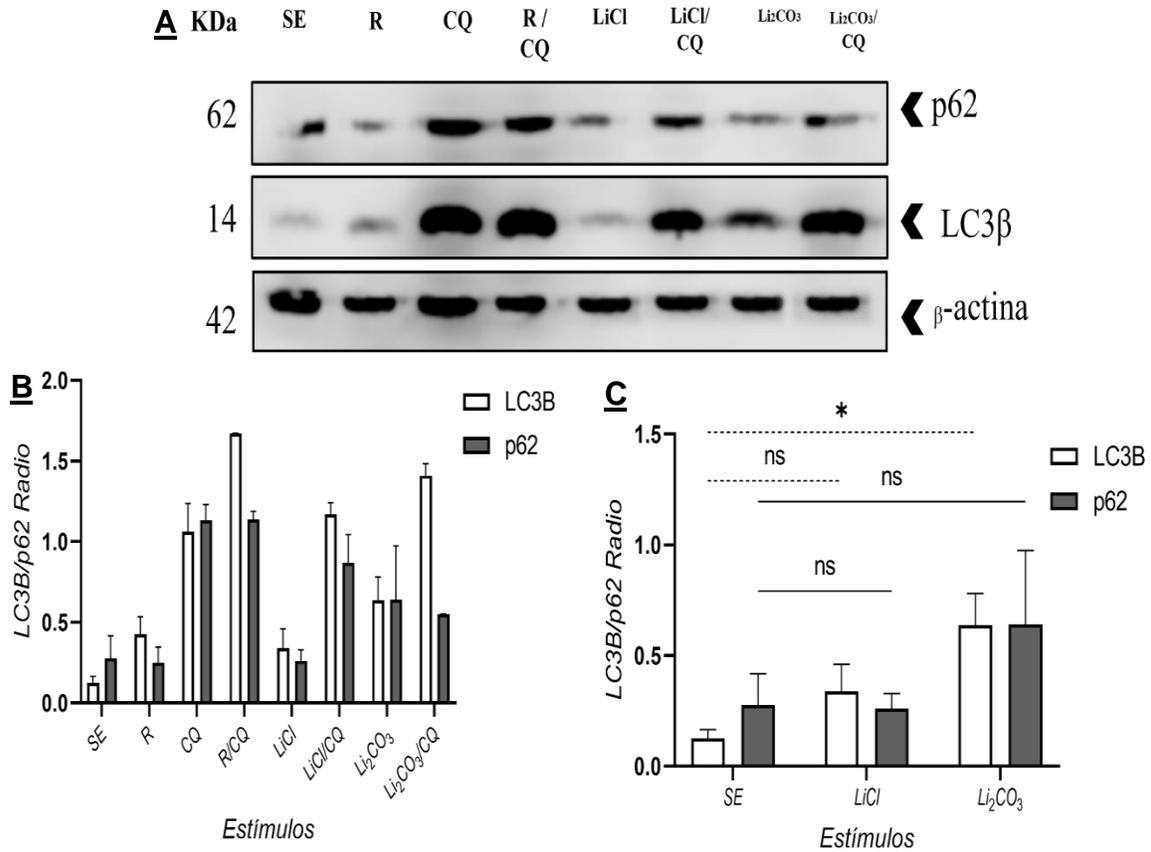


Figura 15. **Evaluación mediante Western Blot de la actividad autofágica en células HeLa estimuladas por 24 horas** **A.** Imagen representativa de los niveles de expresión de las proteínas LC3β y p62, usando β-actina como control de carga. **B.** Análisis densitométrico de los niveles de expresión de LC3β y p62. **C.** Comparación de los niveles de expresión de LC3β y p62 de SE vs LiCl y Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. (\* $p < 0.0332$ , \*\* $p < 0.0021$ )

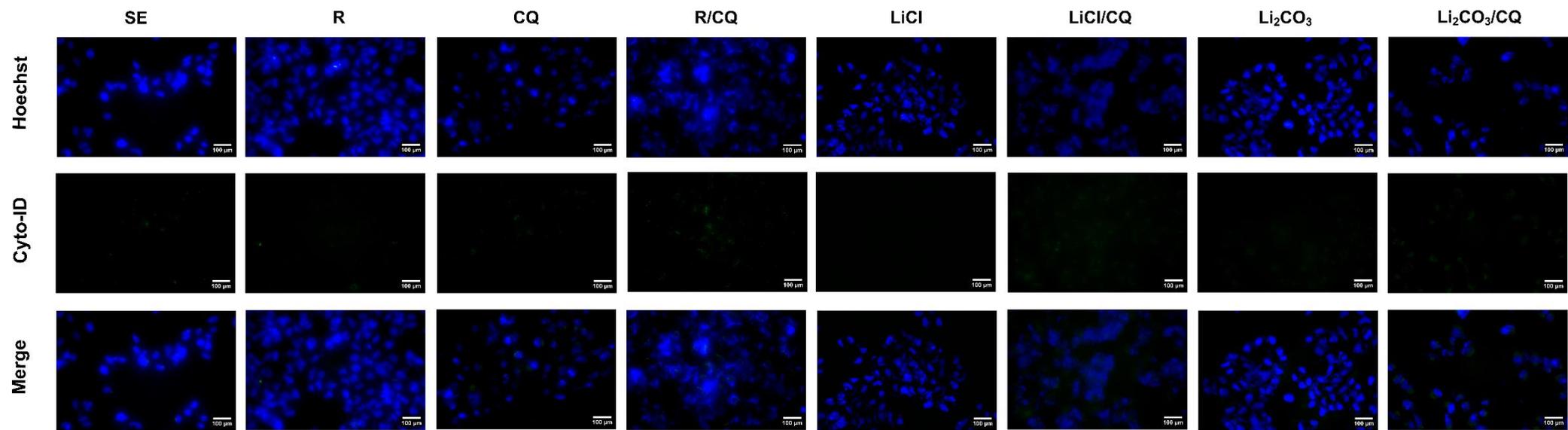


Figura 16. Evaluación mediante Cyto-ID de la actividad autofágica en células HeLa estimuladas por 12 horas. A. La acumulación de autofosomas únicamente es visible en células estimuladas con CQ.

#### 9.1.4 24 Horas

En la la **figura 17** se muestra que cumplidas las 24 horas, la expresión de LC3 $\beta$  y p62 disminuyeron exponencialmente en los grupos SE, R y LiCl, mientras que en los grupos CQ, R/CQ, LiCl/CQ y Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/CQ se continuó detectando altos niveles de expresión de ambas proteínas al igual que presencia de autofagosomas (**figura 18**), sugiriendo una exitosa interrupción del flujo autofágico por acción de CQ. Por último, el grupo Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> exhibió presencia de p62 y LC3 $\beta$ , encontrándose en mayor proporción este último, indicando inducción de autofagia sostenida y degradación de p62, ya que este se detectó en menor proporción que en aquellos grupos en donde se interrumpió el flujo autofágico. Se observó que la rapamicina, utilizada como control positivo, dejó de inducir la formación de autofagosomas en los primeros intervalos de tiempo, en contraste con las sales de litio, que continuaron manifestando inducción de autofagia a las 24 horas, aunque en una magnitud menor en comparación con tiempos anteriores. Este resultado sugiere una persistencia en la capacidad de las sales de litio para inducir la autofagia incluso en fases tardías del tratamiento.

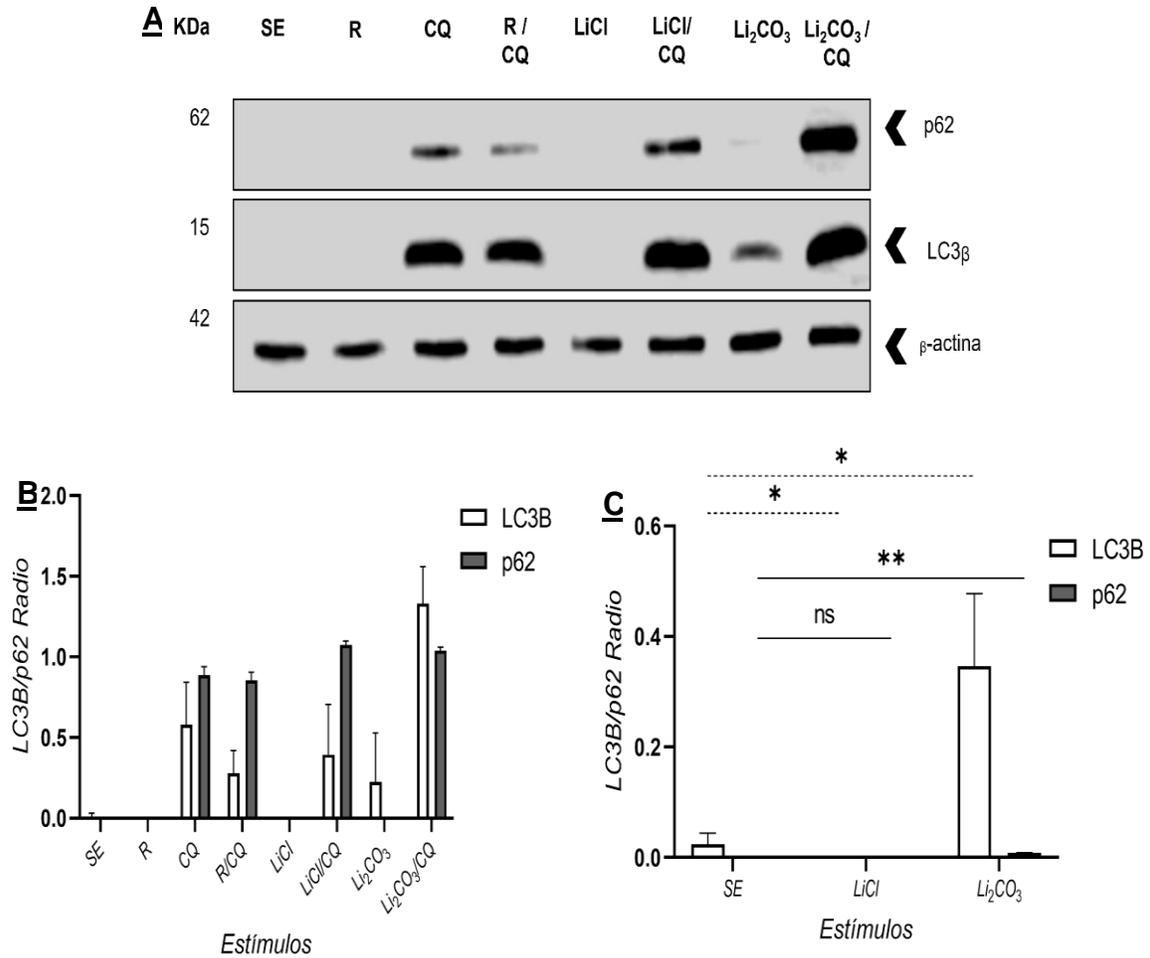


Figura 17. **Evaluación mediante Western Blot de la actividad autofágica en células HeLa estimuladas por 24 horas.** **A.** Imagen representativa de los niveles de expresión de las proteínas LC3β y p62, usando β-actina como control de carga. **B.** Análisis densitométrico de los niveles de expresión de LC3β y p62. **C.** Comparación de los niveles de expresión de LC3β y p62 de SE vs LiCl y Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. (\* $p < 0.0332$ , \*\* $p < 0.0021$ )

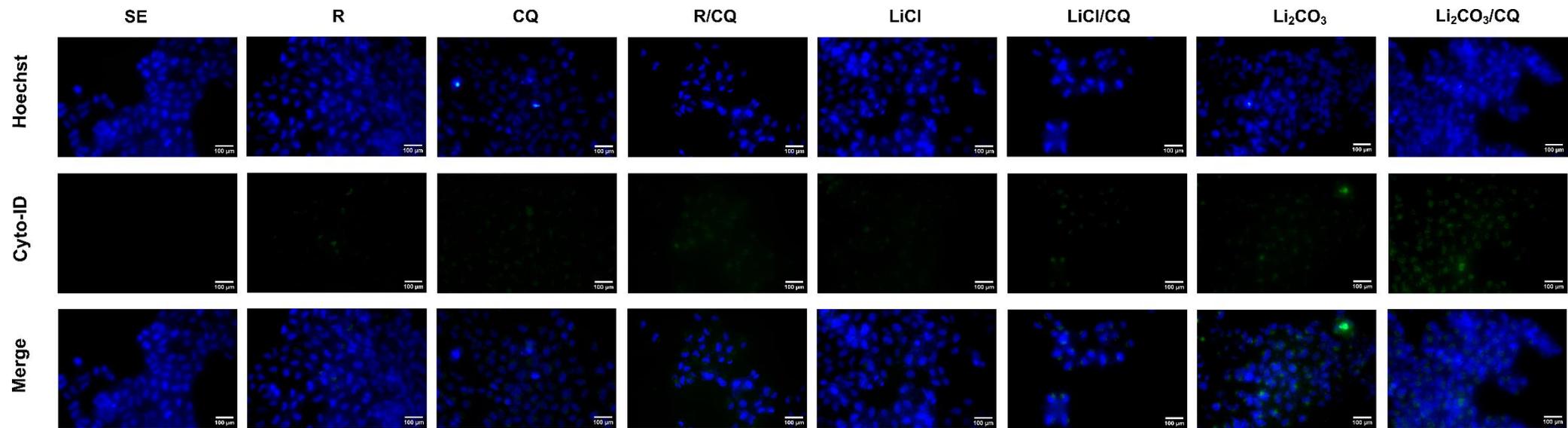


Figura 18. **Evaluación mediante Cyto-ID de la actividad autofágica en células HeLa estimuladas por 24 horas.** A. La acumulación de autofagosomas únicamente es visible en células estimuladas con CQ y en las células estimuladas con LiCl y Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

