

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

“Participación de HIF-1 en la regulación de la autofagia inducida farmacológicamente en células tumorales de mama y colon”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOLOGÍA
EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A

BIÓL. REBECA SALGADO GARCÍA

COMITÉ TUTORAL

CO-DIRECTOR INTERNO: Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruíz.

CO-DIRECTOR EXTERNO: Dra. Nadia Judith Jacobo Herrera.

ASESOR: Dr. Carlos Pérez Plasencia.

MÉXICO D.F A 29 DE AGOSTO DEL 2017.

“El programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Durante el desarrollo de este Proyecto de Tesis la Biól. REBECA SALGADO GARCÍA fue depositaria de la beca de **CONACYT No 593030** que le fue otorgada para sus estudios de Maestría durante el periodo de Septiembre 2015 a Septiembre del 2017.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis titulada

“Participación de HIF-1 en la regulación de la autofagia inducida farmacológicamente en células tumorales de mama y colon”

Que presentó:

Biol. Rebeca Salgado García

29 de Agosto 2017

JURADO:

Dra. Roxana Uri Miranda Labra



Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz



Dr. Benjamín Pérez Aguilar



Dr. Eduardo López Urrutia

COMITÉ TUTORAL

CO-DIRECTOR INTERNO:

Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruíz.

Profesor Investigador Titular “C” de Tiempo Completo

Departamento: Ciencias de la Salud.

Adscripción: Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

e-mail: mcgr@xanum.uam.mx

CO-DIRECTOR EXTERNO:

Dra. Nadia Judith Jacobo Herrera.

Investigadora en Ciencias Médicas.

Adscripción: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
Salvador Zubirán INCMN SZ.

nadia.jacobo@gmail.com

ASESOR:

Dr. Carlos Pérez Plasencia.

Investigador en Ciencias Médicas.

Adscripción: Instituto Nacional de Cancerología (INCaN) y Facultad de
Estudios Superiores Iztacala (FES-I) UNAM.

carlos.pplas@gmail.com

AGRADECIMIENTOS

Comité Tutorial

Agradezco infinitamente al Dr. Carlos Pérez Plascencia por aceptarme en su laboratorio y como parte de su grupo de investigación. Por su confianza y sus exigencias que me hicieron crecer como persona y en el ámbito profesional. Gracias por proporcionarme todas las herramientas que utilice durante estos años de Maestría y decirle que aprovecharé todas las enseñanzas que me ha dejado en este tiempo.

Agradezco a la Dra. Nadia J. Jacobo Herrera por su confianza y dedicación hacia mí. Por siempre estar al pendiente de todo y brindarme su apoyo y sabiduría infinita. Gracias por siempre creer en mí y alentarme a seguir adelante tanto en los momentos buenos como en los momentos de crisis.

A la Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruíz por su apoyo constante y dirección a lo largo de este proyecto de tesis. Por preocuparse de mi formación y que sacara el proyecto a tiempo.

Al Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz por su infinita paciencia y siempre alentarnos a seguir superándonos. Muchas gracias de corazón.

Grupo de Investigación

Agradezco al Dr. Eduardo López Urrutia por siempre explicarme y guiarme a lo largo de todo este tiempo que he permanecido en el laboratorio. Por sus consejos y jalones de orejas, pero es gracias a eso que he reflexionado y meditado sobre los errores que he cometido y que nunca volverán a pasar, ya que todas sus palabras y enseñanzas me han hecho crecer en todos los ámbitos. Gracias por ser un gran mentor y amigo.

A la Dra. Gabriela Figueroa por guiarme y aconsejarme cuando veía que estaba en problemas, por apoyarme y ser una gran mentora y amiga.

A mis grandes amigos Osvaldo, Pablo, Misael, Luisma, Sam, Mical, Liz, John, Verota, a los cuales los veo y amo como mi familia. Gracias por siempre estar ahí y hacer del ambiente de trabajo algo ameno, comfortable y feliz. De cada uno de ustedes aprendí algo irremplazable que estará conmigo para siempre. Creo que todos agradecemos a las Glandestinas por dejarnos pasar buenos y malos momentos ahí como amigos que somos jaja.

A mi gran e irremplazable amigo y hermano Joss, que a pesar de que es un enojón, tanto en las malas como en las buenas siempre ha estado conmigo apoyándome, aconsejándome y regañándome. Gracias por siempre hacerme ver mis errores e impulsarme a corregirlos para que logre ser alguien exitosa. Gracias por enseñarme PCR, aunque luego no amplifique jajaj, aunque eso ya quedo atrás, tuve un gran maestro y ahora salen todas las PCR. Siempre he tenido presente los momentos que hemos pasado juntos y tus enseñanzas. Te amo amigo.

A mis amigos y carnales Carlingui y Oliver, a quienes amo como hermanos. Cada uno de ustedes me ha dejado enseñanzas muy valiosas, gracias por siempre defenderme y preocuparse por mí. Hemos pasado por mucho juntos y sé que siempre contare con ustedes. Oliver, gracias por enseñarme Western Blot, te la rifas. Carlingui, gracias por enseñarme a clonar, eres un master.

A Izamary, a quien también la veo como familia, gracias por siempre ayudarme y apoyarme en todo. Aunque me regañes que nunca como verduras, aun así, te quiero bien machín. Gracias por todo amiga.

A Deivid (Bonachón), Jossibaby (Luis) y Deivid. Son prácticamente nuevos en el laboratorio, pero se ve que hacen reír o enojar a la gente jajaja, ya el tiempo dirá. A mí me han hecho reír mucho.

A mis amigos que quiero y me caen súper bien, Bere: una gran persona y de buen corazón, Elizabeth: la mayor de las reinitas, pero bien chida y una persona que sabe escuchar a los demás. Yahir: una persona a toda madre y que siempre me hace reír. Migue: Bien chido y que siempre nos alimenta con pollos rostizados jaja. Emmanuel: Un poco callado pero buen tipo. Daniel: tengo poco de conocerlo, pero me cae muy bien.

Amigos y Familia

A mis papas por haberme dado la vida, porque aunque la vida a veces tenga pruebas muy duras que superar, agradezco de estar aquí, porque gracias a ello pude conocer a personas maravillosas que me dejaron enseñanzas y lecciones de por vida.

A mi hermano Abraham, el mejor amigo y hermano. Gracias por siempre escucharme y defenderme, sé que contigo contare toda la vida y estarás ahí para mí cuando lo necesite. Sabes que cuentas conmigo para lo que sea. Te amo con todo mi corazón.

A mi mejor amiga y hermana Lu, gracias por escucharme y comprenderme siempre. Bien dicen que los lazos de sangre no son lo único que hace a la familia. Gracias por formar parte de mi vida, eres alguien especial e irremplazable para mí y eso jamás cambiara. Eres de las personas más importantes en mi vida y te amo muchísimo.

A mi hermanita Yael, una persona muy feliz y que no se rinde tan fácil, gracias por ser mi amiga y decirme cuando la estoy regando. Te amo y agradezco que te hayas cruzado en mi camino, tú y Lu me hacen una mejor persona.

Y a Keyla, una gran amiga que estuvo también conmigo a lo largo de la carrera, y aunque ya no la veo mucho la sigo queriendo y agradezco el tiempo que estuvo a mi lado.

Resumen

El cáncer colorrectal (CCR) y el cáncer de mama (CaMa) son un problema de salud a nivel mundial con altos índices de incidencia y mortalidad en ambos sexos. Investigaciones anteriores han demostrado que el inicio y progresión del CCR y del CaMa puede estar asociado con la desregulación de vías esenciales (como la de PI3K/AKT/mTOR, la cual es de suma importancia ya que es la encargada de la síntesis del factor de transcripción HIF-1) involucradas en proliferación, diferenciación, supervivencia, metástasis y en la regulación de diversos procesos biológicos como la apoptosis y la autofagia. La autofagia es un proceso evolutivamente conservado de múltiples pasos en donde la célula degrada sus proteínas de larga vida y organelos dañados. Nuestro grupo de investigación estuvo interesado en estudiar la inducción de este proceso en las líneas celulares humanas de cáncer colorrectal HCT-116 y MDA-231 de cáncer de mama mediante la combinación de tres fármacos: Metformina y Oxamato de Sodio, inhibidores de mTOR y glicólisis respectivamente, en sinergia con Doxorrubicina que es un quimioterapéutico convencional para diferentes tipos de cáncer como mama y colorrectal. El objetivo principal de este proyecto fue determinar la participación de HIF-1alfa en la regulación de la autofagia inducida farmacológicamente por medio de la combinación de Doxorrubicina/Metformina/Oxamato de sodio en células tumorales de mama y colon.

Se demostró mediante Western Blot la disminución en la detección de las proteínas involucradas en la vía de PI3K y el aumento en la detección de proteínas inductoras del proceso de autofagia en las células expuestas a los tres fármacos en combinación (Doxorrubicina, Metformina y Oxamato de sodio). Posteriormente se evaluó el nivel de expresión de miR-106a (microRNA posiblemente regulado por HIF-1) involucrado en la autofagia, mostrando una modificación de la expresión en las líneas celulares expuestas a los tratamientos en los diferentes tiempos. También, mediante un ensayo de luciferasa, se demostró que ULK1 principal inductor de la autofagia, es regulado directamente por miR-106a.

En conclusión, el presente trabajo nos proporcionará información detallada sobre los procesos de modulación de la red de señalización de HIF-1 y su regulación sobre

el proceso de autofagia, lo que nos permitirá proponer mejores y eficaces estrategias terapéuticas (como la combinación de estos tres fármacos) contra el CCR y de mama, así como también proponer biomarcadores para un diagnóstico temprano.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) and breast cancer are a worldwide health problem with high incidence and mortality rates in both sexes. Previous research has shown that the initiation and progression of CRC and CaMa may be associated with deregulation of essential pathways (such as PI3K / AKT / mTOR), which is of paramount importance since it is responsible for the synthesis of the HIF-1 transcription) involved in proliferation, differentiation, survival, metastasis and in the regulation of various biological processes such as apoptosis and autophagy. Autophagy is an evolutionarily conserved multi-step process where the cell degrades its long-lived proteins and damaged organelles. Our research group was interested in studying the induction of this process in human colorectal cancer cell line HCT-116 and MDA-231 breast cancer cell line by combining three drugs: Metformin and Sodium Oxamate, inhibitors of mTOR and glycolysis respectively, in synergy with Doxorubicin which is a conventional chemotherapeutic for different cancers such as breast and colorectal. The main objective of this project was to establish the participation of HIF-1alfa in the regulation of induced pharmacologically autophagy by means of the combination of doxorubicin / metformin / sodium oxamate in breast and colon tumor cells.

A decrease in the detection of proteins involved in the PI3K pathway and an increase in the detection of autophagy inducing proteins were demonstrated by Western blotting in cells treated with the three drugs in combination (Doxorubicin, Metformin and Sodium Oxamate).

Subsequently, the expression level of miR-106a (a microRNA possibly regulated by HIF-1) involved in autophagy was evaluated, showing a modification of the

expression in the cell lines exposed to the treatments at the different times. Luciferase assays showed that ULK1, the main autophagy inducer, is directly regulated by miR-106a. In conclusion, the present work will provide detailed information on the modulation processes of the HIF-1 signaling network and its regulation on the autophagy process, which will allow us to propose better and effective therapeutic strategies (such as the combination of these three Drugs) against CRC and breast, as well as to propose biomarkers for an early diagnosis.