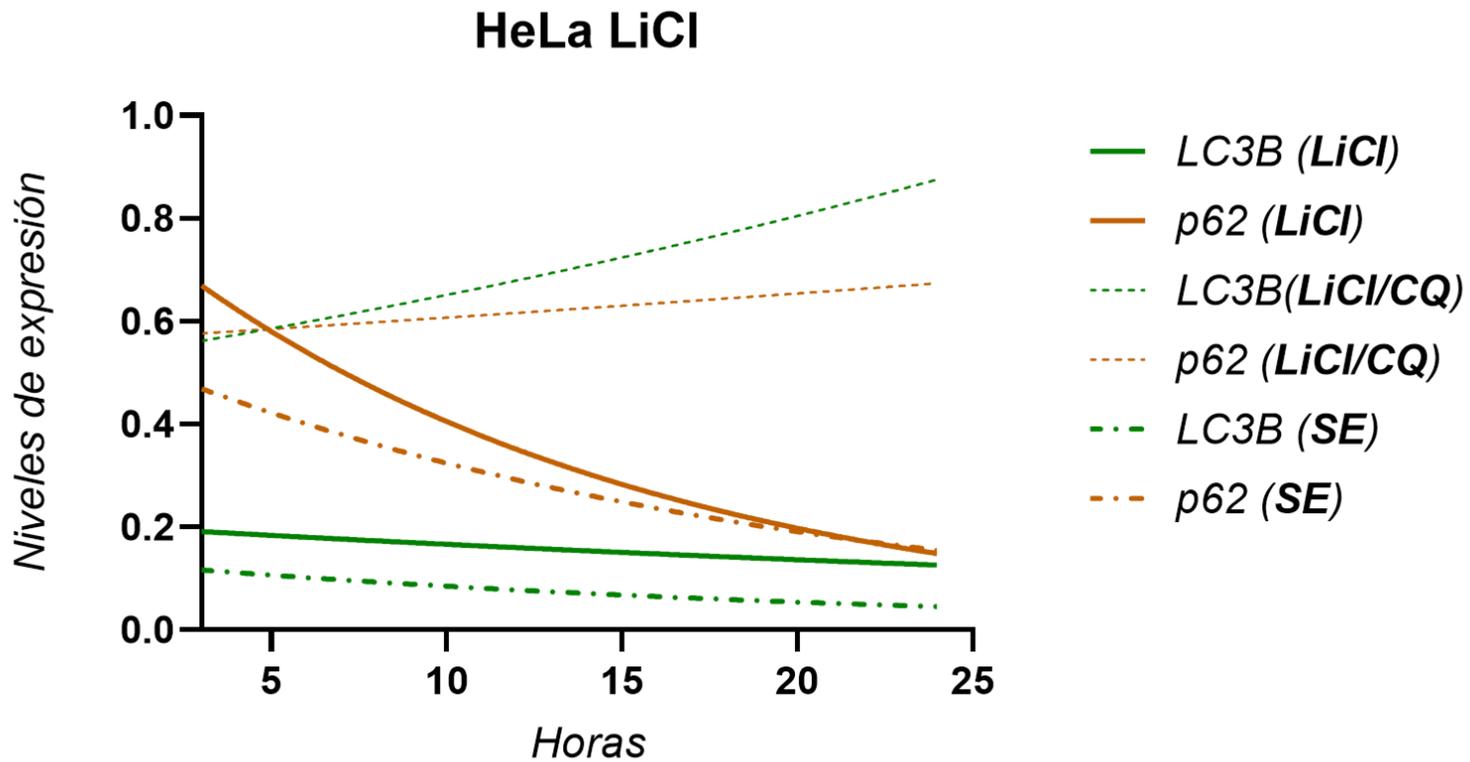


Figura 19. **Comparativa del flujo autofágico en células HeLa mediado por LiCl durante 24 horas.** Comparativa de los niveles de expresión de LC3 $\beta$  y p62 en células HeLa estimuladas con LiCl, LiCl/CQ y SE. La síntesis de autofagosomas es mayor cuando se arresta el flujo autofágico con CQ, sin embargo p62 no es degradado. El tratamiento con LiCl favorece la síntesis de autofagosomas y degradación de p62 en proporción mayor que cuando las células son tratadas SE.

#### 9.1.5 El flujo autofágico mediado por LiCl en células HeLa.

En la **figura 19** se utilizó un modelo de regresión no lineal exponencial, para analizar el flujo autofágico mediado por LiCl en células HeLa. Se observó una disminución en los niveles de p62 y una reducción mínima en los niveles de LC3 $\beta$  durante un periodo de 24 horas, lo que sugiere inducción de autofagia. Se sabe que p62 se degrada junto con LC3 $\beta$  al fusionarse con lisosomas. Esta afirmación se respalda al observar que, cuando se indujo arresto del flujo autofágico, los niveles de p62 y LC3 $\beta$  se sobreexpresaron desde las primeras 3 horas y se mantuvieron en aumento en tiempos posteriores, indicando ausencia de degradación lisosomal en ambos marcadores moleculares.

Al comparar el efecto del LiCl con el de las células no estimuladas, se observa una tendencia similar entre ambos grupos. Es decir, los niveles de expresión de p62 y LC3 $\beta$  disminuyen con el tiempo. Sin embargo, la expresión tanto de p62 como de LC3 $\beta$  es mayor en el grupo estimulado con LiCl en contraste con el grupo no estimulado. Esto sugiere que el LiCl además de inducir autofagia sostenida, promueve un flujo autofágico constante.

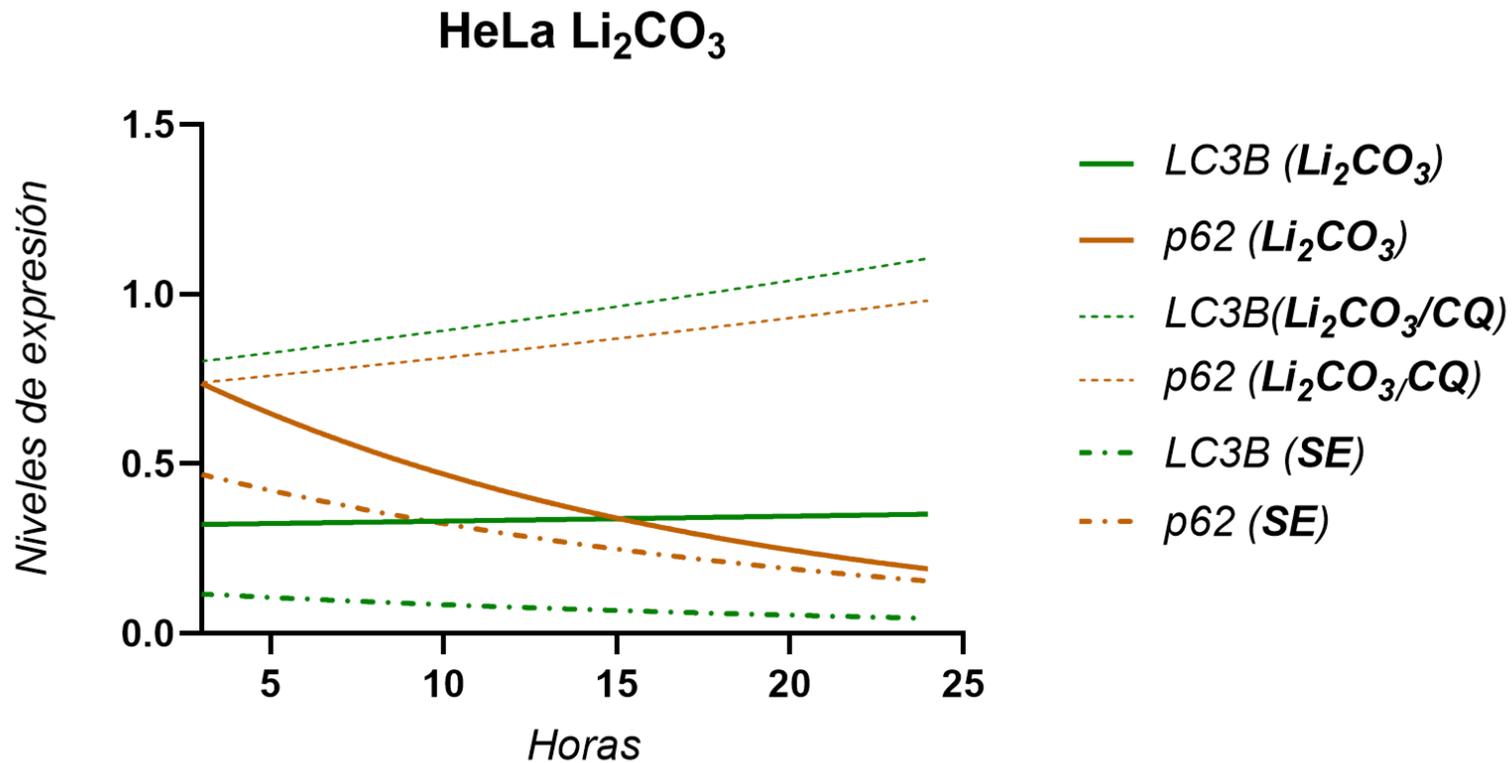


Figura 20. **Comparativa del flujo autofágico en células HeLa mediado por  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  durante 24 horas.** Comparativa de los niveles de expresión de LC3 $\beta$  y p62 en células HeLa estimuladas con  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Li}_2\text{CO}_3/\text{CQ}$  y SE. La síntesis de autofagosomas es mayor cuando se arresta el flujo autofágico con CQ, sin embargo, p62 no es degradado. Las células tratadas SE muestran degradación de LC3 $\beta$  y p62 de manera tiempo-dependiente, pero en proporción menor a los otros estímulos. Las células tratadas con  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  muestran un aumento en los niveles de expresión de LC3 $\beta$  tiempo-dependiente, al mismo tiempo que existe una importante disminución de los niveles de p62.

#### 9.1.6 El flujo autofágico mediado por $\text{Li}_2\text{CO}_3$ en células HeLa.

Se consideraron las condiciones enunciadas en la **figura 20** para realizar una comparativa entre el flujo autofágico de las células tratadas con  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ , SE y  $\text{Li}_2\text{CO}_3/\text{CQ}$ , con la finalidad de determinar la proporción en que p62 aumentaba o disminuía frente a los niveles de expresión de LC3 $\beta$  a lo largo de 24 horas. Las células estimuladas con CQ, al estar sometidas a un arresto en el flujo autofágico, exhibieron aumento en los niveles de expresión de LC3 $\beta$  y p62 conforme transcurría el tiempo, esto indica ausencia en la degradación del cargo y por lo tanto, un flujo autofágico interrumpido. Las células tratadas SE muestran degradación de LC3 $\beta$  y p62 de manera tiempo-dependiente, lo que indica la presencia de actividad autofágica basal pero en una proporción menor, cuyo pico más alto se muestra en los primeros intervalos de tiempo. Las células tratadas con  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  muestran un aumento en los niveles de expresión de LC3  $\beta$  que rebasa los niveles de expresión de p62 cumplidas las 24 horas, contrastando con la tendencia que siguen las células SE, pues el  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  genera un comportamiento inversamente proporcional a los niveles de expresión de p62, esto sugiere actividad autofágica sostenida.

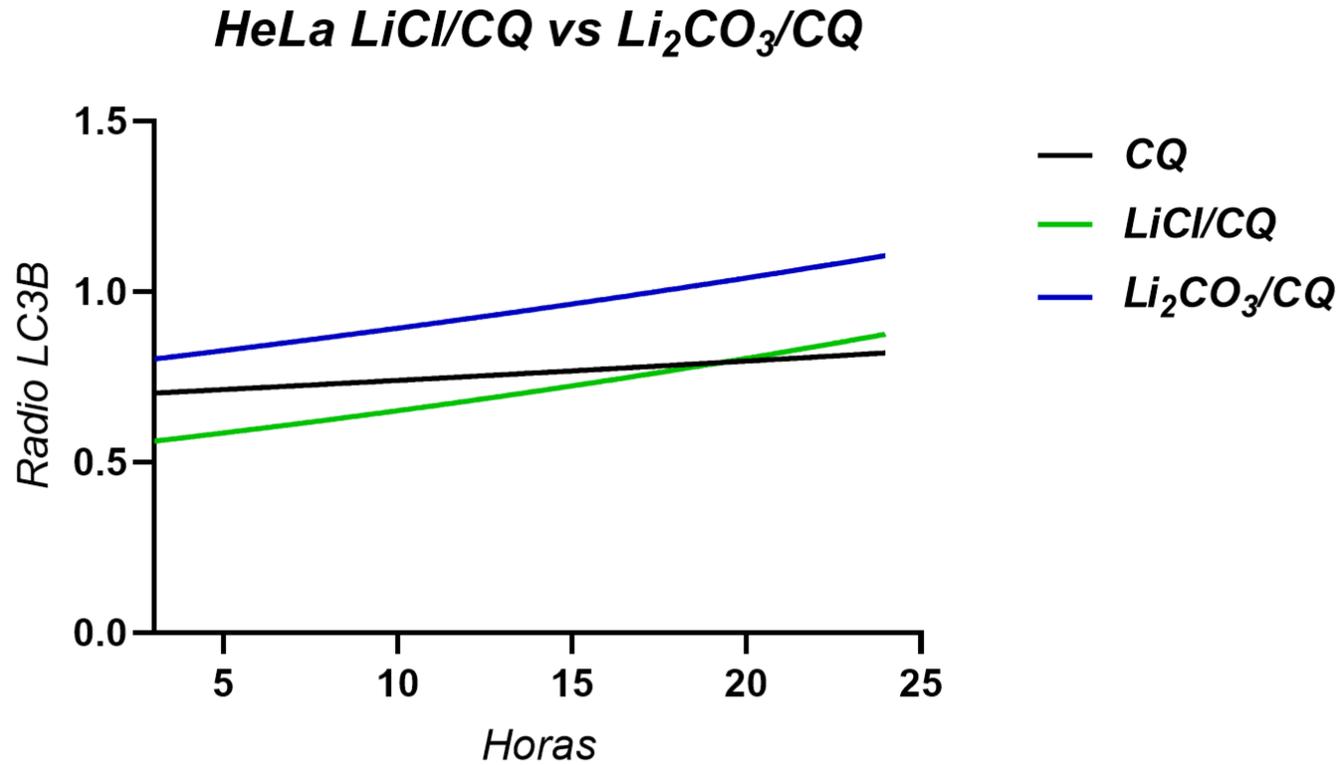


Figura 21. **Comparativa de los niveles de expresión de LC3B en células HeLa mediado por LiCl/CQ, Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/CQ y CQ durante 24 horas.** Los tres estímulos generan un aumento tiempo-dependiente en la expresión de LC3β, en el caso de CQ, el aumento está dado por un arresto en la degradación de los autofagosomas. Cuando se estimuló con LiCl/CQ y Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/CQ se observó mayor síntesis de autofagosomas, principalmente en células tratadas con Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/CQ.