Índice

1.	INTRODUCCIÓN	xiii
2.	Antecedentes	1
2.1.	Cáncer	1
2.2.	Cáncer de Mama	3
2.3.	Cáncer Colorrectal	6
2.4.	HIF-1 (Factor Inducible por Hipoxia 1)	9
2.4.1.	Vía de síntesis del Factor Inducible por Hipoxia 1 (HIF-1).....	11
2.5.	MicroRNAs y su Biogénesis	13
2.6.	Autofagia.....	15
2.7.	Nuevas estrategias terapéuticas para el cáncer.....	18
2.7.1.	Doxorrubicina	18
2.7.2.	Metformina	20
2.7.3.	Oxamato de Sodio	22
3.	Justificación	24
4.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	25
5.	HIPÓTESIS	25
6.	OBJETIVO GENERAL	25
6.1.	Objetivos Particulares	26
7.	Material y Métodos	26
7.1.	Cultivo Celular.....	26
7.2.	Extracción de Proteínas	27
7.3.	Western Blot.....	28
7.4.	Determinación del nivel de expresión de miR-106a mediante sondas TaqMan.	30
7.5.	Extracción de RNA.....	30
7.6.	Retrotranscripción	30
7.7.	qPCR	31
7.8.	Clonación de la región 3'UTR del mRNA de ULK1	32
7.9.	Transfección.....	33
7.10.	Ensayo de Luciferasa	33
8.	Resultados	34
8.1.	Detección de proteínas involucradas en la vía de señalización de HIF-1	34
8.2.	Detección de proteínas involucradas en la autofagia	39
8.3.	Expresión Relativa de miR-106a involucrado en el proceso de autofagia	43
8.4.	Validación del blanco de miR-106a mediante ensayo de Luciferasa	47
9.	DISCUSIÓN	49
10.	Conclusiones	55
11.	Bibliografía	55

Índice de Figuras

Figura 1. “Hallmarks del cáncer”.....	2
Figura 2. Incidencia y mortalidad.....	4
Figura 3. Fenotipos del CaMa.....	5
Figura 4. Progresión del cáncer.....	8
Figura 5. Mecanismo de HIF-1.....	10
Figura 6. Dominios de HIF-1.....	11
Figura 7. Biogénesis de MicroRNAs.....	14
Figura 8. Diferentes etapas del proceso de autofagia.....	17
Figura 9. Estructura química de la Doxorubicina: C ₂₇ H ₂₉ NO ₁₁ (Sigma Aldrich).....	20
Figura 10. Mecanismo de acción de la Metformina.....	22
Figura 11. Estructura química del Oxamato de sodio: C ₂ H ₂ NNaO ₃ (Sigma Aldrich).	23
Figura 12. Detección de las proteínas de la vía de señalización de HIF-1 mediante Western Blot.....	36
Figura 13. Detección de las proteínas de la vía de señalización de HIF-1 mediante Western Blot.....	38
Figura 14. Detección de la proteína p-mTOR mediante Western Blot.....	39
Figura 15. Detección de las proteínas involucradas en el proceso de autofagia mediante Western Blot.....	41
Figura 16. Detección de las proteínas involucradas en el proceso de autofagia mediante Western Blot.....	43
Figura 17. a) Expresión relativa de miR-106a.....	45
Figura 18. a) Expresión relativa de miR-106a.....	46
Figura 19. a) Actividad relativa de Luciferasa en células HCT116.....	47
Figura 20. a) Actividad relativa de Luciferasa en células MDA-231.....	48

Índice de Tablas

Tabla 1. Concentraciones de las combinaciones de los fármacos para cada línea celular, las cuales se utilizarán para los ensayos o técnicas subsecuentes.....	27
Tabla 2. Listado de anticuerpos utilizados para Western Blot para la detección de proteínas involucradas en la vía de señalización de Hif-1 y en el proceso de autofagia en la línea celular HCT116 y MDA-231.....	29
Tabla 3. Condiciones de pre-amplificación para generar cDNA de la línea celular HCT116 de CCR y MDA-231 de CaMa expuesta a 6 tiempos de exposición a los fármacos.....	31
Tabla 4. Condiciones de amplificación para los diferentes miRNAs involucrados en el proceso de autofagia.....	32
Tabla 5. MicroRNAs regulados por HIF-1 en condiciones de hipoxia.....	44

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial y en México, el cáncer colorrectal (CCR) y el cáncer de mama (CaMa) son un problema de salud, debido a los altos índices de mortalidad que ocasionan cada año. En diferentes tipos de cáncer, se ha visto relación entre la activación de AMPK, un complejo enzimático que se activa con el aumento de relación AMP-ATP, y/o la inhibición de mTOR, un regulador maestro del crecimiento, proliferación y muerte celular. Por lo tanto, mTOR y sus componentes río abajo como S6K juegan un papel muy importante en la síntesis de HIF-1alfa, el cual es un factor importante involucrado en el inicio y progresión de diferentes tipos de cáncer. HIF-1 alfa es un blanco terapéutico que significa una nueva aproximación en la búsqueda de oportunidades para el tratamiento del cáncer y su posible diagnóstico en etapas tempranas, punto de interés para nuestro grupo de investigación. Asimismo, esta importante cascada de señalización está involucrada en la regulación del ciclo celular y procesos de muerte celular como apoptosis y **autofagia**.

La autofagia es un proceso evolutivamente conservado de múltiples pasos en donde la célula degrada sus proteínas de larga vida y organelos dañados. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar si la combinación farmacológica está inhibiendo directamente la síntesis de HIF-1alfa a través de la inhibición de genes río arriba de este como mTOR y SK6 que se sabe que regulan la síntesis de este factor de transcripción, y al inhibir HIF-1alfa, que se active el proceso de muerte celular por autofagia. Para lograr esto, se determinó la expresión de genes involucrados en la vía de señalización de HIF-1 y de la autofagia a nivel protéico y así determinar si la combinación terapéutica que se propone, esta inhibiendo la síntesis de HIF-1 alfa y sus componentes río arriba, y por lo tanto induciendo la expresión de genes esenciales de la autofagia. Así mismo, al emplear los tres fármacos se activa a AMPK, provocando una disminución en los niveles de glucosa, lo que resulta en una disminución en los procesos dependientes de ATP como gluconeogénesis y biosíntesis de proteínas, ácidos grasos y colesterol.

2. Antecedentes

2.1. Cáncer

El cáncer es una enfermedad de múltiples etapas, caracterizada por la interrupción del equilibrio homeostático entre la proliferación y la muerte celular; lo cual deriva en una alta tasa proliferativa, resistencia a la apoptosis, metástasis y supervivencia celular, lo que conlleva a la formación de tumores (Mohammad & Zaghloul, 2015). Esta enfermedad es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, y cada año, decenas de millones de personas son diagnosticadas con cáncer y más de la mitad de los pacientes finalmente mueren a causa de ella. En México, el cáncer ocupa el primer lugar en términos de incidencia y el segundo en términos de mortalidad entre la población, siendo los tipos más frecuentes el cáncer de mama, próstata, cervicouterino, pulmón y colorrectal (Siegel, Miller, & Jemal, 2016).

La investigación sobre el cáncer ha revelado que éste es un conjunto de patologías que dan como resultado el crecimiento anormal de las células, causado por múltiples factores, que van desde cambios en la expresión genética hasta cambios efectuados por elementos exógenos como el alto consumo de alcohol, tabaquismo, poca actividad física y dieta no saludable (Wodarz & Zauber, 2015). El cáncer es una enfermedad heterogénea, ya que implica cambios dinámicos en el genoma e involucra la progresión de una serie de eventos, tales como autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitoras de crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis, metástasis, inestabilidad genómica, desregulación del metabolismo celular, inflamación continua promotora de tumores y evasión de la respuesta inmunológica (Figura 1), lo que provoca la conversión de una célula normal a una tumoral (Hanahan & Weinberg, 2011). Todas estas características le confieren a las células tumorales cierta complejidad e inestabilidad en el genoma lo que facilita su supervivencia, así como también la heterogeneidad de estos “*hallmarks*” le confieren a la célula cancerosa un “microambiente tumoral” altamente coordinado, con capacidades moleculares y bioquímicas favorables que aumenta su capacidad de supervivencia

y proliferación (M. Wang et al., 2017).

Por otra parte, cabe resaltar que actualmente dentro de los diferentes tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad, se encuentran el cáncer de mama y el cáncer colorrectal (Ferlay et al., 2012).

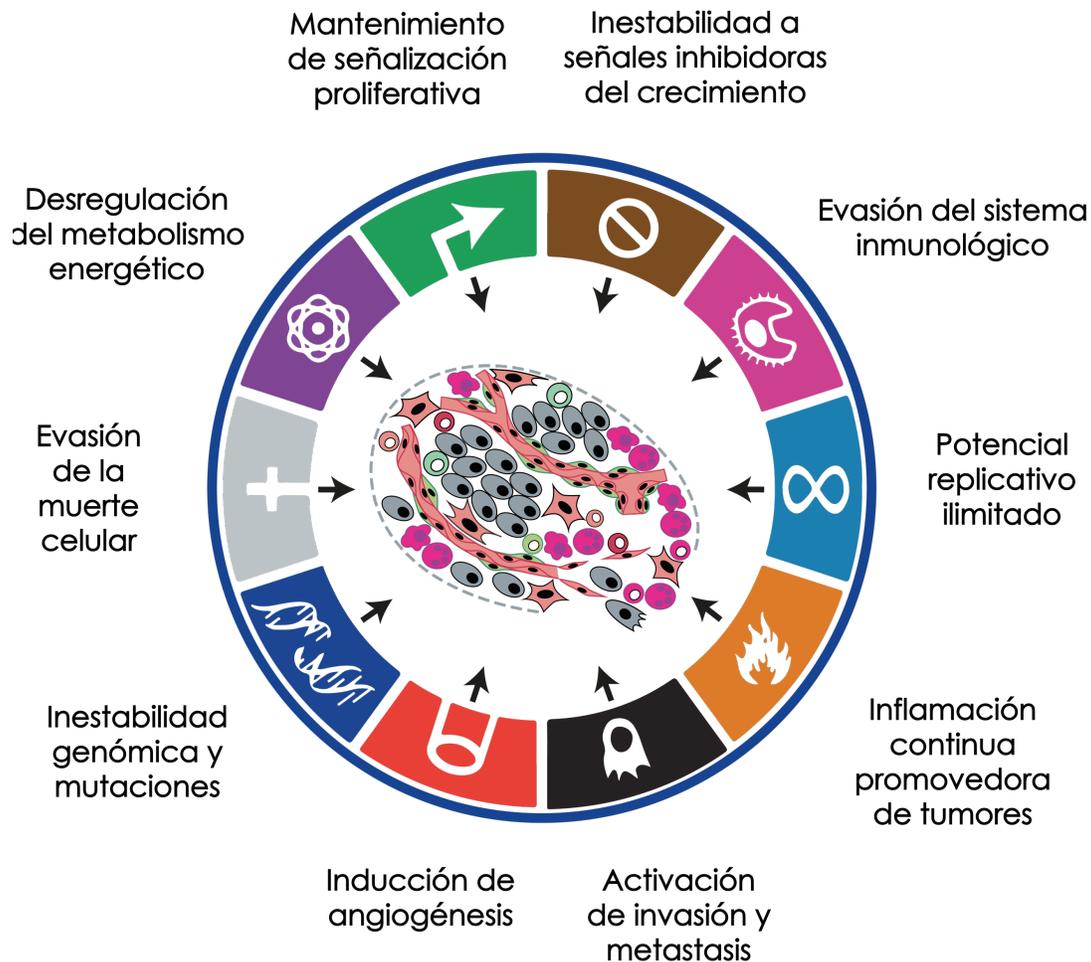


Figura 1. "Hallmarks del cáncer".

Características distintivas adquiridas para la progresión de una célula normal a una célula tumoral o cancerígena. Tomado y modificado de (Hanahan & Weinberg, 2011).

2.2. Cáncer de Mama

El cáncer de mama (CaMa) es una enfermedad heterogénea que se caracteriza por la diferencia en las alteraciones moleculares, la respuesta a la terapia y la susceptibilidad de los pacientes (Murat Dogan, Pinar Ercetin, Altun, Dursun, & Aktas, 2015). Estudios realizados durante los últimos años mostraron que el 20-30% de los casos de cáncer de mama recién diagnosticados pueden estar asociados con la ocurrencia de diversos factores de riesgo que inician o que modifican el proceso de transformación neoplásica de las células de la mama (Unger-Saldana, 2014). Los más importantes son antecedentes de enfermedades de la glándula mamaria, antecedentes de cáncer en familiares de primer grado, la menarquia temprana, la maternidad tardía y la edad de la mujer en la menopausia (Kaminska, Ciszewski, Lopacka-Szatan, Miotla, & Staroslawska, 2015). Teniendo la posibilidad de influir en el proceso de transformación neoplásica en los individuos, todos los factores de riesgo se pueden dividir en dos grupos, el primer grupo incluiría factores inherentes tales como la edad, el sexo, la raza y la composición genética que promueve la aparición familiar de la enfermedad neoplásica o la ocurrencia de lesiones proliferativas benignas de la glándula mamaria (Henderson et al., 2015). Todos estos factores constituyen parámetros independientes y no se someten a una simple modificación en el curso de la vida de un individuo. El segundo grupo incluiría factores extrínsecos condicionados por el estilo de vida, como la dieta o la intervención médica a largo plazo, y su influencia en el proceso neoplásico puede ser modificado a un cierto grado (Holm et al., 2016). Sin embargo, cabe destacar que, a pesar de intensos estudios, es difícil de explicar el origen o causa del desarrollo de esta enfermedad. Asimismo, el CaMa es la neoplasia maligna más frecuente entre las mujeres y es el segundo tipo de cáncer más común en todo el mundo, ocupando el primer lugar en términos de incidencia y el segundo en términos de mortalidad (Figura 2), aparte de que se ha documentado que las mujeres que tienen ciertos genes mutados, tales como *BRCA1* o *BRCA2*, tienen un mayor riesgo de desarrollar este tipo de neoplasia, ocasionando así una proliferación maligna de las células epiteliales que revisten los conductos o lobulillos

mamarios (Han et al., 2016). De igual manera, en México el CaMa ocupa el primer lugar en términos de incidencia y es la segunda causa principal de mortalidad en ambos sexos (Ferlay et al., 2012) (Figura 2 b).