### 9.1.7 Síntesis de autofagosomas de células HeLa durante 24 horas.

La **figura 21** refleja la síntesis de autofagosomas a lo largo de 24 horas en células HeLa. Se monitoreó la síntesis de autofagosomas mediante el análisis de los niveles de expresión de LC3 $\beta$  durante un periodo de 24 horas. La CQ, al elevar el pH lisosomal, genera un arresto en el flujo autofágico en el cual hay ausencia de degradación de los autofagosomas, resultando en su acumulación por acción de la CQ. Por otro lado, cuando las células fueron estimuladas con LiCl/CQ, Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/CQ la síntesis de autofagosomas aumentó de manera tiempo dependiente, en donde se observa que los niveles de expresión de LC3 $\beta$  en células estimuladas con LiCl/CQ y Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/CQ rebasan los niveles de expresión de las células estimuladas únicamente con CQ cumplidas las 24 horas.

## 9.2 Patrones temporales en células SiHa: efecto de los estímulos en la inducción de autofagia.

### 9.2.1 3 Horas

Como se muestra en la **figura 22**, se detectaron niveles de expresión de p62 mayores a los de LC3 $\beta$ , observándose mayor expresión en células estimuladas con Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, al mismo tiempo los niveles de expresión de LC3 $\beta$  no mostraron significancia estadística frente al grupo SE.

En la **figura 23** se observa presencia de autofagosomas únicamente en grupos que contenían CQ.

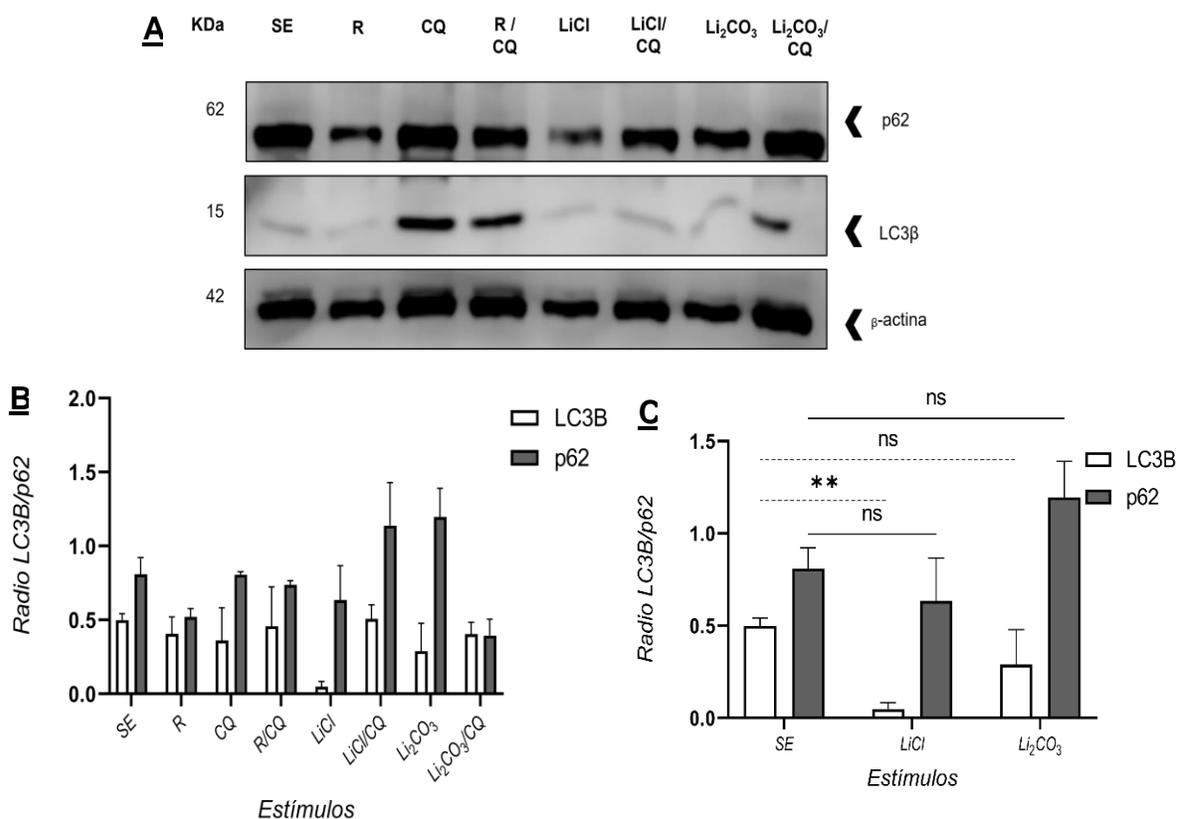


Figura 22.. **Evaluación mediante Western Blot de la actividad autofágica en células SiHa estimuladas por 3 horas.** **A.** Imagen representativa de los niveles de expresión de las proteínas LC3 $\beta$  y p62, usando  $\beta$ -actina como control de carga. **B.** Análisis densitométrico de los niveles de expresión de LC3 $\beta$  y p62. **C.** Comparación de los niveles de expresión de LC3 $\beta$  y p62 de SE vs LiCl y Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. (\* $p$  < 0.0332, \*\* $p$  < 0.0021).

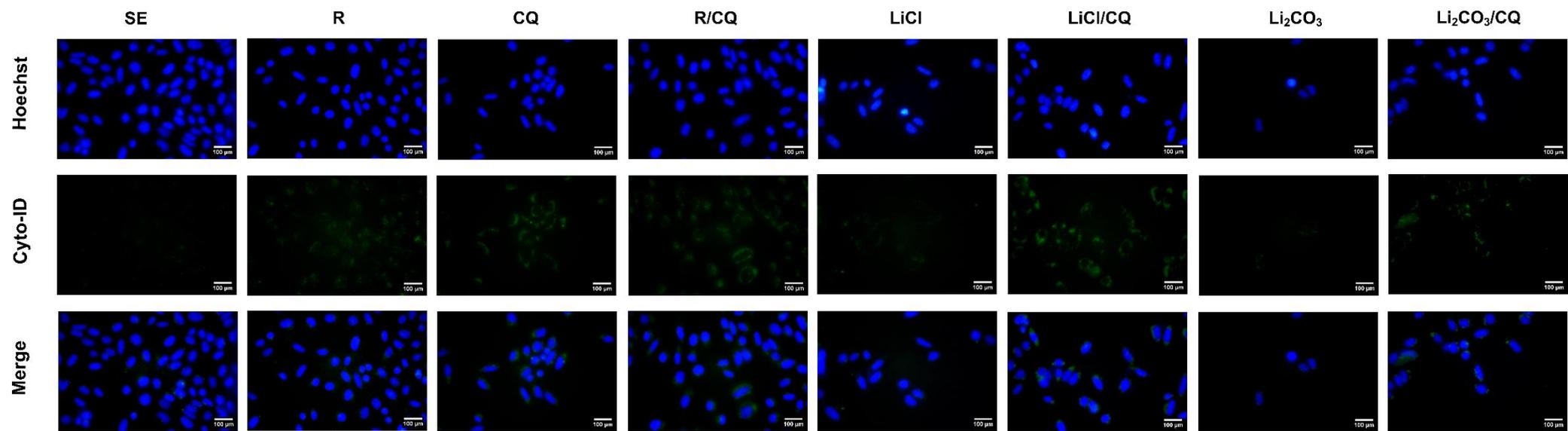
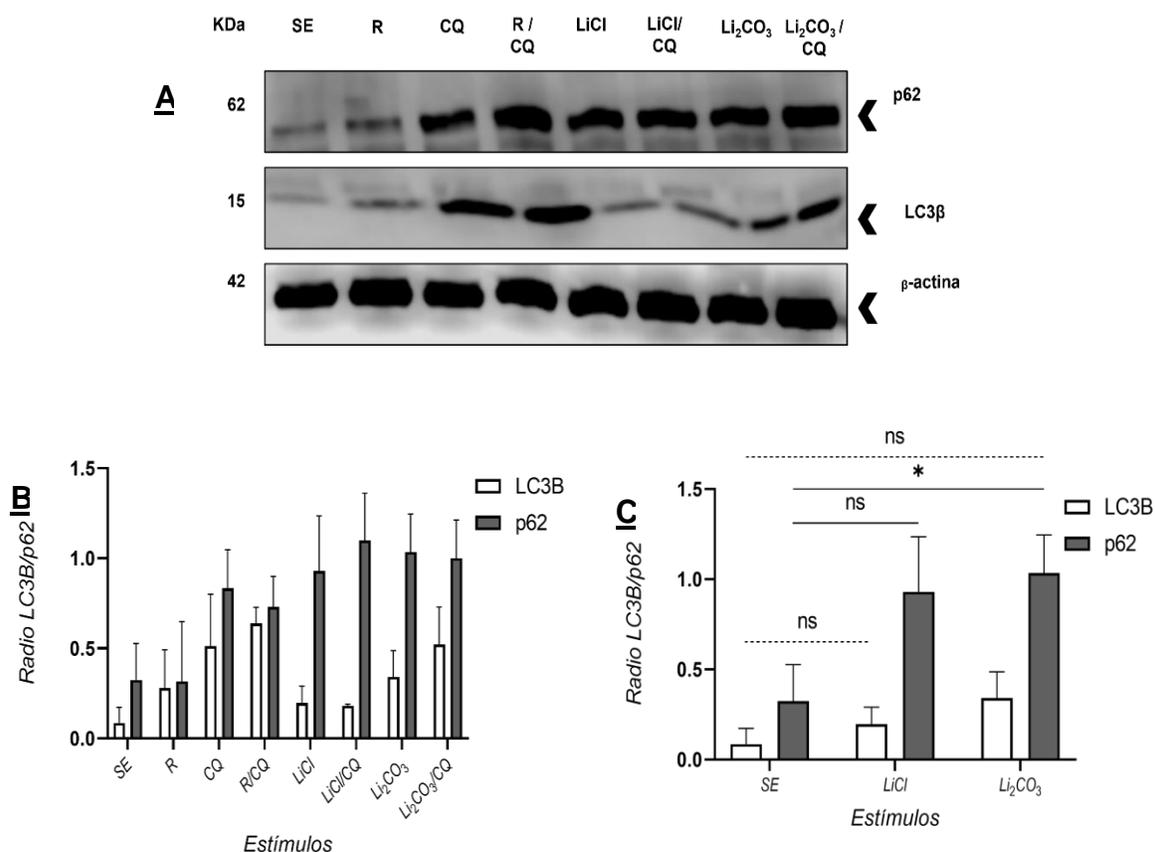


Figura 23. **Evaluación mediante Cyto-ID de la actividad autofágica en células SiHa estimuladas por 3 horas.** A. La acumulación de autofagosomas es visible en células estimuladas con CQ mientras que las células que no fueron estimuladas y las células estimuladas con R emitieron señal débil.

### 9.2.2 6 Horas

En la **figura 24**, los niveles de expresión de LC3 $\beta$  mostraron aumento en células estimuladas con sales de litio en contraste con el gupo SE, sin embargo, los niveles de expresión de p62 también mostraron aumento en contraste con las células basales. En la **figura 25** se observa presencia de autofagosomas únicamente en grupos que contenían CQ. De especial interés es que los grupos LiCl/CQ y Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/CQ no favorecieron la acumulación de autofagosomas.



**Figura 24. Evaluación mediante Western Blot de la actividad autofágica en células SiHa estimuladas por 6 horas.** **A.** Imagen representativa de los niveles de expresión de las proteínas LC3 $\beta$  y p62, usando  $\beta$ -actina como control de carga. **B.** Análisis densitométrico de los niveles de expresión de LC3 $\beta$  y p62. **C.** Comparación de los niveles de expresión de LC3 $\beta$  y p62 de SE vs LiCl y Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. (\* $p$  < 0.0332, \*\* $p$  < 0.0021).