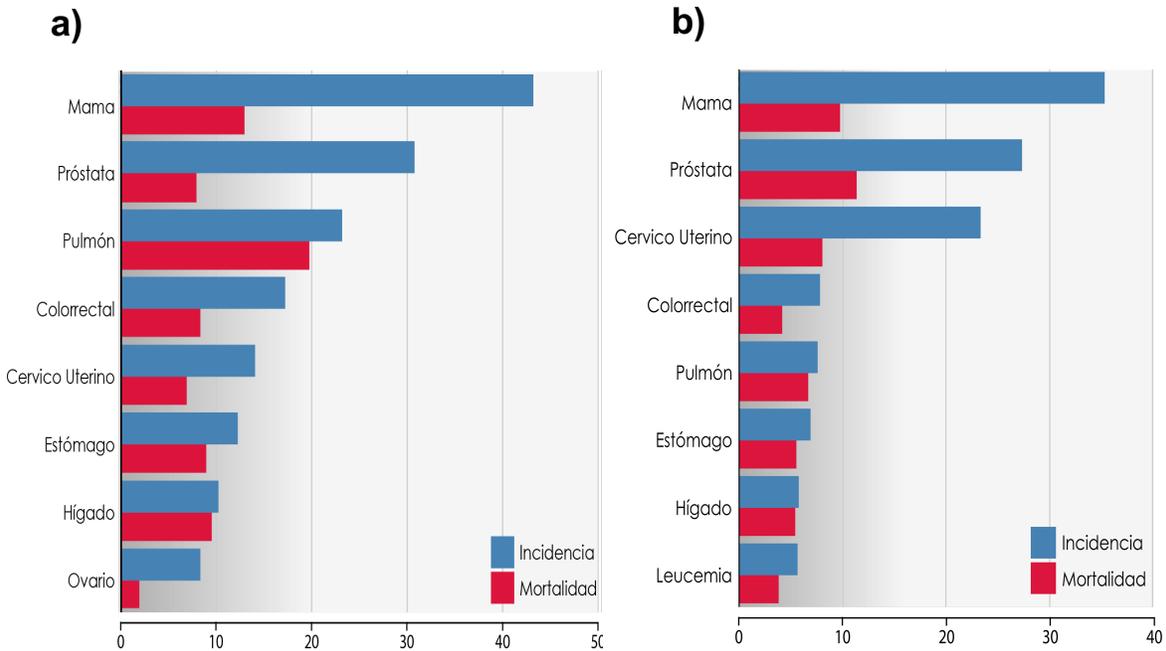
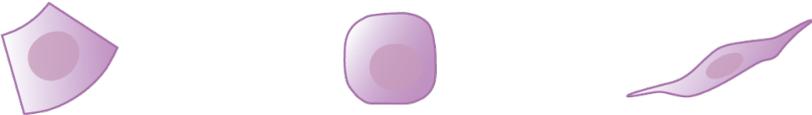


Figura 2. Incidencia y mortalidad.

a) Incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer para ambos sexos a nivel mundial. **b)** Incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer para ambos sexos en México (Tasa por cada 100,000 personas) (Ferlay et al, 2012).

El CaMa se origina en las células epiteliales de la glándula mamaria, y se ha visto que los conductos mamarios están revestidos con células epiteliales luminales, que dan lugar a la mayoría de los tipos de cáncer de mama (Mehrgou & Akouchekian, 2016). El CaMa comprende varios subtipos con características biológicas distintas, dentro de las cuales se encuentran el tamaño del tumor, el grado de proliferación, el grado histológico y principalmente, el estado de receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP) y el receptor del factor de crecimiento epidermal-

2 (HER-2). También se sabe que los fenotipos tumorales de CaMa se clasifican de acuerdo a su patrón de expresión de genes y a su grado histológico (Singhal et al., 2016) (Figura 3). Se ha demostrado que el fenotipo de mayor agresividad en CaMa contiene tumores que no expresan los RE, RP y HER2, también conocido como fenotipo triple negativo (TN) que representa el 15% de todos los cánceres de mama infiltrantes, y los cuales indican en su mayoría, histologías de mal pronóstico que en general presentan un alto grado e índice de proliferación celular (Jezequel et al., 2015). Se ha visto que aproximadamente el 80% de los carcinomas de mama son ductales y el resto lobulillares. Por lo tanto, es importante resaltar que la terapia en este tipo de neoplasia es dependiente del fenotipo tumoral (Verbelen, Gebruers, & Tjalma, 2015).



	Luminal	Basoluminal		Basal
Subtipos moleculares	Luminal A	Luminal B	HER-2	Triple Negativo
Porcentaje de Incidencia	50-60%	20-30%	15-20%	10-20%
Grado Molecular	Grado I Lobular invasivo	Grado III		Grado III Infiltrado ductal medular
Expresión de Receptores	RE+, RP+	RE-/+, RP+, HER-/+	RE-, RP-, HER-2+	RE-, RP-, HER-
Terapias	Tamoxifen Inhibidores de aromatasa	Quimioterapia Trastuzumab Lapatanib		Quimioterapia Terapia antiangiogenica

*Figura 3. Fenotipos del CaMa.
Porcentaje de incidencia para cada subtipo de CaMa, así como la expresión de los receptores, el grado histológico, pronóstico y el tipo de tratamiento. Tomado y modificado de (Perou, 2010).*

2.3. Cáncer Colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, ocupando el cuarto lugar entre todos los tipos de cáncer en términos de incidencia y el tercero en términos de mortalidad para ambos sexos (Figura 2). En México, el CCR es la segunda causa de muerte por cáncer y el cuarto más frecuente en la población, afectando en igual proporción a hombres y mujeres (Ferlay et al., 2012). El riesgo de padecer esta neoplasia está dado por la predisposición genética y los factores ambientales, y el desarrollarlo se encuentra ligado a la edad, ya que más del 90% de los CCR esporádicos ocurren en personas mayores de 50 años. Aproximadamente el 5% de todos los CCR se deben a mutaciones genéticas heredadas, mientras que del 95% restante de los casos, cerca del 20% tiene una historia familiar positiva (Sanchez-Barriga, 2017).

El CCR surge como resultado de la acumulación progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas, las que conducen a la transformación de las células epiteliales glandulares normales en adenocarcinomas invasivos (Sameer & Nissar, 2016). El primer modelo de carcinogénesis colorrectal fue propuesto por Fearon y Vogelstein en 1990. Este modelo se basa en la acumulación progresiva de mutaciones genéticas tanto en oncogenes como en genes supresores de tumores que conducen a la transformación de la mucosa normal hacia adenoma y posteriormente hacia carcinoma (Terzic, Grivennikov, Karin, & Karin, 2010) (Figura 4). En el CCR pueden surgir pequeños pólipos en el colon proximal que están asociados a diferentes vías moleculares como son: 1) la inestabilidad de microsatélites (*MicroSatellite Instability* o MSI) causada por defectos en los genes reparadores de errores en ADN (*MisMatch Repair* o MMR), una característica importante en un subgrupo de CCR hereditario y en alrededor del 15% de los CCR esporádicos (C. G. Kim et al., 2016). Ya que los principales integrantes del sistema MMR en los cuales se han observado mutaciones son las proteínas MLH1 y MSH2, cuya pérdida de función resulta en una acumulación de mutaciones somáticas generalizada a lo largo del genoma, en oncogenes y genes supresores de tumores

que juegan un papel fundamental en la iniciación y progresión del cáncer (Gelsomino, Barbolini, Spallanzani, Pugliese, & Cascinu, 2016). Otra vía asociada sería a través de 2) la metilación aberrante del ADN en las islas CpG, ya que la metilación de genes en la región promotora resulta en el silenciamiento de estos; por lo tanto, proporciona un mecanismo alternativo para la pérdida de la función de los genes supresores de tumores (Durso et al., 2017). También factores como el tabaquismo y la edad avanzada han demostrado que se correlacionan con el aumento de la metilación. Se ha visto que el fenotipo metilador (CIMP) es una característica del CCR que involucra la hipermetilación de las islas CpG determinados promotores, llevando al silenciamiento de la transcripción génica (Rhee, Kim, & Kang, 2017). Finalmente, la última vía asociada al desarrollo de CCR es la 3) vía de la inestabilidad cromosómica (CIN), la cual es la causa más común de la inestabilidad genómica en el CCR ya que representa del 65-70% de los CCR esporádicos y se caracteriza por la ganancia o pérdida de cromosomas enteros o de regiones cromosómicas que albergan los genes integrales para el proceso de la carcinogénesis colorrectal, y como resultado se produce la acumulación de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores (Abdel-Rahman et al., 2016). La progresión de adenoma a carcinoma se le atribuye principalmente a la vía de CIN, caracterizada por mutaciones o deleciones de *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), *K-RAS* (*Kirsten-rat sarcoma oncogen homolog*) y *p53* (Sakai et al., 2016). Se sabe que esta vía está implicada en la formación de focos de criptas aberrantes displásicas (ACF o *Aberrant Crypt Foci*) con mutaciones de *K-RAS*, y pocos focos de criptas aberrantes progresan de pólipos adenomatosos simples a avanzados para generar un cáncer invasivo (Tariq & Ghias, 2016).

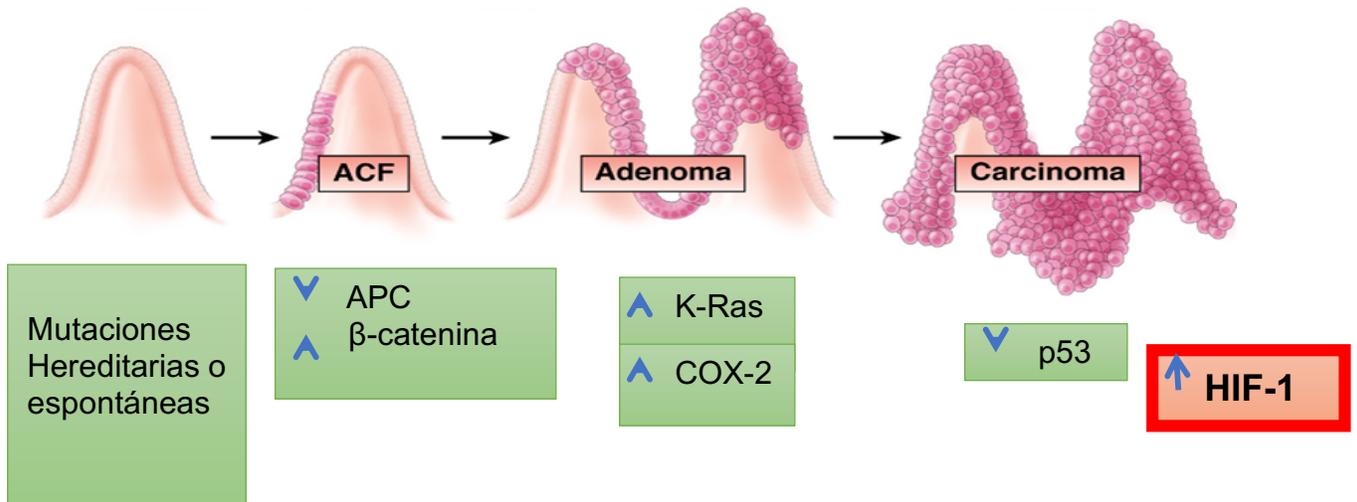
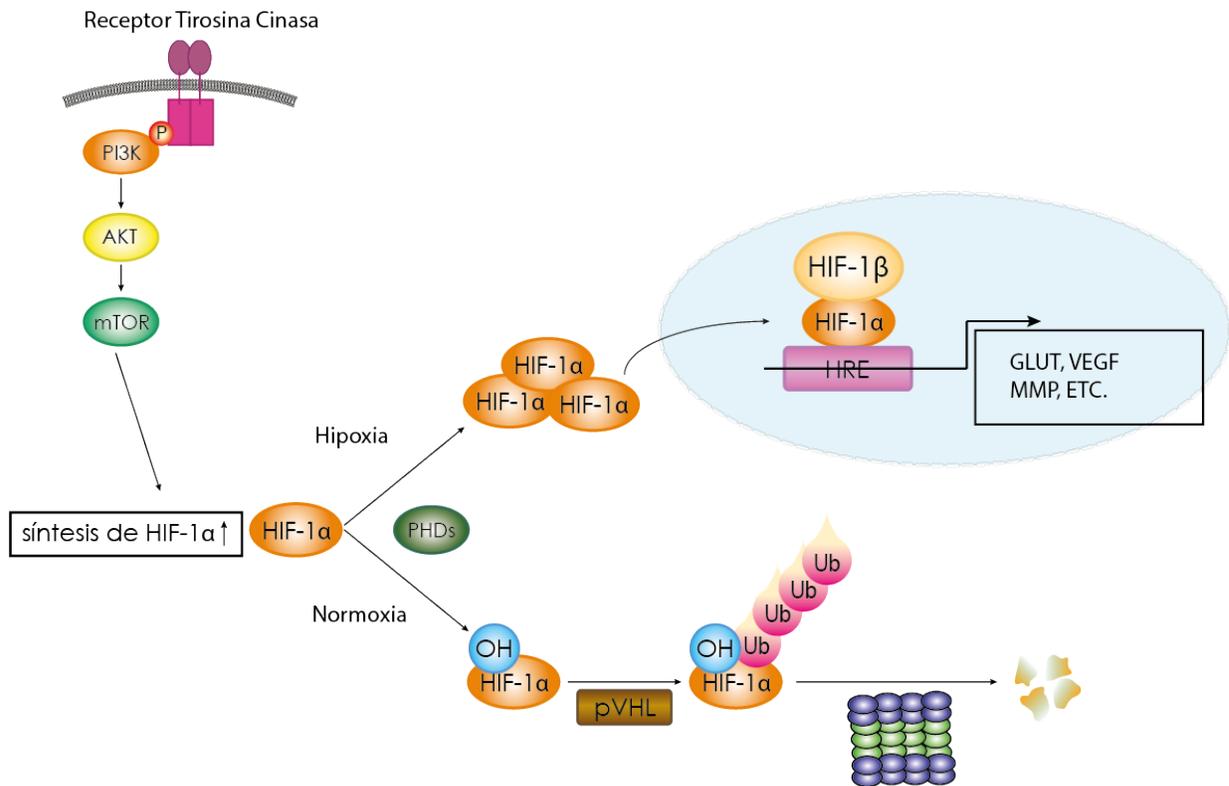


Figura 4. Progresión del cáncer. Modelo sobre la acumulación progresiva de mutaciones genéticas tanto en oncogenes como en genes supresores de tumores que conducen a la transformación de la mucosa normal hacia adenoma y posteriormente hacia carcinoma. Tomado y modificado de Terzic, 2010.

Por otra parte, se ha visto que la desregulación de diferentes vías de señalización involucradas en proliferación, diferenciación, supervivencia, apoptosis y metabolismo celular, se debe a diferentes alteraciones genéticas y epigenéticas (Okugawa, Grady, & Goel, 2015). Estudios previos han identificado diferentes alteraciones genéticas que contribuyen a la progresión del CCR, como por ejemplo mutaciones que inactivan los genes supresores de tumores (p53 y APC) o activan oncogenes esenciales para el desarrollo del cáncer como lo son KRAS, BRAF, y uno muy importante, **HIF-1** (S. Y. Lee et al., 2017).

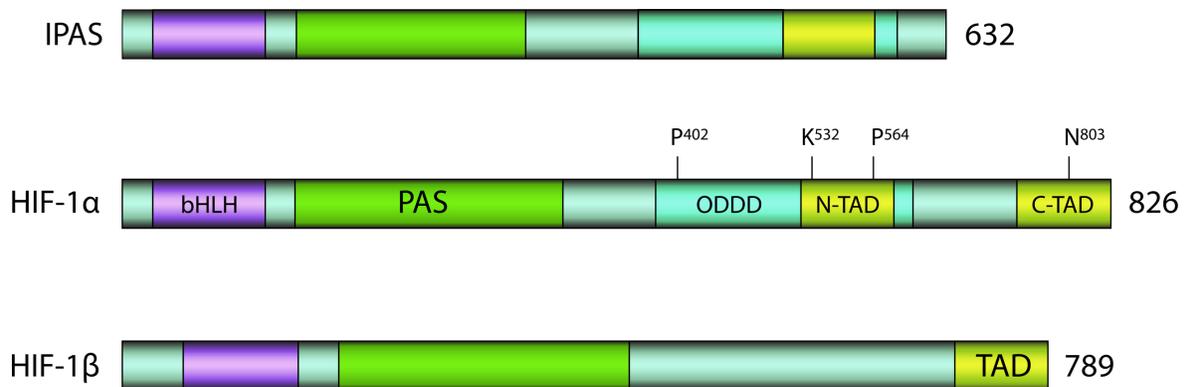
2.4. HIF-1 (Factor Inducible por Hipoxia 1)

La adaptación a los niveles bajos de oxígeno (hipoxia) en células y tejidos conduce a la inducción transcripcional de una serie de genes que participan en la angiogénesis, sobrevivencia, metabolismo de la glucosa, invasión y proliferación celular. El factor principal que lleva a cabo esta respuesta es el factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1), un activador transcripcional sensible al oxígeno y un regulador central de la respuesta de adaptación de las células tumorales a la hipoxia que lo convierte en un blanco terapéutico en tumores sólidos (Wigerup, Pahlman, & Bexell, 2016). HIF-1 es un heterodímero compuesto por dos subunidades: HIF-1 β , la cual se expresa constitutivamente y fue identificada como un translocador nuclear de hidrocarburo de arilo (ARNT), y HIF-1 α que es una subunidad regulada por oxígeno. La estabilidad y la actividad de la subunidad α es regulada por modificaciones postraduccionales tales como hidroxilación, ubiquitinación, acetilación y fosforilación (Bhaskar & Tiwary, 2016). En condiciones de normoxia, se lleva a cabo la hidroxilación de dos residuos de prolina y la acetilación de un residuo de lisina en el dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD) de HIF-1 α , lo que permite su asociación con pVHL E3 ligasa y su posterior degradación vía proteosoma (Liu et al., 2017). Es decir, en presencia de oxígeno, las PHD (Prolil Hidroxilasas) son activas e hidroxilan los residuos de prolina de HIF-1 α , dando una señal de reconocimiento para la unión de pVHL para su posterior ubiquitinación, seguido de la degradación de HIF-1 α (Yu, Tang, & Sun, 2017) (Figura 5). Se ha visto que las PHDs funcionan como el sensor de oxígeno en las células. Por otra parte, la ausencia de oxígeno no provoca actividad enzimática, modificaciones de las prolinas y ninguna unión pVHL / HIF, resultando en la estabilización y acumulación de HIF-1 α en la célula (Chen & Sang, 2016).



*Figura 5. Mecanismo de HIF-1.
Esquema general de la síntesis de HIF-1 y el mecanismo de degradación de este en condiciones de Normoxia e Hipoxia.*

Asimismo, se ha visto que en condiciones de hipoxia, HIF-1 α se estabiliza e interactúa con coactivadores tales como la proteína de unión al elemento de respuesta de cAMP / p300 y regula la expresión de genes diana. Se sabe que tanto HIF-1 α como HIF-1 β pertenecen a la familia de proteínas helix-loop-helix-Per-ARNT-Sim (bHLH-PAS), y los motivos bHLH y PAS son necesarios para la formación de heterodímeros entre las subunidades HIF-1 α y HIF-1 β , lo que proporciona una unión específica a la secuencia HRE (Elementos de respuesta a la hipoxia) del ADN (Masoud & Li, 2015) (Figura 6). También se ha establecido que la proteína HIF-1 α posee dos dominios de transactivación, el N-terminal (N-TAD) y C-terminal (C-TAD). Este último en particular interacciona con coactivadores tales como CBP / p300 para activar la transcripción génica (Harada, 2016).



*Figura 6. Dominios de HIF-1.
Esquema sobre los dominios que conforman a HIF-1 α como HIF-1 β .*

2.4.1. Vía de síntesis del Factor Inducible por Hipoxia 1 (HIF-1)

Se conoce que la vía de señalización de PI3K / Akt juega un papel esencial en la regulación de la activación y síntesis de HIF-1 α , así como en la resistencia a procesos de muerte celular en varios tumores. La activación constitutiva de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), debido a una variedad de aberraciones genéticas, se observa con frecuencia en los diferentes tipos de cáncer y desempeña un papel importante en la formación de tumores y su progresión (Agani & Jiang, 2013). Por otra parte, Akt, una serina / treonina cinasa, es un mediador central de esta vía de los blancos río abajo, y su desregulación subyace a la patología de una serie de enfermedades humanas comunes, tales como diabetes y cáncer. La activación de Akt es altamente dependiente de la proteína PI3K, la cual es activada por receptores tirosin cinasa o por receptores acoplados a la proteína G (Divolis, Mavroeydi, Mavrofydy, & Papazafiri, 2016). PI3K genera el segundo mensajero lipídico fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), el cual se une directamente a los dominios de homología de Akt y PDK1, reclutando de este modo estas cinasas a la membrana plasmática. Posteriormente, PDK1 fosforila el bucle de activación de Akt en la Thr-308, que es esencial para la activación de Akt, sin embargo, aunque no se comprende completamente el momento relativo a la fosforilación de Thr-308, la

fosforilación de Akt en un residuo conservado (Ser-473) dentro de su motivo regulador hidrofóbico muestra un aumento considerable de la actividad de la cinasa Akt (W. Lei et al., 2016). Una vez activo, Akt fosforila una serie de sustratos involucrados en la regulación de la supervivencia celular, el crecimiento, la proliferación y el metabolismo, tal es el caso de un regulador maestro conocido como diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR) (Riquelme et al., 2016).

mTOR es una proteína implicada en la homeostasis, el crecimiento, la supervivencia y el metabolismo celular; su complejo 1 (mTORC1) participa en diferentes eventos celulares como biosíntesis de proteínas, lípidos y organelos, además de estar involucrado en proliferación y crecimiento celular y en promoción de glucólisis. mTORC1 juega un papel muy importante en la fosforilación y activación de la proteína S6K y en la inhibición del factor iniciador eucariótico 4E (4E-BPs) (Lim, Wang, Crowe, Goldstein, & Yang, 2016). Además, mTORC1 estimula la angiogénesis al estabilizar a HIF-1alfa en condiciones de hipoxia inhibiendo así autofagia por la vía de fosforilación de ATG13 y ULK1/2. Por lo tanto, hasta el momento se sabe que la regulación de la síntesis de HIF-1 alfa se da por la activación de PI3K. Por una parte, PI3K activa a AKT y a mTOR, éste último fosforila a S6K (p70 S6), quien a su vez fosforila al iniciador de transcripción eucariótico 4E (eIF-4E) y así se promueve la síntesis de HIF-1 alfa (Y. C. Kim & Guan, 2015).

Existe evidencia en diferentes tipos de cáncer relacionada a la activación de AMPK y a la inhibición de mTOR, aparte de que mTOR y sus componentes río abajo como S6K juegan un papel muy importante en la síntesis de HIF-1alfa. Éste último es un blanco terapéutico que significa una nueva aproximación en la búsqueda de oportunidades para el tratamiento del cáncer (Li et al., 2015).

Por otra parte, diversos estudios han demostrado que el factor inducible por hipoxia 1 (HIF1) puede regular un panel de microRNAs, y esta interacción entre microRNAs y HIF1 puede desarrollar diferentes eventos vitales para la progresión de la tumorigénesis, tales como la angiogénesis, el metabolismo, la regulación del ciclo

celular, proliferación, metástasis y resistencia a la terapia contra el cáncer (Shen, Li, Jia, Piazza, & Xi, 2013).

2.5. MicroRNAs y su Biogénesis

Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas moléculas de RNA monocatenario no codificantes de 22 nucleótidos que funcionan como reguladores negativos de la expresión génica y regulan más del 30% de los genes que codifican para proteínas humanas, mediante la unión a la región 3'UTR de los mRNAs que resulta en la escisión de estos genes y/o detención de la traducción (Reddy, 2015). Un solo microRNA puede regular cientos de genes simultáneamente y un mRNA puede estar sujeto a regulación por parte de varios microRNAs coordinadamente. Por lo tanto, los miRNAs constituyen una red de regulación compleja en la gestión de cada proceso fisiológico y patológico (Ben-Hamo & Efroni, 2015). Hoy en día, se conocen microRNAs específicos que pueden actuar ya sea como oncogenes o supresores de tumor dependiendo del entorno celular en el que se expresan, por ejemplo, se ha visto que aquellos microRNAs situados en regiones genómicas amplificadas en diferentes tipos de cáncer funcionan como oncogenes, mientras que los microRNAs ubicados en porciones de cromosomas eliminados funcionan como supresores de tumor. A nivel genómico, la mayoría se localizan en regiones intergénicas tanto como intrónicas (Gulyaeva & Kushlinskiy, 2016).

Para la maduración de un microRNA es necesaria la transcripción de un RNA precursor denominado como pri-microRNA, los cuales son transcritos de varios cientos de nucleótidos sintetizados a partir de DNA por una RNA polimerasa II y los cuales presentan una estructura de tallo-asa de entre 60-70 nt, la cual se procesa en el núcleo por un complejo microprocesador, que está formado por Drosha (una RNAsa tipo III) y una proteína con dominios de unión a RNA de doble hebra llamada Pasha, generando así un pre-microRNA el cual será transportado del núcleo hacia el citoplasma con la ayuda de la exportina 5 (Kala, Peek, Hardy, & Tollefsbol, 2013). Ya en el citoplasma la endoribonucleasa DICER junto con TRBP, escinde el loop del pre-microRNA para generar una doble cadena de microRNA conocido como

microRNA maduro (20-23 nucleótidos). A continuación, DICER forma junto con las proteínas Argonautas (Ago2) el complejo inductor de silenciamiento de RNA denominado RISC (RNA-induced silencing complex), formado por Dicer, TRBP, Ago2 y la hebra del miRNA (Gurtner, Falcone, Garibaldi, & Piaggio, 2016). Este complejo permite la hibridación del microRNA directamente con la región 3'UTR del mRNA blanco, lo que facilita la posterior inhibición o degradación: si la unión del microRNA es totalmente complementaria con el mRNA blanco éste será degradado; por el contrario, si no es totalmente complementario ocurre una represión en el proceso de traducción ocasionado por modificaciones en la estructura del mRNA y simplemente llevara a su inhibición (Yao, 2016) (Figura 7).