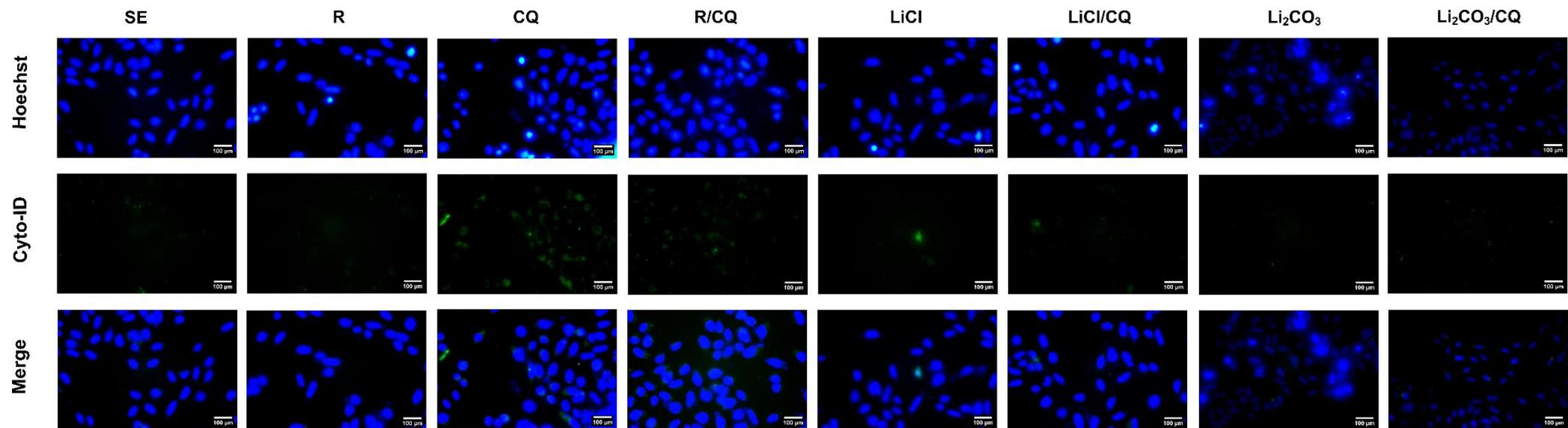
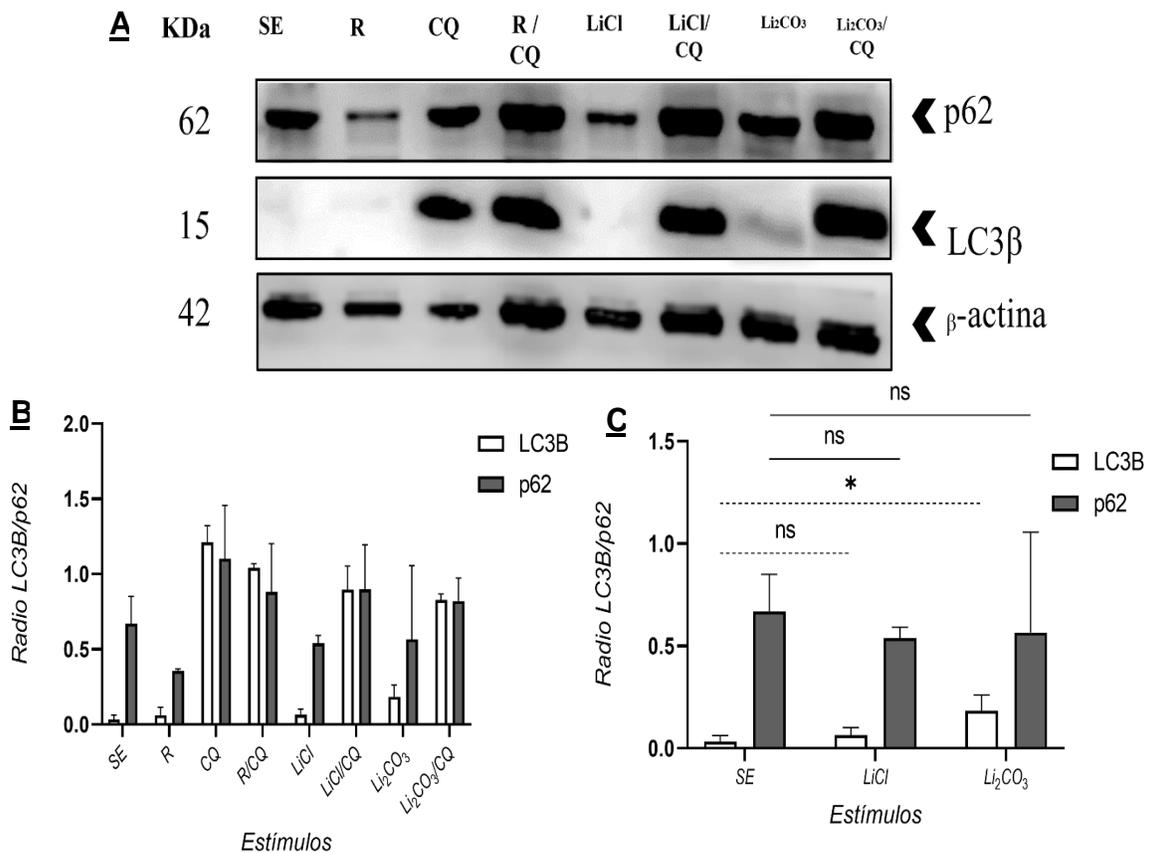


Figura 25. **Evaluación mediante Cyto-ID de la actividad autofágica en células SiHa estimuladas por 6 horas.** A. La acumulación de autofagosomas únicamente es visible en células estimuladas con CQ.

### 9.2.3 12 Horas

La **figura 26** muestra baja expresión de LC3 $\beta$  en células basales, y células estimuladas con R, LiCl y Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, las células estimuladas con CQ, R/CQ, LiCl/CQ y Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/CQ mostraron mayor expresión de p62 y LC3 $\beta$ . En general, los niveles de expresión de p62 no disminuyeron de manera significativa en contraste con los niveles de p62 de células basales. Al igual que en los tiempos anteriores, como se muestra en la **figura 27** la presencia de autofagosomas únicamente fue visible en grupos que contenían CQ.



**Figura 26. Evaluación mediante Western Blot de la actividad autofágica en células SiHa estimuladas por 12 horas.** **A.** Imagen representativa de los niveles de expresión de las proteínas LC3 $\beta$  y p62, usando  $\beta$ -actina como control de carga. **B.** Análisis densitométrico de los niveles de expresión de LC3 $\beta$  y p62. **C.** Comparación de los niveles de expresión de LC3 $\beta$  y p62 de SE vs LiCl y Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. (\* $p$  < 0.0332, \*\* $p$  < 0.0021).

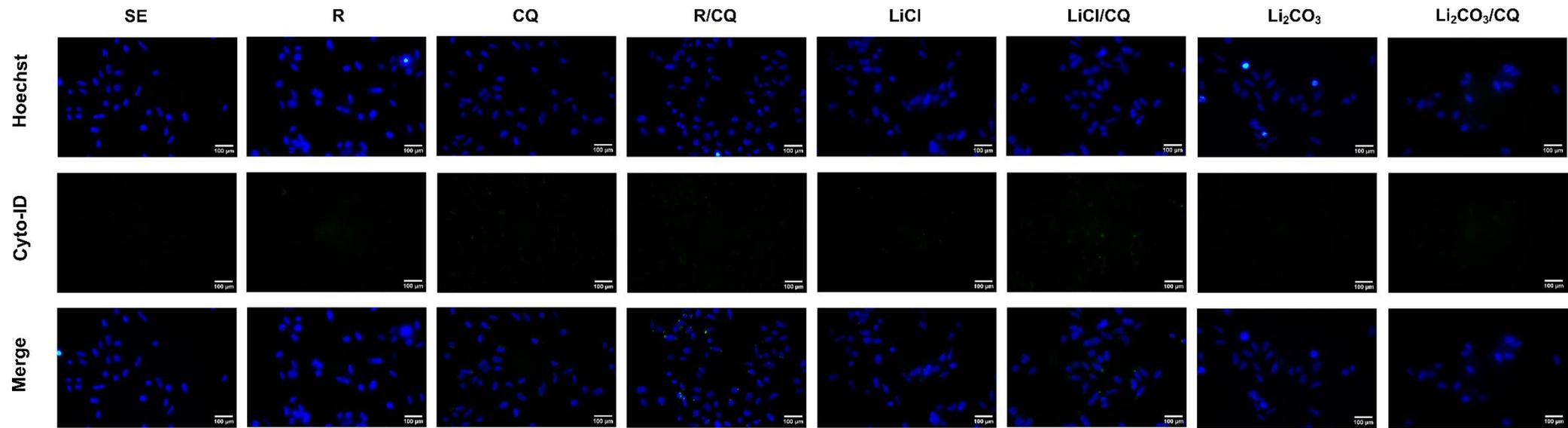
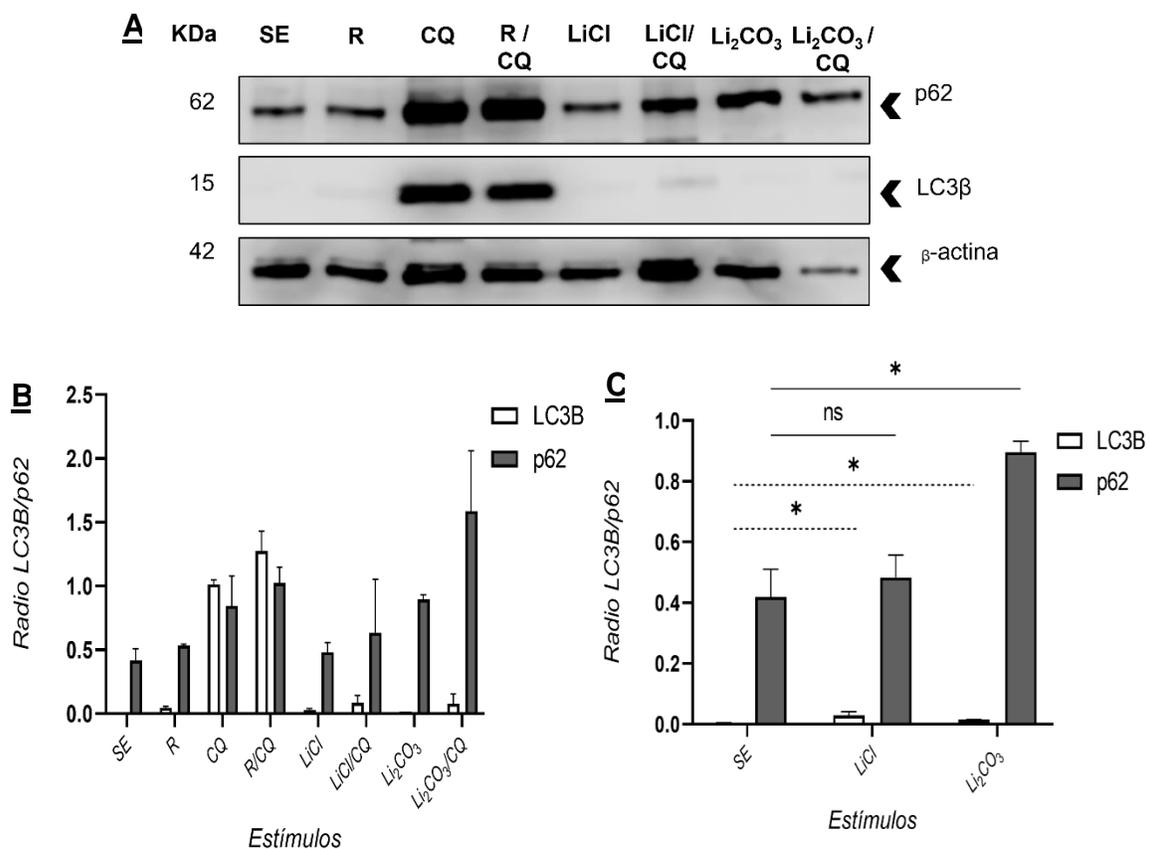


Figura 27. **Evaluación mediante Cyto-ID de la actividad autofágica en células SiHa estimuladas por 12 horas.** La acumulación de autofagosomas únicamente es visible en células estimuladas con Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

### 9.2.4 24 Horas

En contraste con células basales, la expresión del LiCl y Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> fueron mayores a las 24 horas, sin embargo, como se muestra en la **figura 28** dichos niveles de expresión no rebasaron en los niveles de p62, quedando en evidencia que la ausencia de la disminución de los niveles de p62 está directamente ligada a la falta de sobreexpresión de LC3β.

En la **figura 29** sólo se observó presencia de autofagosomas el grupo R/CQ.



**Figura 28. Evaluación mediante Western Blot de la actividad autofágica en células SiHa estimuladas por 24 horas.** A. Imagen representativa de los niveles de expresión de las proteínas LC3β y p62, usando β-actina como control de carga. B. Análisis densitométrico de los niveles de expresión de LC3β y p62. C. Comparación de los niveles de expresión de LC3β y p62 de SE vs LiCl y Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. (\*p = <0.0332, \*\*p = <0.0021).