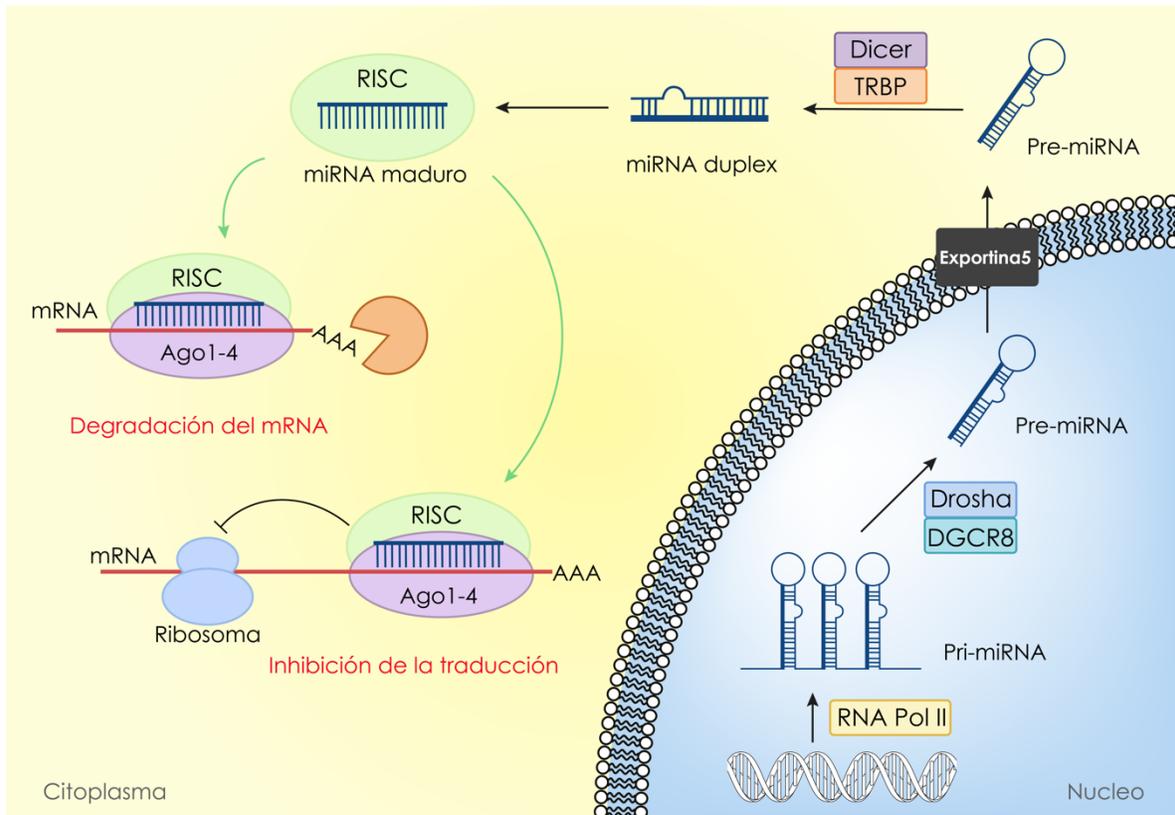


Figura 7. Biogénesis de MicroRNAs.

Procesamiento de miRNAs en el núcleo y su maduración en el citoplasma donde se incorporan al complejo RISC, para llevar a cabo ya sea la represión de la traducción o la degradación del mensajero blanco (Seahyoung et al., 2015).

Lo anterior sugiere que los microRNAs podrían representar nuevos instrumentos de diagnóstico y pronóstico en pacientes con alto riesgo de CCR y CaMa, así como también para otros tipos de cáncer, y también podrían resultar útiles como herramientas terapéuticas. Dicha información indica que las nuevas terapias podrían originarse en la manipulación de miRNAs supresores de tumores y miRNAs oncogénicos o tumorales (Ji, Sun, & Su, 2017).

Se ha demostrado también que los microRNAs pueden estar involucrados en la modulación de diferentes vías de señalización involucradas en proliferación, supervivencia, metástasis y en la regulación negativa de genes esenciales inductores de procesos de muerte celular, tales como la apoptosis y la **autofagia** (Wu et al., 2016).

2.6. Autofagia

La autofagia es un proceso conservado evolutivamente en todos los organismos eucarióticos, desde levaduras hasta humanos. Es un proceso en donde el material citoplasmático de las células es secuestrado en vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas, que posteriormente se fusionan con varios lisosomas para formar estructuras llamadas autofagolisosomas en donde se degrada el material citoplasmático gracias a enzimas denominadas hidrolasas las cuales degradan el componente citoplasmático para su posterior reciclaje (Zambrano & Yeh, 2016). En mamíferos, la autofagia está implicada en numerosos procesos fisiológicos como control del crecimiento celular, respuesta a falta de nutrientes, mecanismo antienvjecimiento e inmunidad innata, y se sabe que la desregulación de la autofagia puede causar diferentes patologías de numerosas enfermedades humanas como el cáncer (Zhong, Sanchez-Lopez, & Karin, 2016), o bien, la autofagia evita la carcinogénesis a través de la constante eliminación de moléculas y organelos dañados produciendo muerte celular.

En los últimos 15 años, estudios genéticos, principalmente en levaduras y hongos han permitido aislar 31 genes denominados “genes relacionados con autofagia” (ATG), cuyos productos están específicamente involucrados en este proceso catabólico (Levine & Klionsky, 2017). Además, 11 de estos genes han sido identificados como ortólogos también en organismos eucariotas superiores (Aparicio et al., 2016).

La autofagia se lleva a cabo mediante una serie de pasos secuenciales que llevarán al secuestro del componente citoplasmático en vesículas para su posterior degradación (Figura 8). El primer paso consiste en la 1) Inducción: donde participa ULK1, el principal inductor del proceso de autofagia y su participación es en una etapa temprana. En esta primera etapa de este proceso comienza la formación de vesículas denominadas fagóforos que son estructuras primarias que se forman antes y que posteriormente darán lugar a la formación de los autofagosomas (Karanasios et al., 2016) . El segundo paso es la 2) Nucleación de vesículas: etapa que depende de la actividad de beclina-1. La principal función de Beclina1 es la supresión de tumores mediante la inducción de autofagia. Por tanto, los niveles de Beclina1, así como su estado en la célula son un factor crítico en la regulación de este proceso (Rohatgi & Shaw, 2016). Debido a esto, la disminución del aporte de aminoácidos a la célula, estimula la actividad de PI3K-III asociada a Beclina1 induciendo autofagia, lo que ocurre es que PI3K/Vps34 se une a Beclina1 por su dominio ECD, que es esencial para esta unión y para que el fagóforo o membrana aislada sufra una elongación y por consiguiente el inicio de la formación de los autofagosomas (Fujiwara, Usui, Ohama, & Sato, 2016) . El siguiente paso es la 3) Elongación y cierre del autofagosoma, mediado por sistemas de conjugación ubiquitina como LC3/Atg8. Atg8/LC3 fue la primera molécula autofágica encontrada, localizada en estructuras autofagosomales y que es necesaria para su formación. Se comporta como una proteína integral de membrana aunque no posee la región transmembranal, sin embargo, forma parte de la maquinaria autofágica en estadios iniciales (Schlafli et al., 2016). Tras su síntesis, el fragmento carboxiterminal de Atg8/LC3 es procesado por una cisteín proteasa, la Atg4, dando lugar a la forma citosólica LC3-I, que expone un residuo de Glicina en su extremo carboxiterminal

(Y. K. Lee & Lee, 2016). LC3-I se activa fuertemente por Atg7, una enzima tipo E1 y finalmente se transforma en su forma de unión a membrana, LC3-II, la cual se localiza en la membrana del autofagosoma, haciendo de esta proteína un marcador de autofagia. Por lo tanto, y como se ha demostrado recientemente, Atg8/LC3 controla la expansión del fagóforo para la formación del autofagosoma maduro (Ponpuak et al., 2015). Y la última etapa de este proceso es el 4) Acoplamiento y fusión del autofagosoma: Aquí LC3-II conjugada con fosfatidiletanolamina (PE) que se localiza en la membrana de las vesículas autofágicas, se multimeriza y media la fusión de los autofagosomas con los lisosomas generando así los denominados autofagolisosomas, en donde se lleva a cabo la degradación de los componentes citoplasmáticos mediante la acción de enzimas denominadas hidrolasas (Gomez-Sanchez et al., 2016).

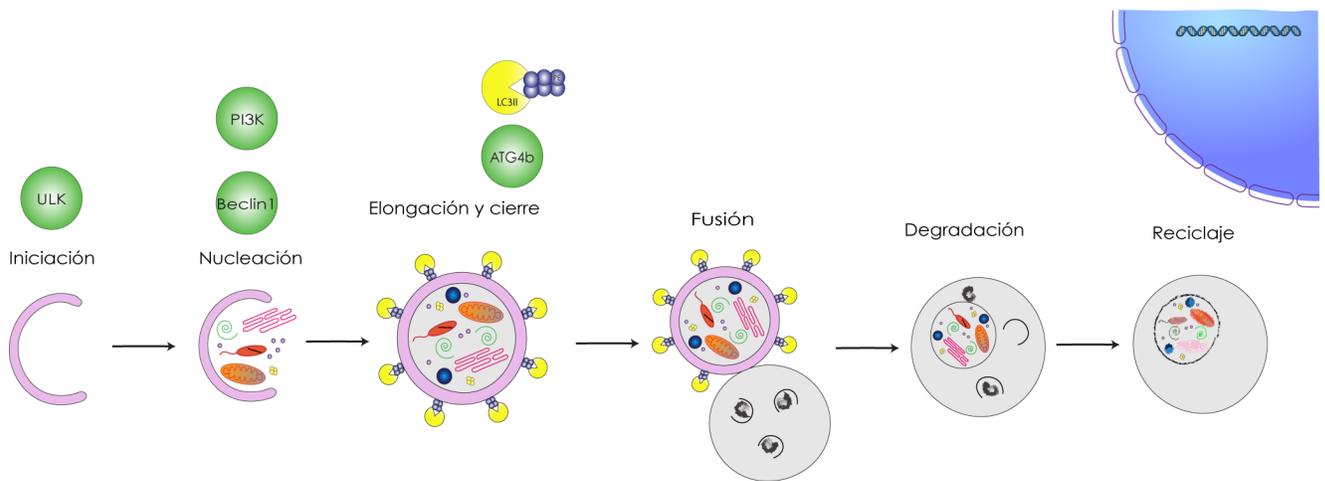


Figura 8. Diferentes etapas del proceso de autofagia. Tomado y modificado de (Fu, Wen, Bao, & Liu, 2012).

En las células cancerosas, la autofagia es un mecanismo fisiológico importante que puede servir como un medio de supervivencia temporal, mientras que, si los

resultados de estrés celular continúan, se llevaría a cabo un proceso de muerte celular. La relación que existe entre la autofagia y la tumorigénesis se ha explorado recientemente, sin embargo, el rol de la autofagia como tumorigénico o antitumoral en la carcinogénesis o en la terapia contra el cáncer, aún no está bien definido. Por lo tanto, es de suma importancia la búsqueda de nuevas terapias contra el cáncer enfocadas en la inducción de procesos de muerte celular (White, 2015).

2.7. Nuevas estrategias terapéuticas para el cáncer

Se ha visto que las monoterapias en cáncer pueden ocasionar quimioresistencia en la mayoría de los pacientes, por lo tanto, recientemente se han propuesto estrategias terapéuticas con fármacos inductores de muerte celular por apoptosis o autofagia que han ganado interés en los últimos años. Tal es el caso de la Doxorrubicina y la Metformina, que recientemente se han propuesto como inhibidores de genes que participan en vías relacionadas con proliferación y supervivencia celular, y cuyo mecanismo de acción puede estar directamente relacionado con la inhibición de vías esenciales para la obtención de energía como es la glucólisis (Tseng, 2016), en este caso el mecanismo de acción de un fármaco novedoso como el oxamato de sodio que también está implicado en la inhibición de estas vías esenciales para la supervivencia de la célula tumoral. En este proyecto de tesis, trabajamos con tres fármacos: Doxorrubicina, Metformina y Oxamato de Sodio, los cuales posiblemente están relacionados con la inhibición de diferentes vías como glucolisis y mTOR.

2.7.1. Doxorrubicina

La Doxorrubicina es una antraciclina (Figura 9) con actividad antineoplásica que es utilizada como monoterapia para el tratamiento de varios tipos de cáncer humano como mama y colorrectal. Actúa intercalándose entre las pares de bases inhibiendo la replicación y la acción de las polimerasas de los ácidos nucleicos (RNA y ADN); induce la ruptura de las cadenas de ADN a través de la inhibición de la

topoisomerasa II y su oxidación lleva a la formación de ROS (especies reactivas de oxígeno) y radicales libres hidroxilo (OH), generados por una variedad de oxidasas, reductasas y deshidrogenasas (Meredith & Dass, 2016). La eficacia del tratamiento con Doxorubicina está limitada por su toxicidad y algunos mecanismos de resistencia como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que este fármaco es metabolizado en el hígado por la enzima aldoceto reductasa que origina su metabolito principal, el doxorubicinol, el cual es sustrato de la isoforma 3A4 del citocromo P450 y el metabolito que origina es la doxotubicina-7-desoxiaglicona; ambos considerados como los principales responsables de la toxicidad de la doxorubicina (Grant, Seelig, Sharkey, & Zordoky, 2017). Debido a estos factores, se han propuesto mecanismos alternativos para describir los efectos antitumorales de la Doxorubicina y con ello ofrecer explicaciones concretas de por qué algunos tipos de cáncer son sensibles al tratamiento con Doxorubicina, mientras que otros pierden eficacia. Un mecanismo importante para describir los efectos antitumorales de la doxorubicina es mediante la oxidación a semiquinona, un metabolito inestable, que se convierte de nuevo a doxorubicina en un proceso que libera ROS (Heart et al., 2016). Estas especies reactivas de oxígeno pueden conducir a la peroxidación de lípidos, daño a la membrana, daño al ADN, estrés oxidativo, y desencadena las vías apoptóticas de la muerte celular. Los genes que pueden modular esta vía implican aquellos capaces de llevar a cabo la reacción de oxidación (NADH deshidrogenasas, óxido nítrico sintasas, xantina oxidasa) y aquellos capaces de desactivar los radicales libres tales como glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa (Robinson et al., 2016). Además, la doxorubicina puede afectar directamente a la membrana celular mediante la unión a proteínas plasmáticas que causan la reducción enzimática de electrones de la doxorubicina. Los resultados han sugerido también que la doxorubicina da como resultado la autofagia, como una respuesta al daño del ADN. La activación de la enzima nuclear poli ADP-ribosa polimerasa-1 (PARP-1) es un evento vital que decide si la célula sufrirá autofagia (Guo, Tam, Santi, & Parissenti, 2016). El estrés genotóxico puede causar la hiperactivación de PARP-1, que a su vez agota tanto el NAD⁺ como el ATP, por lo tanto, la célula experimentará entonces un fallo de energía que sería

irreversible, dando como resultado la muerte celular. Por ejemplo, provoca la activación de varias señales moleculares de AMPK para influir en la vía de apoptosis Bcl-2 / Bax. Al alterar la relación Bcl-2 / Bax, puede producirse una activación río abajo de diferentes caspasas dando como resultado apoptosis (Zhao & Zhang, 2017).

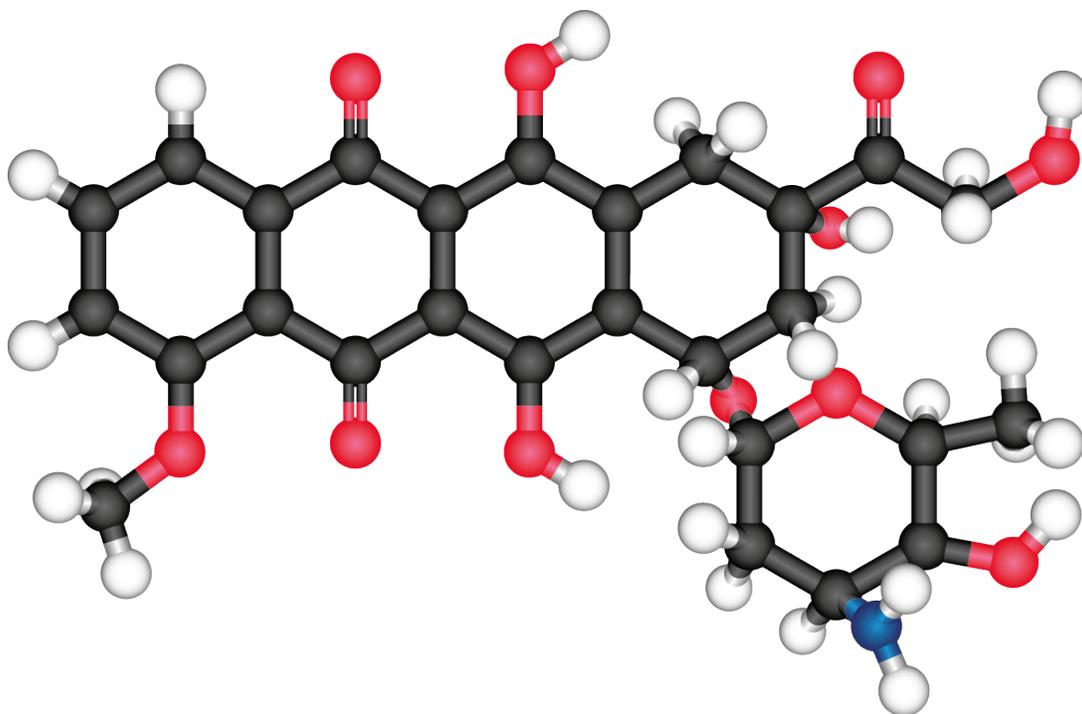


Figura 9. Estructura química de la Doxorubicina: $C_{27}H_{29}NO_{11}$ (Sigma Aldrich). www.sigmaaldrich.com/united-states.html. (Consultado y modificado el 1 de Agosto 2017).

2.7.2. Metformina

La Metformina es una biguanida que se utiliza para el tratamiento de la diabetes tipo II con la ventaja clínica de no inducir hipoglucemia (Farmer et al., 2017). Se ha comprobado que tiene efectos quimiopreventivos y antineoplásicos en muchos tipos de tumores malignos como es en el caso del cáncer de mama. Asimismo, también se ha demostrado que inhibe el complejo I de la cadena respiratoria, disminuyendo

la síntesis de ATP, lo que lleva a un incremento en la actividad de la cinasa activada por AMPK (Suissa & Azoulay, 2014). El principal mecanismo de la Metformina es disminuir la producción de glucosa hepática a través de un mecanismo que requiere de la cinasa B1, que es activada por la proteína AMP-quinasa y genes neoglucogénicos que controlan el ciclo metabólico. La Metformina también actúa como sensibilizador energético disminuyendo los niveles energéticos en la célula, inhibiendo la proliferación celular de una manera dependiente de AMPK (Chae et al., 2016).

La actual acción molecular anticancerígena propuesta de la metformina se asocia principalmente con la inhibición de mTORC1. La vía mTOR desempeña un papel fundamental en el metabolismo, el crecimiento y la proliferación de células cancerosas, y se estipula que la metformina inhibe la vía mTORC1, ya que el efecto sistémico de la metformina se manifiesta por la reducción del nivel circulante de insulina y del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), el cual podría estar asociado con la acción anticancerígena (Soliman, Steenson, & Etekpó, 2016). Diferentes evidencias sugieren que la inhibición de la vía mTOR por la metformina procede de la activación de AMPK, ya que esta proteína fosforila el complejo de esclerosis tuberosa 2 (TSC2) que inhibe mTORC1 conduciendo a la disminución en la síntesis de proteínas y el crecimiento celular, es decir, la metformina entra en la célula a través del transportador de OCT1 e inhibe el complejo 1 de las mitocondrias, lo que conduce a una activación de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK)/vía LBK1, e induce la detención del crecimiento celular, la apoptosis y la autofagia (DePeralta et al., 2016) (Figura 10).

Dichas observaciones han dado el impulso para investigaciones sobre el papel de la metformina en la regulación de la proliferación tumoral, la regulación del ciclo celular, la apoptosis y la autofagia, así como también se ha demostrado que la metformina podría ser utilizada como un fármaco anticancerígeno eficaz en diversas neoplasias tales como próstata, mama y colon (Y. Lei et al., 2017).

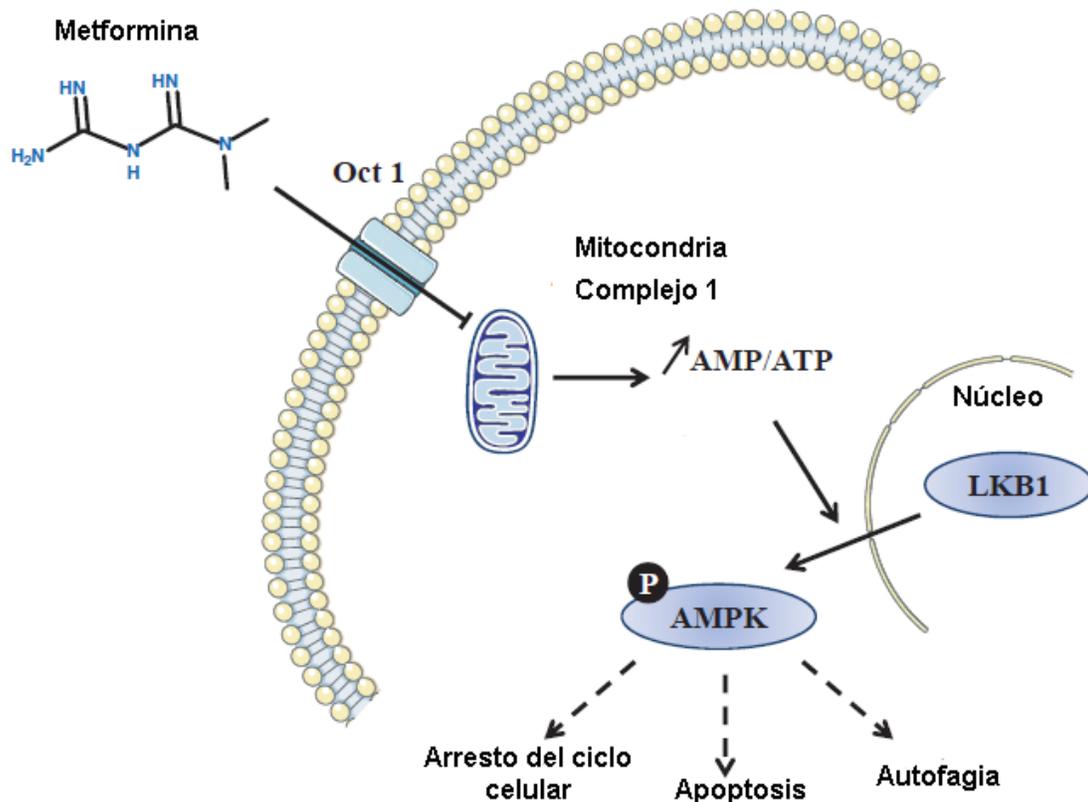


Figura 10. Mecanismo de acción de la Metformina.
Esquema general sobre el mecanismo de acción de la metformina una vez que entra a la célula (Tomado y modificado de Cerezo et al, 2014).

2.7.3. Oxamato de Sodio

El oxamato de sodio es un fármaco conocido como un potente inhibidor competitivo de la lactato deshidrogenasa (LDH-A), enzima que regula el flujo glucolítico en la conversión de piruvato a lactato (Figura 11). Asimismo, el oxamato es un fármaco de suma importancia ya que tiene una alta homología con el piruvato (Zeczycki, Maurice, & Attwood, 2010). Por lo tanto, al inhibir esta importante enzima (LDH-A), se evita la acidosis láctica, la cual es un fenómeno común en el microambiente del cáncer y se relaciona con la proliferación celular, metástasis y la inhibición de la respuesta inmune contra las células cancerosas (Lu, Zhang, Yee, Go, & Lee, 2015). Se sabe que la actividad y sobreexpresión de la LDH-A es característica de diversas

patologías humanas tales como el cáncer, ya que la célula tumoral para satisfacer su demanda de energía, depende en gran parte de la glucólisis aerobia, proceso que puede ser inhibido mediante el bloqueo de la LDH. Aparte de que se ha visto que la sobreexpresión de la LDH-A es mediada por la sobreexpresión de HIF-1, el cual es un regulador central de la respuesta metabólica a hipoxia y está asociado a proliferación celular (Ye et al., 2016).

Se ha visto, que una tasa elevada de consumo de glucosa y la dependencia de la glucólisis aerobia para la generación de ATP, son dos factores asociados a las células cancerosas, fenómeno conocido como efecto Warburg. Durante este fenómeno, la conversión de glucosa a lactato, en lugar de la metabolización a través de la fosforilación oxidativa en la mitocondria, es mucho menos eficiente ya que se genera menos ATP por unidad de glucosa metabolizada (Valvona, Fillmore, Nunn, & Pilkington, 2016). Por lo tanto, se requiere una alta tasa de absorción de glucosa para satisfacer el aumento de energía necesario para apoyar la progresión tumoral rápida. Esto demuestra, que el metabolismo energético alterado en células cancerosas ofrece una atractiva oportunidad para el desarrollo de estrategias terapéuticas contra el cáncer (Miskimins et al., 2014).

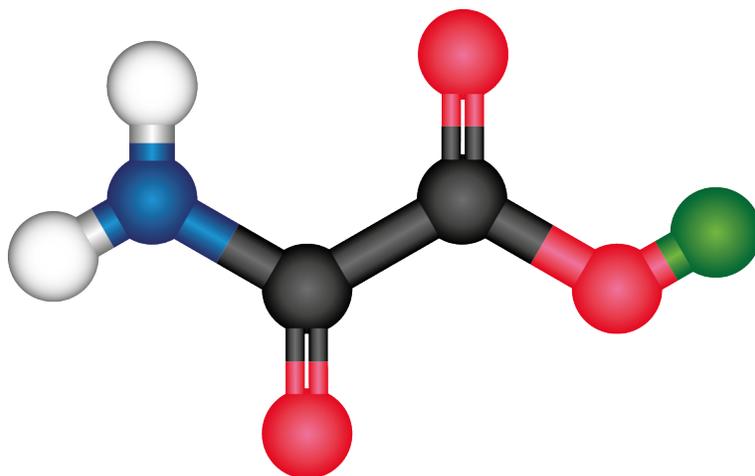


Figura 11. Estructura química del Oxamato de sodio: $C_2H_2NNaO_3$ (Sigma Aldrich). www.sigmaaldrich.com/united-states.html. (Consultado y modificado el 1 de Agosto 2017).

3. Justificación

El cáncer colorrectal y el cáncer de mama son un problema de salud en México y a nivel mundial, y constituyen una causa importante de morbilidad y mortalidad en nuestro país. A pesar de la existencia de estrategias terapéuticas como la radioterapia, la quimioterapia y la cirugía para estas enfermedades, aún no se tiene un tratamiento eficaz y específico. Por lo tanto, el conocimiento de genes esenciales involucrados en vías de señalización necesarias para el inicio y progresión del cáncer es muy importante ya que nos puede ayudar a identificar factores pronósticos de respuesta al tratamiento y nuevos blancos terapéuticos, así como a buscar marcadores predictivos de toxicidad y respuesta a fármacos que permitan realizar una terapia personalizada y alternativa a la quimioterapia actual. Recientemente se ha documentado que la monoterapia en cáncer puede desarrollar quimioresistencia en la mayoría de los pacientes, por lo que actualmente se están desarrollando terapias usando combinaciones de fármacos inhibidores de genes que participen en diferentes vías de señalización que estén mutadas en cáncer e involucradas en procesos biológicos como apoptosis y autofagia. Así como también se buscan fármacos cuyo mecanismo de acción este directamente relacionado con la inhibición de la alta tasa glucolítica de las células cancerosas.