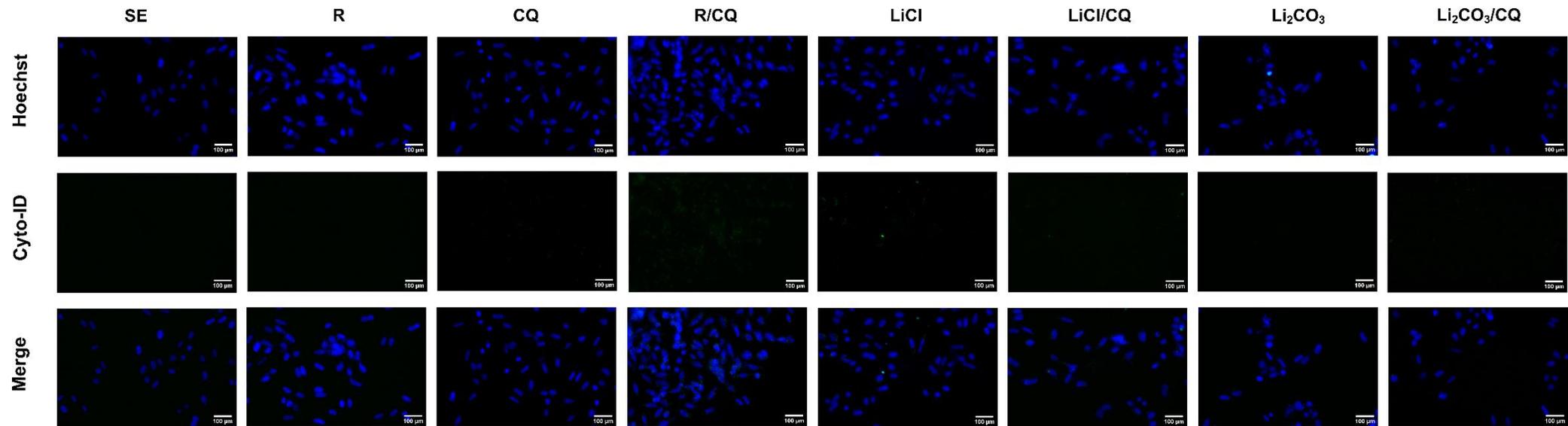


Figura 29. **Evaluación mediante Cyto-ID de la actividad autofágica en células SiHa estimuladas por 24 horas.** La acumulación de autofagosomas únicamente es visible en células estimuladas con R/CQ.

## SiHa LiCl

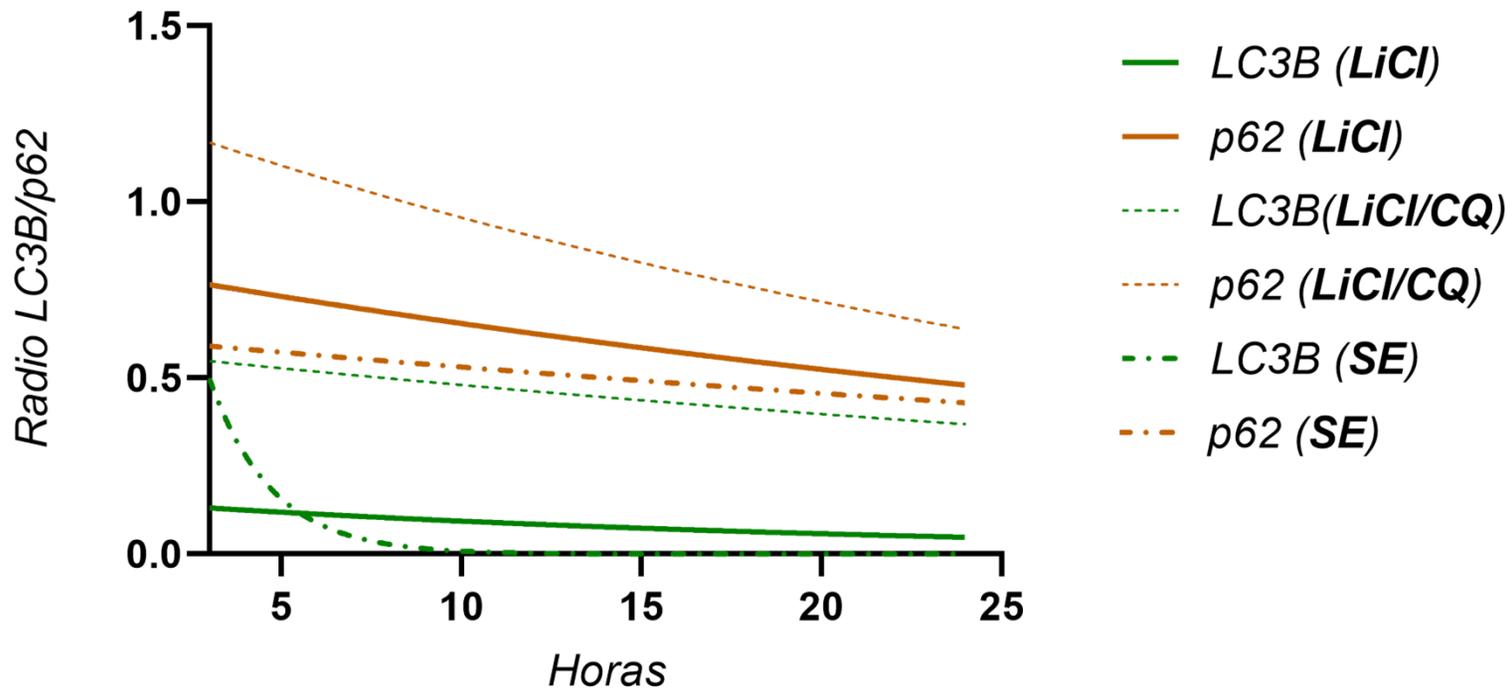


Figura 30. **Comparativa del flujo autofágico en células SiHa mediado por LiCl durante 24 horas.** Comparativa de los niveles de expresión de LC3 $\beta$  y p62 en células SiHa estimuladas con LiCl, LiCl/CQ y SE. La síntesis de autofagosomas es mayor cuando se arresta el flujo autofágico con CQ, sin embargo, p62 no es degradado. El tratamiento con LiCl no aumenta la síntesis de autofagosomas y la degradación de p62 es mínima.

### 9.2.5 El flujo autofágico mediado por LiCl en células SiHa.

Se utilizó un modelo de regresión no lineal exponencial en la **figura 30** para analizar el flujo autofágico mediado por LiCl en células SiHa. Se realizó una comparativa de los niveles de expresión de p62 y LC3 $\beta$  entre los grupos SE, LiCl y LiCl/CQ. Las células en estado basal presentan actividad autofágica canónica durante los primeros intervalos de tiempo, transcurridas las 6 horas esta actividad decae totalmente, pues los niveles de expresión de LC3 $\beta$  disminuyen de manera exponencial, al mismo tiempo que los niveles de expresión de p62 muestran una disminución ligera. Cuando las células fueron estimuladas con LiCl los niveles de expresión de LC3 $\beta$  son incluso menores que en las células SE, al mismo tiempo los niveles de p62 son ligeramente mayores y su degradación también es ligera durante 24 horas. Por último, la ausencia de síntesis de autofagosomas mediada por el LiCl es evidente en el grupo estimulado con LiCl/CQ en donde se observa mayores niveles de expresión de LC3 $\beta$  que en los otros dos grupos, pero con una tendencia a la baja de manera tiempo-dependiente.

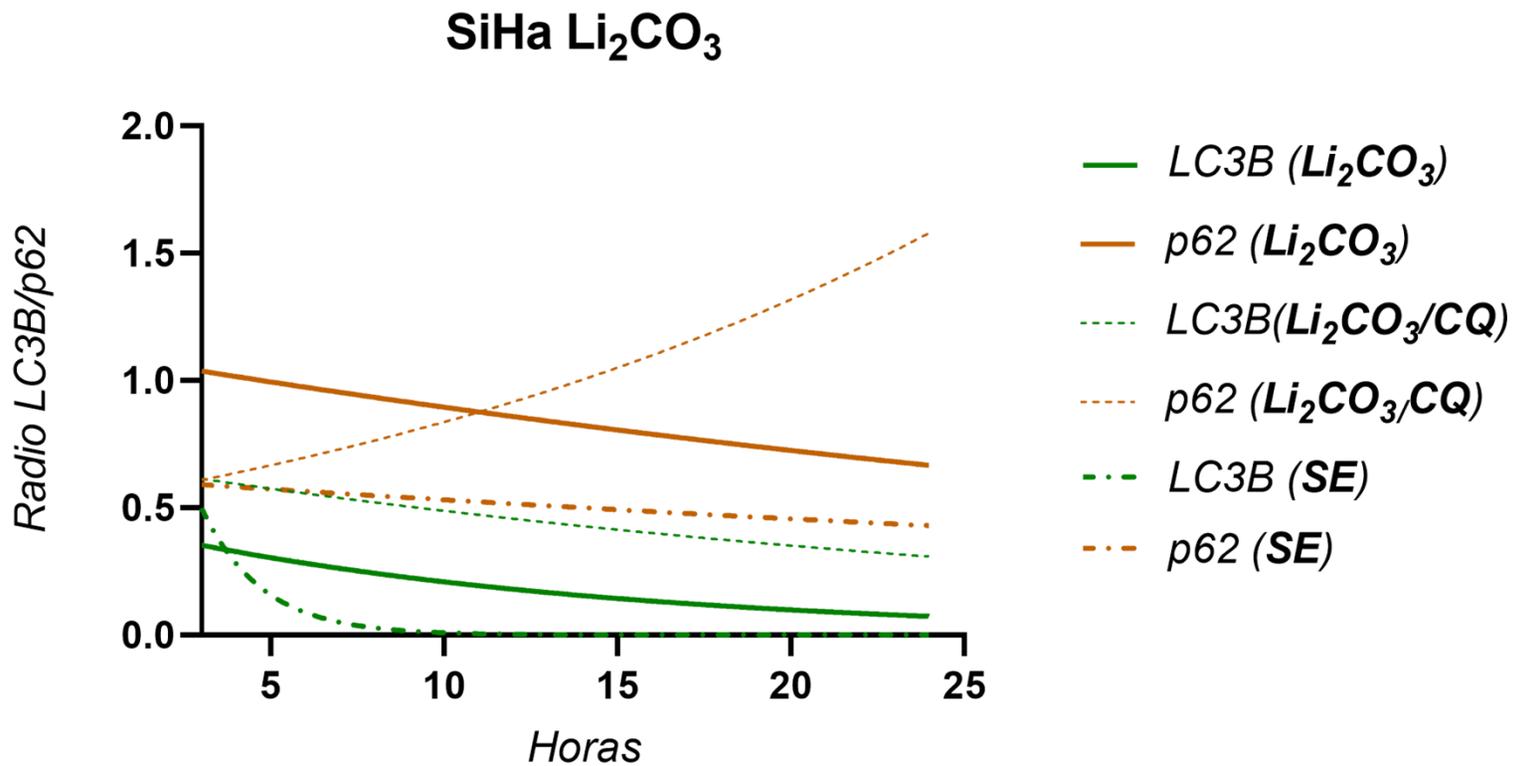


Figura 31. **Comparativa del flujo autofágico en células SiHa mediado por  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  durante 24 horas.** Comparativa de los niveles de expresión de LC3 $\beta$  y p62 en células SiHa estimuladas con  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Li}_2\text{CO}_3/\text{CQ}$  y SE. La síntesis de autofagosomas es ligeramente mayor cuando se estimuló con  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  vs SE. La degradación de p62 es mínima. Células estimuladas con CQ aumentaron niveles de expresión de p62 y los niveles de LC3 $\beta$  se redujeron de manera tiempo dependiente.

### 9.2.6 El flujo autofágico mediado por $\text{Li}_2\text{CO}_3$ en células SiHa.

En la **figura 31** se utilizó un modelo de regresión no lineal exponencial para analizar el flujo autofágico mediado por  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  en células SiHa. Se realizó una comparativa de los niveles de expresión de p62 y LC3 $\beta$  entre los grupos SE, LiCl y LiCl/CQ. Como se mencionó anteriormente, las células en estado basal presentan actividad autofágica canónica durante los primeros intervalos de tiempo. Transcurridas las 6 horas esta actividad decae totalmente, pues los niveles de expresión de LC3 $\beta$  disminuyen de manera exponencial, al mismo tiempo que los niveles de expresión de p62 muestran una disminución ligera. Cuando las células fueron estimuladas con  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  los niveles de expresión de LC3 $\beta$  también fueron menores que en las células SE, al mismo tiempo los niveles de p62 son ligeramente mayores y su degradación también es mínima durante 24 horas. La ausencia de síntesis de autofagosomas mediada por el  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  también es visible en el grupo estimulado con LiCl/CQ en donde se observa mayores niveles de expresión de LC3 $\beta$  que en los otros dos grupos, pero con una tendencia a la disminución de manera tiempo-dependiente.