Por lo tanto, en este proyecto de tesis se propone que el Oxamato de sodio, competidor específico de la LDH-A, en combinación con la Metformina, fármaco que inhibe mTOR a través de la activación de AMPK por la regulación celular de AMP:ATP y la Doxorrubicina, intercalante del ADN, induzcan muerte celular por autofagia por medio de la inhibición de la expresión de HIF-1 alfa y de sus componentes río arriba como PI3K, mTOR y S6K, que son genes importantes en la supervivencia y proliferación de las células tumorales. Esta combinación ayudará a mejorar los niveles de insulina y glucosa en sangre, lo cual en conjunto lleva a la célula tumoral a una crisis energética, reactivando mecanismos de muerte celular como apoptosis y/o autofagia. Por lo que se planteó esta estrategia terapéutica la cual está asociada a la inhibición de estas vías involucradas en el desarrollo del cáncer con el objetivo de plantear una posible alternativa para el tratamiento de

estas neoplasias y encontrar blancos o marcadores que puedan ser de utilidad para dar un temprano diagnóstico y pronóstico al paciente que ayude a prevenir la progresión del cáncer.

Previamente dentro de nuestro grupo de investigación, dichos fármacos fueron evaluados en un modelo de cáncer colorrectal y en uno de cáncer de mama, y lo que se obtuvo fue que la triple terapia inhibió a mTOR y a LDHA. Por ello se planteó la hipótesis de este trabajo.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué papel tendrá HIF-1 α en la regulación del proceso de autofagia inducida farmacológicamente por medio de la combinación de tres fármacos (Doxorrubicina, Metformina y Oxamato) en células tumorales de mama y colon?

5. HIPÓTESIS

“La combinación farmacológica de Doxorrubicina/Metformina/Oxamato de sodio inhibe la expresión de HIF-1 α , induciendo la expresión de genes involucrados en el proceso autofagia”.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de HIF-1 α en la regulación de la autofagia inducida farmacológicamente por medio de la combinación de Doxorrubicina/Metformina/Oxamato de sodio en células tumorales de mama y colon.

6.1. Objetivos Particulares

1. Determinar la expresión a nivel protéico de los componentes de la vía de señalización de HIF-1: PI3K, AKT, mTOR, S6K y HIF-1alfa, en condiciones basales y con tratamientos.
2. Determinar la expresión a nivel protéico de marcadores esenciales de la autofagia como ULK1, ATG4, Beclina, LC3 Y LC3II, en condiciones basales y con tratamientos.
3. Determinar la expresión relativa de miR-106a, involucrado en el proceso de autofagia en condiciones basales y con tratamientos.
4. Clonar la región 3'UTR del mensajero ULK1.
5. Determinar el efecto de miR-106a en los niveles de expresión de ULK1 mediante ensayo de luciferasa en células tumorales de mama y colon.

7. Material y Métodos

7.1. Cultivo Celular

Las líneas celulares HCT116 de CCR humano y MDA-MB-231 de cáncer de mama fueron obtenidas del Instituto Nacional de Cancerología (InCan). Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 para las de CCR y medio DMEM/F12 para las de CaMa (gibco®, life technologies) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Biowest) y antibiótico/antimicótico; se mantuvieron en condiciones de esterilidad en una incubadora a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa. Una vez alcanzada la confluencia del 70-80%, las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de las combinaciones de los fármacos (Tabla 1) y a diferentes tiempos (2, 4, 6, 8, 12 y 24 h). Las concentraciones y tiempos fueron definidas en base a los antecedentes de la tesis de Licenciatura titulada “Evaluación de MicroRNAs involucrados al proceso de autofagia inducida farmacológicamente en una línea celular de cáncer colorrectal” que realice en la UNAM.

Tabla 1. Concentraciones de las combinaciones de los fármacos para cada línea celular, las cuales se utilizarán para los ensayos o técnicas subsecuentes.

Fármacos	Concentraciones (Tratamientos)	
	HCT116	MDA-231
Doxorrubicina (control positivo)	0.4 μ M	0.5 μ M
Metformina/Oxamato de Sodio	15mM/10mM	25mM/10mM
Doxorrubicina/Metformina/Oxamatode sodio	0.4 μ M/15mM/10mM	0.5 μ M/25mM/10mM

7.2. Extracción de Proteínas

Con el fin de detectar proteínas involucradas en la vía de HIF-1 y de la autofagia, se realizaron diferentes extracciones. Para la obtención de estas proteínas se utilizaron cultivos celulares aproximadamente del 80% de confluencia en condiciones basales y con los diferentes tratamientos y a los tiempos establecidos. La extracción de proteínas totales se llevó a cabo utilizando el buffer de lisis RIPA (Santa Cruz Biotechnology) suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasa COMPLETE (Roche). Brevemente, el procedimiento que se siguió fue el siguiente: se retiró el medio de cultivo de las placas petri (100X15mm) que contenían las células, la placa se lavó con PBS no estéril al 1x y posteriormente se agregó el buffer de lisis RIPA. Posteriormente se raspó la caja petri con ayuda de un scrapper y se colectó el contenido en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Este tubo fue sometido a agitación en un vortex para deshacer los agregados celulares y finalmente se centrifugó para separar los residuos celulares insolubles. La cantidad de proteínas obtenidas se cuantificó con base en la técnica colorimétrica de Bradford. La lectura

se realizó en un espectrofotómetro de placas Epoch (Biotek). Los ensayos se realizaron de forma independiente y por triplicado a los tiempos y con las concentraciones mencionadas anteriormente.

7.3. Western Blot

Con el objetivo de detectar la expresión de las proteínas de la vía HIF-1 (PI3K, AKT, mTOR, S6K y HIF-1alfa) y de la autofagia (ULK1, ATG4, Beclin-1, LC3 Y LC3II) se utilizó la técnica de inmunodetección en membrana. Las muestras de proteínas (50 µg) obtenidas de la extracción fueron separadas mediante una electroforesis SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) utilizando el equipo Mini-PROTEAN Tetra System (BioRad) a 80 volts por 2 horas aproximadamente. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de PDVF (*polifluoruro de vinilideno*) con un poro de 0.45 µm mediante transferencia semi-seca en un equipo Trans-blot turbo (BioRad) a 20 volts por 30 minutos. Al terminar la transferencia, la membrana de PDVF fue bloqueada con una solución de leche libre de grasa al 5% en TBS-Tween 0.1 % por 2 horas. Posteriormente se realizaron 4 lavados con TBS-Tween y se incubó durante toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente a la proteína a detectar (Tabla 2). Una vez transcurrido el tiempo de incubación del anticuerpo (Ab) primario, se realizaron tres lavados con TBS-Tween y se incubó con el Ab secundario correspondiente por 2 horas a 4°C. Después de darle 4 lavados a la membrana con TBS-Tween se utilizó el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Femto Maximun Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) para la detección de los inmunocomplejos en el digitalizador C-Digit Blot Scanner (Li-COR); las imágenes resultantes se analizaron en el software ImageStudio (Li-COR).

Tabla 2. Listado de anticuerpos utilizados para Western Blot para la detección de proteínas involucradas en la vía de señalización de Hif-1 y en el proceso de autofagia en la línea celular HCT116 y MDA-231.

Anticuerpo	No. catálogo	Ab secundario
ULK1	8054s	Anti-rabbit
ATG4b	sc-130968	Anti-rabbit
LC3	2775s	Anti-rabbit
Beclin-1	3738s	Anti-rabbit
PI3K	4255s	Anti-rabbit
AKT	sc-8312	Anti-rabbit
p-AKT (ser473)	sc-101629	Anti-rabbit
S6K	9202s	Anti-rabbit
P70S6K	GTX107562	Anti-rabbit
mTOR	2982s	Anti-rabbit
p-mTOR (ser2448)	2971s	Anti-rabbit
HIF1 alpha	GTX127309	Anti-rabbit
Beta Actina	sc-47778	Anti-mouse
Anti-mouse IgG-HRP	7076s	
Anti-rabbit IgG-HRP	7074s	

7.4. Determinación del nivel de expresión de miR-106a mediante sondas TaqMan.

7.5. Extracción de RNA

Se aisló el RNA total de las células HCT116 y MDA-231 en condiciones basales y expuestas a todos los tratamientos a 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas por el método TRIzol[®] Reagent (Life Technologies) siguiendo las especificaciones del fabricante. El procedimiento que se llevó a cabo fue el siguiente: se retiró el medio y se agregó 1 ml de TRIzol (Invitrogen), posteriormente se añadió cloroformo y se centrifugó durante 15 min. a 13000 rpm. Se obtuvo la fase acuosa (RNA) y se dejó precipitando con isopropanol, el cual se retiró después de centrifugar durante 25 min. a 13000 rpm. Finalmente se realizaron lavados con etanol (EtOH) al 75% y el RNA se resuspendió en 30 µl de agua libre de RNAsas.

La cantidad total de RNA se cuantificó en un espectrofotómetro de microplacas (Epoch, Biotek) a una absorbancia de 260 nm y la integridad del mismo se analizó mediante un gel de agarosa al 1.5 % teñido con EtBr (Bromuro de Etidio).

7.6. Retrotranscripción

Se utilizaron 100 ng de RNA total para generar cDNA utilizando el kit Taqman[®] MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) y siguiendo el protocolo del fabricante. Las condiciones para generar el cDNA se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de pre-amplificación para generar cDNA de la línea celular HCT116 de CCR y MDA-231 de CaMa expuesta a 6 tiempos de exposición a los fármacos.

Paso	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)
1	30	16
2	30	42
3	5	85
4	∞	4

7.7. qPCR

Con el objetivo de conocer el nivel de expresión de miR-106a, se utilizó la técnica de PCR en tiempo real (qPCR). Las amplificaciones se realizaron por triplicado en el LightCycler 2.0 de Roche, utilizando el kit LightCycler® Taqman® Master y las sondas Taqman para MicroRNAs, en este caso la sonda para miR-106a (Taqman® MicroRNA Assays), como un control de normalización, se utilizó RNU44. Las condiciones de amplificación se muestran en la tabla 4. Se calculó el valor relativo de expresión de este miRNA durante las etapas establecidas basadas en diferentes tiempos y tratamientos utilizando el método de $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ (Applied Biosystems).

Tabla 4. Condiciones de amplificación para los diferentes miRNAs involucrados en el proceso de autofagia.

Periodos	Temperatura	Duración	Ciclos
Desnaturalización	95°C	10 min.	1
Amplificación	95°C	10 seg.	40
	60°C	40 seg.	
	72°C	1 seg.	
Enfriamiento	40°C	30 seg.	1

7.8. Clonación de la región 3'UTR del mRNA de ULK1

El plásmido utilizado para la clonación de la región 3'UTR del mRNA de ULK1 fue el vector de expresión pMIR-REPORT (Thermo Fisher®) el cual se digirió con las enzimas de restricción Spe1 y HindIII (© 2015 Thermo Fisher Scientific Inc.) durante 2hrs. La digestión fue con 2 µL de Buffer Tango10X, 1ul (4 unidades) SpeI, 2 µL (8 unidades) de HindIII y 1 µg del inserto purificado, en un volumen total de 20ul para generar los sitios protruyentes de ligación del vector de expresión.

La ligación de la región 3'UTR de ULK1 se llevó a cabo en el vector pMIR-REPORT que forma parte del sistema reportero de luciferasa y contiene el gen de selección para antibiótico Ampicilina. Para ligar la región 3'UTR de ULK1 que se diseñó bioinformáticamente al vector reportero de luciferasa se utilizó 1U de la enzima T4 DNA ligasa (Thermo Fisher Scientific Inc.), T4 DNA Ligase buffer 1X, 40ng pMIR-REPORT, 160ng de la región 3'UTR y H2O libre de nucleasas en un volumen final de 20 ul. Posterior a la ligación se transformaron bacterias XL Gold ultracompetentes, se aislaron las colonias que contuvieran dicha construcción y cada colonia se incubó para su crecimiento en 3ml de medio LB líquido durante 24 horas y se procedió a extraer el plásmido con el inserto ya clonado en el mediante el kit Pure Link Quick Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Una vez extraído el plásmido de las bacterias transformadas, se verificaron utilizando las enzimas de restricción empleadas para generar las construcciones SpeI y HindIII y se secuenciaron por el método de secuenciación Sanger.

7.9. Transfección

Para poder llevar a cabo los ensayos de luciferasa fue necesario transfectar células HCT116 y MDA-231. Se transfectaron 400 000 células por pozo utilizando el agente de transfección Siport que se emplea para transfección de moléculas pequeñas, en este caso el mimic de miR-106a. Para la construcción de ULK1 en el vector de expresión pMIR-REPORT se utilizó el agente de transfección Lipofectamine® 2000 reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.) el cual es empleado para la transfección de moléculas grandes. Las células se mantuvieron a 37°C con sus respectivos medios de cultivo y bajo condiciones de 5% de CO₂ durante 48 horas.