## SiHa LiCl/CQ vs Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/CQ

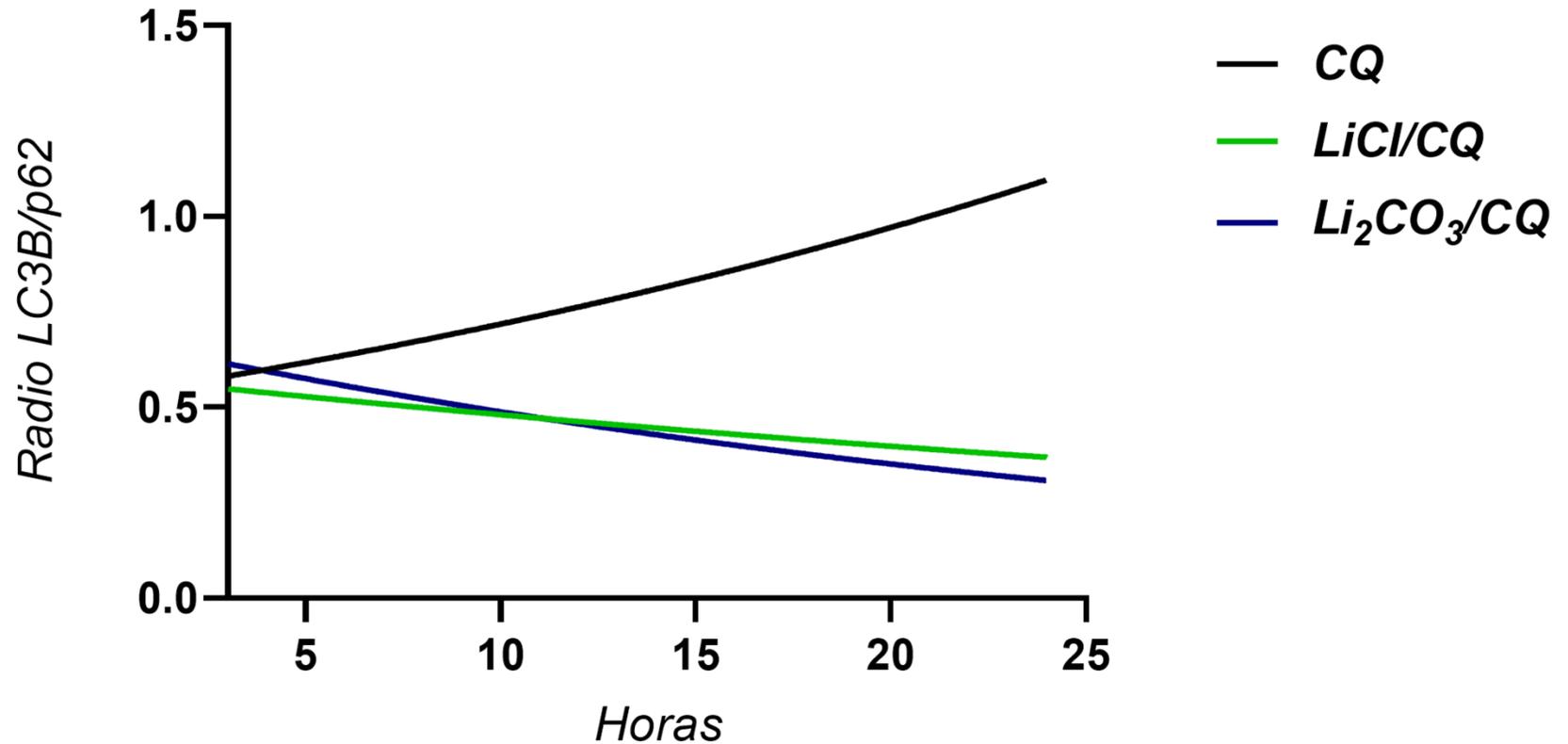


Figura 32. Comparativa de los niveles de expresión de LC3B en células SiHa mediado por LiCl/CQ, Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/CQ y CQ durante 24 horas. La CQ genera un arresto en el flujo autofágico que genera acumulación de autofagosomas, sin embargo, tanto LiCl/CQ como Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/CQ no generaron un aumento en la síntesis de autofagosomas.

### 9.2.7 Síntesis de autofagosomas de células SiHa durante 24 horas.

La **figura 32** se muestra el comportamiento de las células que fueron estimuladas con LiCl/CQ, Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/CQ y CQ y se monitoreó la síntesis de autofagosomas mediante el análisis de los niveles de expresión de LC3β durante un periodo de 24 horas. La CQ, al igual que en células HeLa, genera un arresto en el flujo autofágico que se visualiza en la figura 23, en donde los autofagosomas producidos de manera canónica se acumulan por acción de la CQ. Cuando las células fueron estimuladas con LiCl/CQ, Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/CQ la síntesis de autofagosomas decayó de manera tiempo dependiente, pues los niveles de expresión de LC3β es visiblemente menor que los niveles de expresión de las células estimuladas únicamente con CQ cumplidas las 24 horas.

## 10. Discusión

Aunque son casi nulos los estudios de sales de litio en cáncer cervical, existen estudios enfocados en múltiples modelos *in vitro* de cáncer que han permitido tener un acercamiento a sus dianas moleculares e incluso a su relación con la inducción de autofagia mediante la vía independiente de mTOR, relacionada con la disminución de los niveles de IMPasa (Motoi *et al.*, 2014; Sarkar & Rubinsztein, 2006).

### 10.1 Inducción de autofagia en células HeLa y SiHa estimuladas con LiCl y Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

El efecto del LiCl y del Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> entre células HeLa y SiHa es totalmente distinto, esto es porque se trata de células de tejidos relacionados, pero que son distintas genéticamente y fenotípicamente entre sí (Scheffner *et al.*, 1991), dichas diferencias genéticas podrían derivar en un estado metabólico completamente distinto entre los dos modelos utilizados, por ejemplo, las sales de litio regulan los niveles de calcio en el citosol mediante la regulación de la unión entre IP<sub>3</sub> (Inositol 1,4,5-trifosfato) e IP<sub>3</sub>R (IP<sub>3</sub> Receptor), sin embargo el rol de IP<sub>3</sub>R es aún complejo, ya que tiene un rol dual en la inducción o inhibición de la autofagia, en algunos casos el knockdown de IP<sub>3</sub>R o una expresión deficiente de este receptor ha demostrado tener relación con actividad autofágica basal alta, sin embargo en otros casos se ha demostrado que IP<sub>3</sub>R regula negativamente la autofagia mediante la interacción con Beclina-1, dichas discrepancias están totalmente asociadas al modelo *in vitro* en cuestión (Sukumaran *et al.*, 2021).

## 10.2 El flujo autofágico en células HeLa y SiHa estimuladas con LiCl y Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

El flujo autofágico se caracteriza por tener una duración corta, ya que su principal función es la del reciclaje de componentes intracelulares para promover la supervivencia celular. Este proceso fue evaluado a partir del contraste entre los niveles de expresión de LC3 $\beta$  y p62 inducidos por sales de litio frente a los niveles de expresión de los mismos marcadores moleculares bajo condiciones de arresto del flujo autofágico inducida por cloroquina, este contraste permitió identificar un flujo autofágico continuo inducido por las sales de litio a lo largo de 3, 6, 12 y 24 horas en células HeLa, y ausencia de sobreproducción de autofagosomas en células SiHa.

Las células tratadas con cloroquina exhibieron aumento en los niveles de expresión de LC3 $\beta$  conforme transcurrían las 24 horas de estudio, y los niveles de p62 mantenían niveles de expresión constantes a lo largo del tiempo, indicando ausencia de degradación lisosomal de ambas proteínas, esto está totalmente atribuido a la acción de la cloroquina, un compuesto usado actualmente como inhibidor de autofagia tardía. Se ha mostrado influencia de la cloroquina en el arresto del ciclo celular en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Ye *et al.*, 2016), al mismo tiempo eleva el pH lisosomal de 5.0 a 7.0, evitando así la acción de las hidrolasas contenidas en el lisosoma, previniendo su fusión con el autofagosoma, dando como resultado final el arresto del flujo autofágico (Xu *et al.*, 2022).

La rapamicina y sales de litio promueven el flujo autofágico, sin embargo, la magnitud del efecto de ambos compuestos difiere entre sí y está determinada por

el tipo de vía que activan respectivamente: rapamicina (mTOR) y sales de litio (IMPasa). En ambos casos, la expresión de LC3 $\beta$  aumenta, mientras p62 disminuye, sin embargo, lo que destaca de los tratamientos con sales de litio en células HeLa, es la capacidad de promover la formación de autofagosomas detectables aun en intervalos de tiempo mayores a 12 horas, especialmente en tratamientos con Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Esto se debe a que la rapamicina activa la vía de la autofagia, pero su efecto se limita a intervalos cortos de tiempo, lo cual sugiere que la inactivación de mTOR podría actuar como un mecanismo quimioprotector (O'Donovan *et al.*, 2015).

Como se ha mencionado anteriormente, la actividad autofágica es comunmente baja en condiciones basales y esto quedó demostrado en el presente estudio y en estudios previos realizados por Chan y colaboradores, quienes observaron, mediante citometría de flujo y el uso del kit de detección de autofagia Cyto-ID, que la señal de autofagia presentaba un decremento en periodos de 8 horas frente a periodos de 4 horas (Chan *et al.*, 2012), sin embargo, en el presente trabajo de investigación, cuando se estimularon las células HeLa con sales de litio, se observó inducción de autofagia incluso a las 24 horas de haber sido aplicado el estímulo, lo cual sugiere que estas podrían actuar como agentes quimiosensibilizadores, pudiendo inducir muerte celular programada no apoptótica, ya que alteraciones en el flujo autofágico pueden derivar en acumulación excesiva de autofagosomas y conversión de la autofagia en un proceso destructivo, tal como se ha observado en estudios *in vitro* recientes, donde al aplicarse Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a una concentración de 5 mM a células HCC-29 por 24 y 48 horas, el número de células apoptóticas aumentó, al

mismo tiempo que se observó aumento en la producción de autolisosomas y del marcador molecular de autofagia LC3 $\beta$ , sugiriendo así que bajo este contexto se considera que la autofagia fungió como mecanismo de muerte celular, ya que lo anterior mencionado mostró relación directa con la reducción en la cantidad de células viables (Taskaeva *et al.*, 2020).

### **10.3 Mecanismos de acción de las sales de litio como inductoras de autofagia.**

En el presente trabajo, únicamente se evaluó la capacidad de inducción de autofagia de las sales de litio, sin embargo, la divergencia de resultados entre las células HeLa y SiHa podría encontrar su explicación en las interacciones moleculares que promueven las sales de litio, por lo que en la **figura 33** se proponen las interacciones que promueven las sales de litio y su relación con la inducción de autofagia.

La relación entre la vía de la IMPasa y la autofagia aún no está bien caracterizada, por lo que cuando la IMPasa se encuentra activa por la unión del ión Mg<sup>2+</sup>, la autofagia se podría encontrar inhibida o activa, dependiendo del contexto celular. Se sabe que el litio inhibe la enzima IMPasa, dicha inhibición surge a partir de la interferencia del litio con la presencia de iones Mg<sup>2+</sup> en el sitio catalítico de la enzima (O'Donovan *et al.*, 2015). La IMPasa es una enzima fundamental en el metabolismo del PI (fosfatidilinositol), cuyas isoformas se vinculan con múltiples procesos metabólicos (Serretti *et al.*, 2009).

Los fosfoinositidos, PIP<sub>3</sub> (Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato), IP<sub>3</sub> y PI3P (Fosfatidilinositol 3-fosfato) están vinculados directa e indirectamente con la

inducción de autofagia, y cuando la ruta del PI se encuentra inactiva, los niveles de estos fosfoinositidos disminuyen, sin embargo, dicha disminución puede promover o inhibir la autofagia, según el contexto biológico (Sarkar *et al.*, 2005; Serretti *et al.*, 2009).

Tanto IP<sub>3</sub> como PIP<sub>3</sub> son producto de conversiones de PIP<sub>2</sub> (4,5) (Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, sin embargo, PLC (fosfolipasa C) es la encargada de producir IP<sub>3</sub>, mientras que el complejo PI3K clase I es el encargado de la producción de PIP<sub>3</sub>. En condiciones normales IP<sub>3</sub> se une a IP<sub>3</sub>R, ubicado en la membrana del RE, una vez se da esta unión, la membrana del RE se permea, liberando calcio, cuya concentración en el citosol tiene influencia en múltiples procesos celulares (Sukumaran *et al.*, 2021), cuando se trata con sales de litio, dichos niveles decaen debido a la ausencia de síntesis de IP<sub>3</sub> (Sarkar & Rubinsztein, 2006). Por otro lado, PIP<sub>3</sub> es el encargado de unirse a AKT y fosforilarlo, el cual a su vez fosforila a mTOR y lo mantiene activo para promover la síntesis de proteínas y supervivencia celular, sin embargo, las sales de litio inducen una disminución en los niveles de PIP<sub>3</sub>, lo que se traduce a una inactivación del eje PI3K/AKT/mTOR, que permite la activación del complejo ULK1 y a su vez se induzca la formación de autofagosomas (Sukumaran *et al.*, 2021).

Por último, el PI también puede ser transformado por el complejo PI3K clase III en PI3P, molécula relacionada con la formación de membranas precursoras de los autofagosomas (Liu *et al.*, 2017). Esto último es contradictorio con lo mencionado con IP<sub>3</sub> y PIP<sub>3</sub>, ya que si la vía del fosfatidilinositol se encuentra inactiva por acción del litio, entonces los niveles de PI3P también decaerían, generando una ausencia

de modificación en la estructura de la membrana del RE que dan paso a la formación de autofagosomas. Es probable que dicha paradoja tenga respuesta en la inactivación del eje PI3K/AKT/mTOR por disminución de los niveles de PIP<sub>3</sub> y por la disminución de los niveles de calcio mediado por la ausencia de unión entre IP<sub>3</sub> y IP<sub>3</sub>R, lo cual nos llevaría a formular la pregunta: ¿De dónde se obtiene PI3P cuando la ruta del PI se encuentra inhibida?

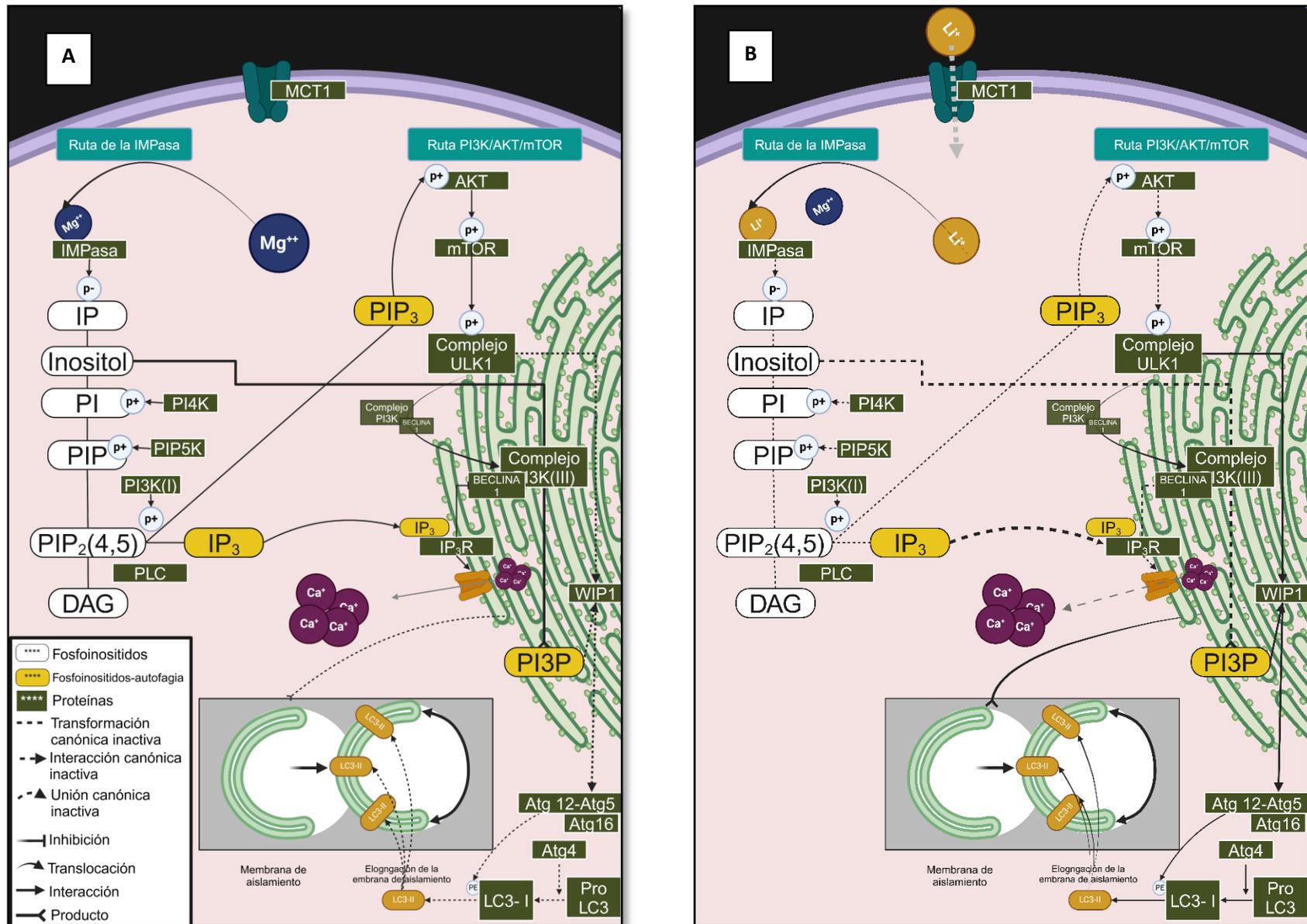


Figura 33. **Propuesta de las interacciones moleculares relacionadas con la inducción de autofagia mediada por sales de litio.** **A.** Vía canónica del Inositol mediada por la activación de la IMPasa. **B.** Vía dependiente del litio, el cual tiene acción directa en la vía del PI, generando disminución en niveles IP<sub>3</sub>, PIP<sub>3</sub> y PI3P, relacionados con la vía de la autofagia. Figura propuesta a partir de (Nordenberg et al., 1987; Sarkar et al., 2005; Sarkar & Rubinsztein, 2006; Serretti et al., 2009; Sukumaran et al., 2021)

#### **10.4 Posibles aplicaciones terapéuticas del LiCl y Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en cáncer.**

Aunque la mayoría de las estrategias terapéuticas están dirigidas a la modulación de la autofagia en cáncer, buscando su inhibición debido a la bien caracterizada relación con la supervivencia celular, también se sabe y se ha mencionado anteriormente que una desregulación en el flujo autofágico puede conducir a una muerte celular programada (Taskaeva *et al.*, 2020). El litio ha mostrado ser un compuesto que compromete la viabilidad celular mediante diversos mecanismos, que involucran: inhibición de la vía GSK-3 $\beta$ , efecto sinérgico que potencia el efecto antitumoral de múltiples quimioterapéuticos, un compromiso en la permeabilidad de la membrana lisosomal, disminución de los niveles de IMPasa mediante competencia con el Mg<sup>2+</sup> por el sitio catalítico (Villegas-Vázquez *et al.*, 2023).

Estudios previos han demostrado que, la inducción de autofagia mediante estímulos con sales de litio en células incapaces de generar autofagia, pueden actuar como quimiosensibilizante, que pueden conducir a la disminución de metabolitos, impactando directamente en la aptitud metabólica y viabilidad celular (O'Donovan *et al.*, 2015).

En los estudios enfocados a la muerte celular asociada a procesos autofágicos, se ha llegado a describir muerte celular por lisosomas, un tipo de muerte vinculado a rutas apoptóticas y no apoptóticas, en la cual, al perderse las proteínas LAMP1/2, la permeabilización de la membrana lisosomal se ve comprometida, liberando así las hidrolasas contenidas en su interior e incrementando la cantidad de calcio

citoplasmático, lípidos membranales y especies reactivas de oxígeno celular (O'Donovan *et al.*, 2015).

### **10.5 Limitaciones del estudio y perspectivas a futuro.**

El efecto de las sales de litio como agentes quimioterapéuticos es un campo poco explorado, sin embargo, los primeros hallazgos han demostrado que se trata de un acercamiento a nuevas terapias cuyos mecanismos de acción involucran a más de una vía de señalización de relevancia mayor en la inducción de muerte celular (Villegas-Vázquez *et al.*, 2023), contribuyendo con este trabajo, a la demostración de su relación con la inducción de autofagia sostenida durante 24 horas en células HeLa, sin embargo, no se puede afirmar que dicha inducción de autofagia esté relacionada a una disminución de la viabilidad celular, por lo que la aplicación de más técnicas, tales como: citometría de flujo y PCR en tiempo real ayudarán a esclarecer de mejor forma la relación entre la inducción de muerte celular y autofagia.

Aunque las sales de litio como tratamiento pueden ocasionar manifestaciones clínicas como disfunción renal, disfunción neurológica, trastornos gastrointestinales, manifestaciones cardíacas y anomalías endócrinas, se requiere de dosis elevadas y tiempos de tratamiento que excedan las dos décadas para que alguna de estas manifestaciones se presente en el paciente (Damri *et al.*, 2021).

Actualmente las sales de litio no forman parte del tratamiento anticancerígeno convencional, sus efectos antitumorales aún no son del todo claros, sin embargo, el presente estudio expone sustento sólido para continuar con la caracterización de dichos efectos, especialmente en la autofagia inducida vía independiente de mTOR (IMPasa) en donde se podría potenciar exponencialmente los procesos autofágicos que tienen las células tumorales en estado basal y convertir este proceso de supervivencia celular en un proceso cuya ausencia de regulación conduzcan a la célula cancerígena a un estrés que culmine en muerte celular programada.

Es necesario el estudio de más marcadores moleculares como IMPA1 asociados a la vía del Inositol, genes de la familia PI3K asociados a la generación de PI3P y observar de qué manera se expresa Atg16, al mismo tiempo para confirmar que las sales de litio inducen autofagia vía independiente de mTOR, se requiere del monitoreo de marcadores asociados a la vía mTOR tales como p-mTOR y p-p70/S6K1, en donde inicialmente, a partir de sus respectivos niveles de expresión, se podría tener una pista sobre si la vía de la autofagia está inactiva o activa, pero al contrastarlo con los niveles de expresión de marcadores moleculares de la vía de la IMPasa y al mismo tiempo analizando niveles de expresión de LC3 $\beta$  y p62 podría surgir un escenario en el cual se observe un flujo autofágico activo y constante aun cuando los niveles de expresión de p-mTOR y p-p70/S6K1 sean elevados.

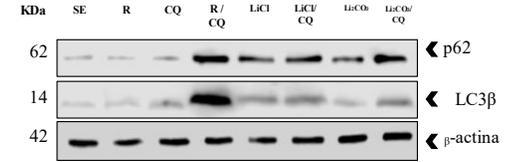
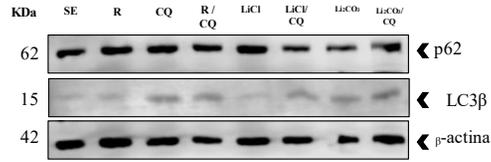
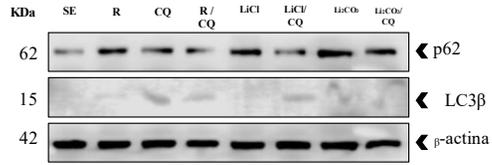
## 11. Conclusiones

Tanto LiCl como Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> inducen un flujo autofágico en células HeLa mayor que el que tienen las células tumorales en estado basal, ocasionando un proceso sostenido. El Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> mostró tener mayor efecto en la inducción de autofagia pues se detectaron altos niveles de expresión de LC3β a las 24 horas y una disminución total de los niveles de p62. Las células SiHa no exhibieron aumento en el flujo autofágico mediado por sales de litio.

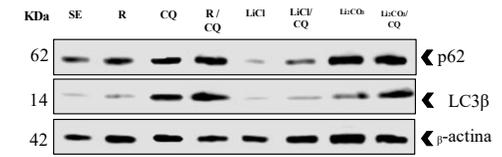
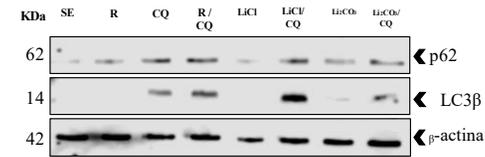
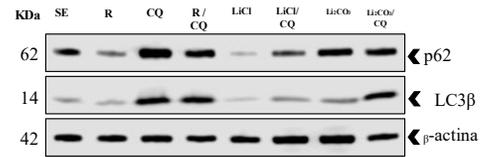
# 12.Anexos

## Triplicados HeLa

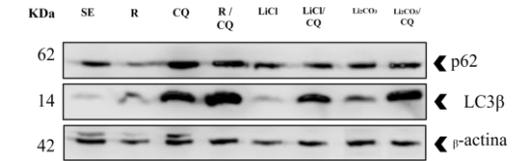
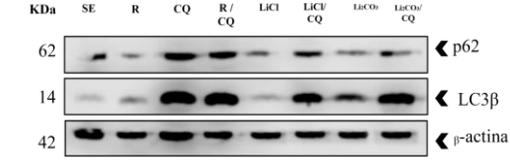
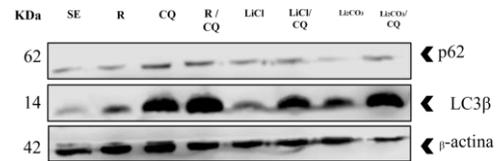
3 h



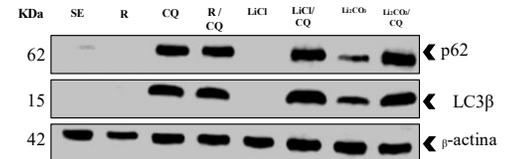
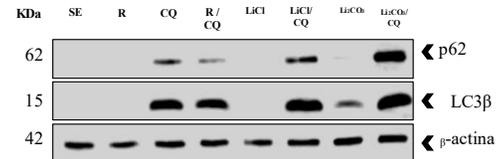
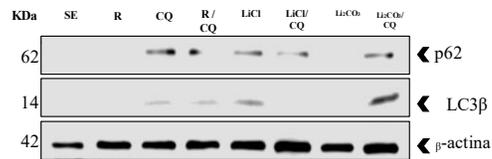
6 h



12 h

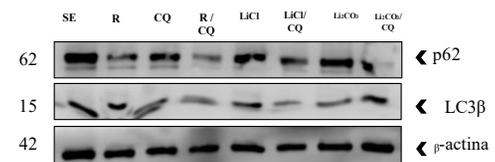
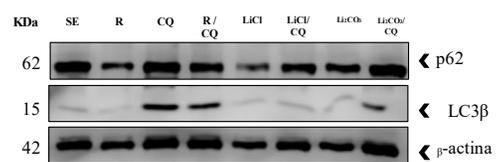
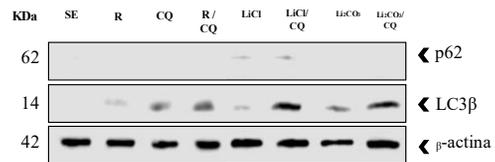


24 h

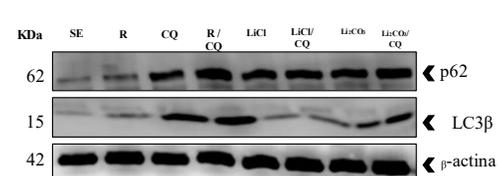
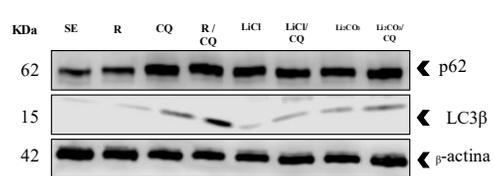
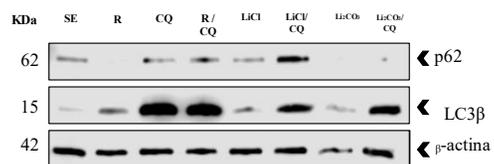


# Triplicados SiHa

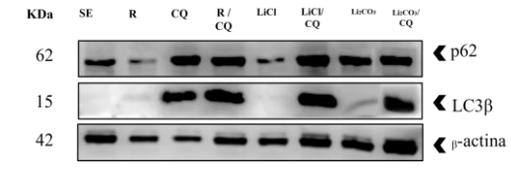
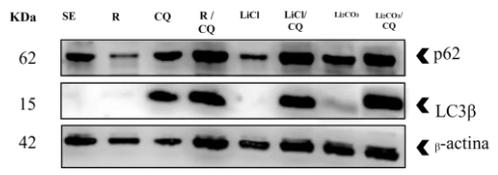
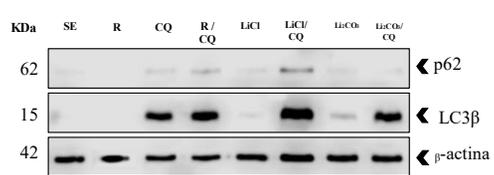
3 h



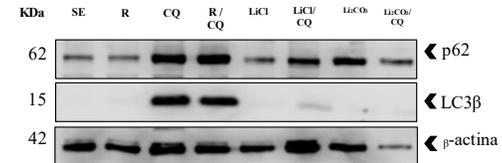
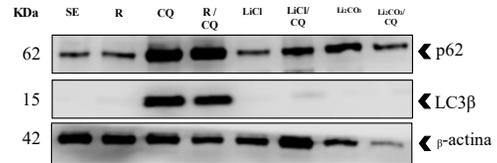
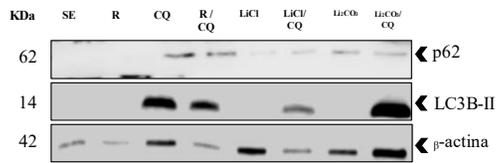
6 h



12 h



24 h



### 13. Bibliografía

- Ames, B. N. and H. P. E. (1962). *Genes, Enzymes, and Control Mechanisms in Histidine Biosynthesis*. In: *The Molecular Basis of Neoplasia* . 322–345.
- Baker, C. C., Phelps, W. C., Lindgren, V., Braun, M. J., Gonda, M. A., & Howley, P. M. (1987). Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *Journal of virology*, 61(4), 962–971. <https://doi.org/10.1128/JVI.61.4.962-971.1987>
- Bhattacharjee, R., Das, S. S., Biswal, S. S., Nath, A., Das, D., Basu, A., Malik, S., Kumar, L., Kar, S., Singh, S. K., Upadhye, V. J., Iqbal, D., Almojam, S., Roychoudhury, S., Ojha, S., Ruokolainen, J., Jha, N. K., & Kesari, K. K. (2022). Mechanistic role of HPV-associated early proteins in cervical cancer: Molecular pathways and targeted therapeutic strategies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 174(January), 103675. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2022.103675>
- Burd, E. M. (2003). Human papillomavirus and cervical cancer. En *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 16, Número 1, pp. 1–17). <https://doi.org/10.1128/CMR.16.1.1-17.2003>
- Chan, L. L. Y., Shen, D., Wilkinson, A. R., Patton, W., Lai, N., Chan, E., Kuksin, D., Lin, B., & Qiu, J. (2012). A novel image-based cytometry method for autophagy detection in living cells. *Autophagy*, 8(9), 1371–1382. <https://doi.org/10.4161/auto.21028>
- Damri, O., Shemesh, N., & Agam, G. (2021). Is there justification to treat neurodegenerative disorders by repurposing drugs? The case of alzheimer’s disease, lithium, and autophagy. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Número 1, pp. 1–17). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22010189>

- Ersahin, T., Tuncbag, N., & Cetin-Atalay, R. (2015). The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Molecular bioSystems*, 11(7), 1946–1954. <https://doi.org/10.1039/C5MB00101C>
- Evans, T., Button, R., Anichtchik, O., & Luo, S. (2019). Visualization and Measurement of Multiple Components of the Autophagy Flux. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1854, 1–12. [https://doi.org/10.1007/7651\\_2018\\_168](https://doi.org/10.1007/7651_2018_168)
- Ferlay J, Laversanne M, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2024). Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow (version 1.1). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- Global Cancer Observatory. (2021, marzo 21). *Mexico summary*.
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. En *Cancer Discovery* (Vol. 12, Número 1, pp. 31–46). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Johnson, C. A., James, D., Marzan, A., & Armaos, M. (2019). Cervical Cancer: An Overview of Pathophysiology and Management. En *Seminars in Oncology Nursing* (Vol. 35, Número 2, pp. 166–174). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.02.003>
- Khasraw, M., Ashley, D., Wheeler, G., & Berk, M. (2012). Using lithium as a neuroprotective agent in patients with cancer. *BMC Medicine*, 10, 131. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-10-131>
- Kim, L. C., Cook, R. S., & Chen, J. (2017). mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment. *Oncogene*, 36(16), 2191. <https://doi.org/10.1038/ONC.2016.363>
- Klionsky, D. J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D. K., Aliev, G., Askew, D. S., Baba, M., Baehrecke, E. H., Bahr, B. A., Ballabio, A., Bamber, B. A., Bassham, D. C., Bergamini, E., Bi, X., Biard-Piechaczyk, M., Blum, J. S., Bredesen, D. E., Brodsky, J. L., Brumell, J. H., ... Deter,

- R. L. (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 4(2), 151–175. <https://doi.org/10.4161/auto.5338>
- Lamark, T., Svenning, S., & Johansen, T. (2017). Regulation of selective autophagy: The p62/SQSTM1 paradigm. En *Essays in Biochemistry* (Vol. 61, Número 6, pp. 609–624). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/EBC20170035>
- Liu, Y., Hu, M., Luo, D., Yue, M., Wang, S., Chen, X., Zhou, Y., Wang, Y., Cai, Y., Hu, X., Ke, Y., Yang, Z., & Hu, H. (2017). Class III PI3K Positively Regulates Platelet Activation and Thrombosis via PI(3)P-Directed Function of NADPH Oxidase. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 37(11), 2075–2086. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309751>
- Lum, J. J., DeBerardinis, R. J., & Thompson, C. B. (2005). Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2005 6:6, 6(6), 439–448. <https://doi.org/10.1038/nrm1660>
- Masuda, T., Tsuruda, Y., Matsumoto, Y., Uchida, H., Nakayama, K. I., & Mimori, K. (2020). Drug repositioning in cancer: The current situation in Japan. En *Cancer Science* (Vol. 111, Número 4, pp. 1039–1046). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/cas.14318>
- Matt Ridley. (1999). *Genome: The autobiography of a species in 23 chapters* (Vol. 2).
- Mizushima, N., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2011). The role of atg proteins in autophagosome formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, 107–132. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005>
- Motoi, Y., Shimada, K., Ishiguro, K., & Hattori, N. (2014). Lithium and autophagy. En *ACS Chemical Neuroscience* (Vol. 5, Número 6, pp. 434–442). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/cn500056q>

Nordenberg, J., Panet, C., Wasserman, L., Malik, Z., Fuchs, A., Stenzel, K. H., & Novogrodsky, A. (1987). The anti-proliferative effect of lithium chloride on melanoma cells and its reversion by myo-inositol. *British journal of cancer*, *55*(1), 41–46. <https://doi.org/10.1038/BJC.1987.9>

O'Donovan, T. R., Rajendran, S., O'Reilly, S., O'Sullivan, G. C., & McKenna, S. L. (2015). Lithium modulates autophagy in esophageal and colorectal cancer cells and enhances the efficacy of therapeutic agents in vitro and in vivo. *PLoS ONE*, *10*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134676>

Organización Mundial de la Salud. (2022, enero 20). *Cáncer cervicouterino*.

Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P. A., Escott, K. J., Hopper, S., Wells, A., Doig, A., Williams, T., Latimer, J., McNamee, C., Norris, A., Sanseau, P., Cavalla, D., & Pirmohamed, M. (2018). Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. En *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 18, Número 1, pp. 41–58). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168>

Rossi, M., Munarriz, E. R., Bartesaghi, S., Milanese, M., Dinsdale, D., Guerra-Martin, M. A., Bampton, E. T. W., Glynn, P., Bonanno, G., Knight, R. A., Nicotera, P., & Melino, G. (2009). Desmethylclomipramine induces the accumulation of autophagy markers by blocking autophagic flux. *Journal of Cell Science*, *122*(18), 3330. <https://doi.org/10.1242/JCS.048181>

Roy, P. S., & Saikia, B. J. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. En *Indian Journal of Cancer* (Vol. 53, Número 3, pp. 441–442). Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/0019-509X.200658>

Sarkar, S., Floto, R. A., Berger, Z., Imarisio, S., Cordenier, A., Pasco, M., Cook, L. J., & Rubinsztein, D. C. (2005). Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *Journal of Cell Biology*, *170*(7), 1101–1111. <https://doi.org/10.1083/jcb.200504035>

- Sarkar, S., & Rubinsztein, D. C. (2006). Inositol and IP3 levels regulate autophagy: Biology and therapeutic speculations. *Autophagy*, 2(2), 132–134. <https://doi.org/10.4161/auto.2387>
- Scarth, J. A., Patterson, M. R., Morgan, E. L., & Macdonald, A. (2021). The human papillomavirus oncoproteins: a review of the host pathways targeted on the road to transformation. *The Journal of general virology*, 102(3). <https://doi.org/10.1099/JGV.0.001540>
- Scheffner, M., Münger, K., Byrne, J. C., & Howley, P. M. (1991). The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(13), 5523–5527. <https://doi.org/10.1073/PNAS.88.13.5523>
- Serretti, A., Drago, A., & De Ronchi, D. (2009). Lithium Pharmacodynamics and Pharmacogenetics: Focus on Inositol Mono Phosphatase (IMPase), Inositol Poliphosphatase (IPPase) and Glycogen Synthase Kinase 3 Beta (GSK-3 Beta). En *Current Medicinal Chemistry* (Vol. 16). <http://www.>
- Snitow, M. E., Bhansali, R. S., & Klein, P. S. (2021). Lithium and Therapeutic Targeting of GSK-3. *Cells*, 10(2), 1–24. <https://doi.org/10.3390/CELLS10020255>
- Sukumaran, P., Da Conceicao, V. N., Sun, Y., Ahamad, N., Saraiva, L. R., Selvaraj, S., & Singh, B. B. (2021). Calcium signaling regulates autophagy and apoptosis. En *Cells* (Vol. 10, Número 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells10082125>
- Taskaeva, Y. S., Bgatova, N. P., Dossymbekova, R. S., Solovieva, A. O., Miroshnichenko, S. M., Sharipov, K. O., & Tungushbaeva, Z. B. (2020). In Vitro Effects of Lithium Carbonate on Cell Cycle, Apoptosis, and Autophagy in Hepatocellular Carcinoma-29 Cells. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 170(2), 246–250. <https://doi.org/10.1007/S10517-020-05044-9>

- Vázquez-Nin, G. H., Escobar, M. L., De Felici, M., Echeverría, O. M., & Klinger, F. G. (2011). Cell Death in Mammalian Ovary. *Cell Death in Mammalian Ovary*. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1134-1>
- Villegas-Vázquez, E. Y., Quintas-Granados, L. I., Cortés, H., González-Del Carmen, M., Leyva-Gómez, G., Rodríguez-Morales, M., Bustamante-Montes, L. P., Silva-Adaya, D., Pérez-Plasencia, C., Jacobo-Herrera, N., Reyes-Hernández, O. D., & Figueroa-González, G. (2023). Lithium: A Promising Anticancer Agent. En *Life* (Vol. 13, Número 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/life13020537>
- Wang, J.-J., Lei, K.-F., & Han, F. (s/f). *Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments*.
- Wang, Y., Zhang, Q., Wang, B., Li, P., & Liu, P. (2017). LiCl Treatment Induces Programmed Cell Death of Schwannoma Cells through AKT- and MTOR-Mediated Necroptosis. *Neurochemical research*, 42(8), 2363–2371. <https://doi.org/10.1007/S11064-017-2256-2>
- Xu, F., Tautenhahn, H.-M., Dirsch, O., & Dahmen, U. (2022). Blocking autophagy with chloroquine aggravates lipid accumulation and reduces intracellular energy synthesis in hepatocellular carcinoma cells, both contributing to its anti-proliferative effect. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 148(3), 3243–3256. <https://doi.org/10.1007/s00432-022-04074-2>
- Xu, Z., Han, X., Ou, D., Liu, T., Li, Z., Jiang, G., Liu, J., & Zhang, J. (2020). Targeting PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(2), 575–587. <https://doi.org/10.1007/S00253-019-10257-8/TABLES/2>
- Ye, H., Chen, M., Cao, F., Huang, H., Zhan, R., & Zheng, X. (2016). Chloroquine, an autophagy inhibitor, potentiates the radiosensitivity of glioma initiating cells by inhibiting autophagy and activating apoptosis. *BMC Neurology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12883-016-0700-6>

Yoshii, S. R., & Mizushima, N. (2017). Monitoring and Measuring Autophagy. *International journal of molecular sciences*, 18(9). <https://doi.org/10.3390/IJMS18091865>

Zhang, Q., Zhang, Q., Li, H., Zhao, X., & Zhang, H. (2021). LiCl induces apoptosis via CHOP/NOXA/Mcl-1 axis in human choroidal melanoma cells. *Cancer cell international*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/S12935-021-01778-2>