7.10. Ensayo de Luciferasa

48 horas postransfección se realizó el ensayo del sistema reportero de luciferasa de acuerdo con el protocolo de Applied Biosystems Dual-Light®, System Chemiluminescent Reporter Gene Assay System for the Combined Detection of Firefly Luciferase and β -Galactosidase. Para esto, se aislaron las proteínas mediante un lisado de células con la solución de lisis incluida en el kit para posteriormente realizar el ensayo de detección de quimioluminiscencia. La detección de la actividad de luciferasa se realizó empleando cajas Greiner para luminómetro de 96 pozos y agregando a un luminómetro GloMax 96 Microplate Luminometer (Promega Corporation) los sustratos para la reacción (Luciferina y β -Galactosidasa).

Los valores obtenidos de quimioluminiscencia fueron graficados con el software GraphPad Prism 5.

8. Resultados

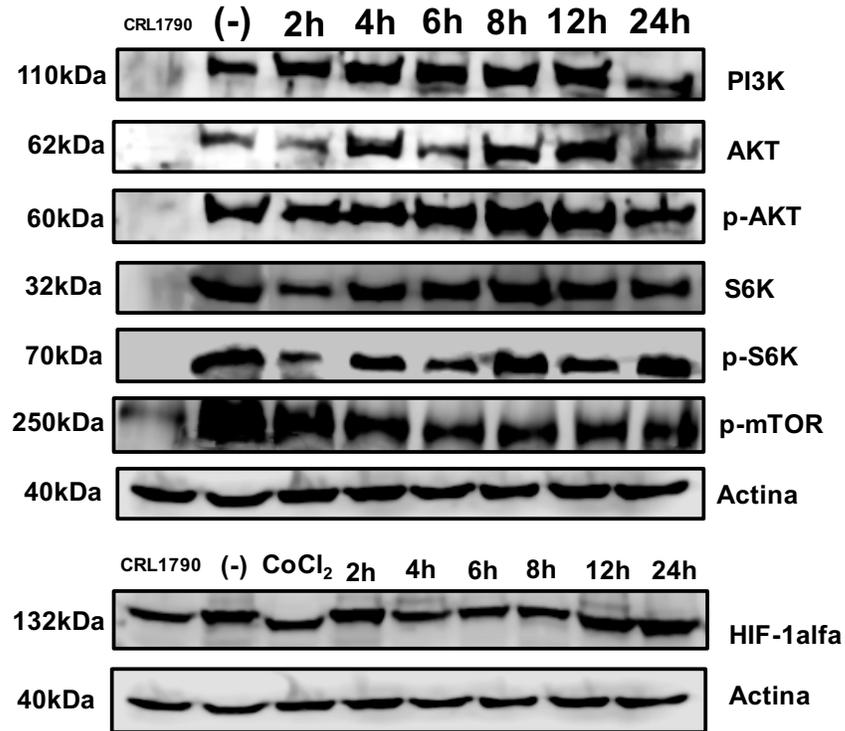
8.1. Detección de proteínas involucradas en la vía de señalización de HIF-1

Se sabe que la vía encargada de la síntesis de HIF-1 alfa es la vía de señalización de fosfatidilinositol- 3-kinasa (PI3K), la cual es crucial en numerosos aspectos del crecimiento y la supervivencia celular. Esta vía está compuesta por diferentes proteínas tales como AKT, mTOR y S6K que tienen un papel crucial en la síntesis de un factor de transcripción sumamente importante que es HIF-1 alfa. Por lo tanto, se consideró importante conocer su expresión a nivel de proteína.

Los resultados mostraron que en la línea celular HCT116 de CCR, a los diferentes tiempos de exposición con los tratamientos de Doxorrubicina y Metformina/Oxamato la detección de las proteínas de la vía de señalización de HIF-1 alfa no se ve alterada, sin embargo, en presencia de la combinación de los tres fármacos, podemos observar una disminución significativa en la detección de estas proteínas a partir de las 8 horas de exposición a esta triple terapia (Figura12). Esta disminución es más notable conforme aumenta el tiempo de exposición a estos fármacos. Asimismo, podemos notar que en la línea celular CRL1790 no hay detección de estas proteínas debido a que es una línea celular no tumoral, a comparación de la línea celular HCT116 que funge como control negativo. Algo que cabe resaltar, es que con la triple terapia, HIF-1 alfa disminuye significativamente a partir de las 12 horas de exposición a comparación con los otros dos tratamientos los cuales no afectan la detección de este factor de transcripción.

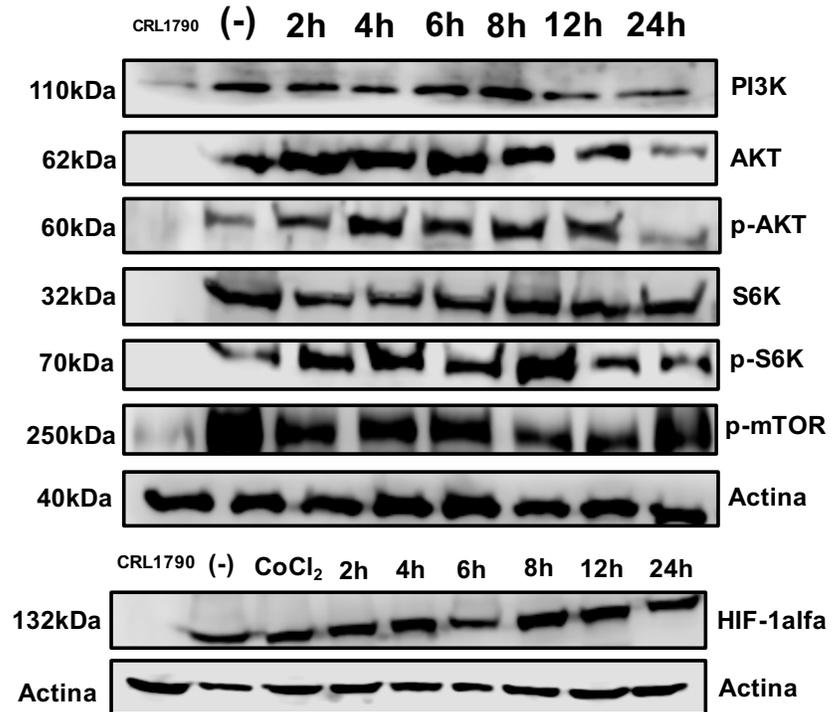
a)

Doxorubicina



b)

Metformina/Oxamato



c)

Doxorrubicina/Metformina/Oxamato

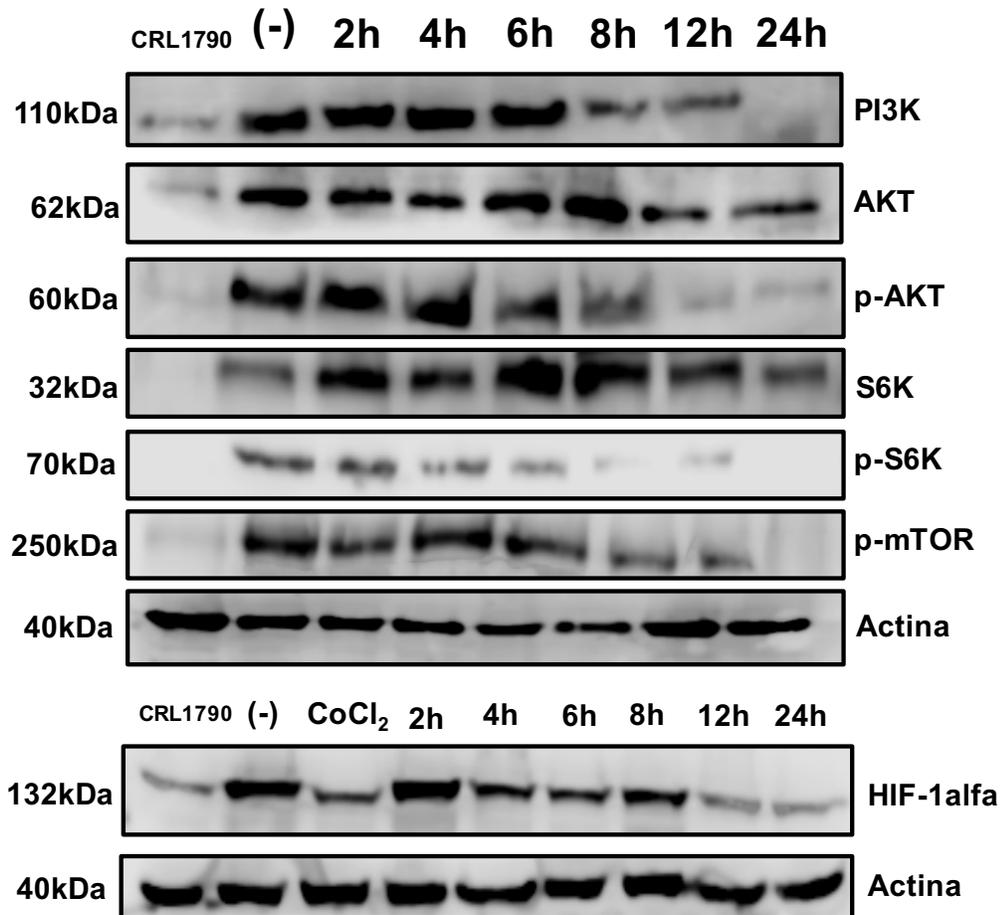
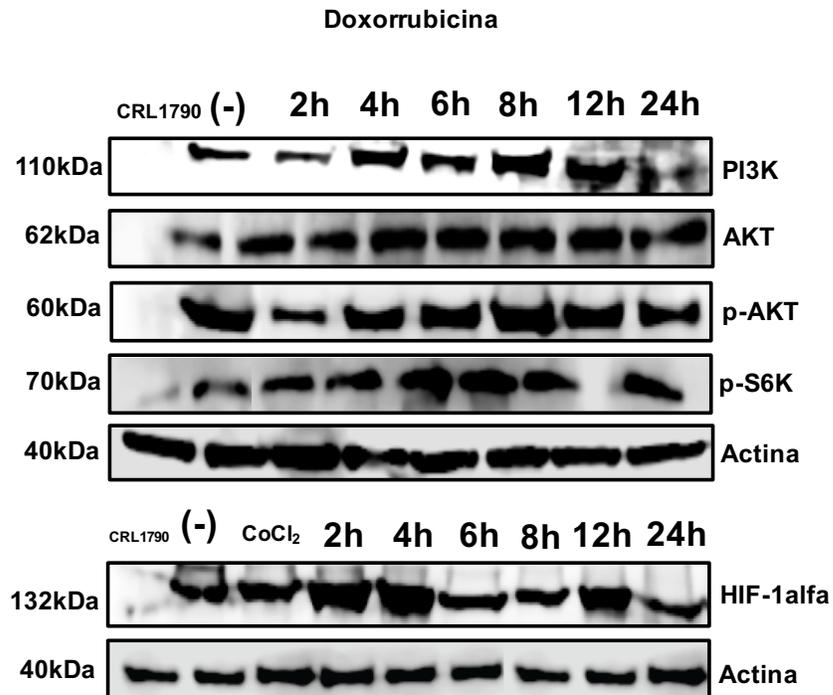


Figura 12. Detección de las proteínas de la vía de señalización de HIF-1 mediante Western Blot a 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas de exposición con a) Doxorubicina, b) Metformina/Oxamato y c) Doxorubicina/Metformina/Oxamato en la línea celular HCT116.

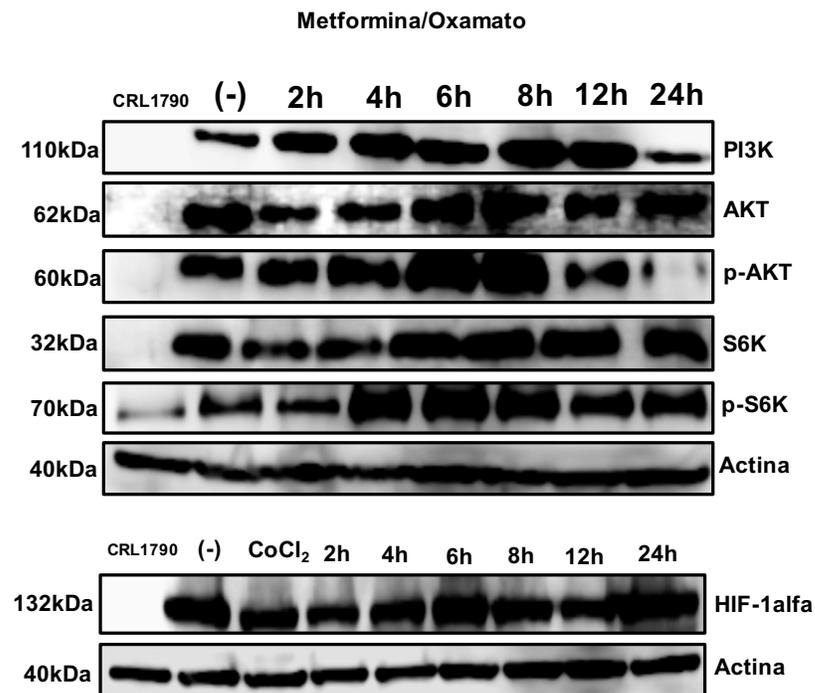
Por otra parte, se decidió trabajar también con otra línea celular altamente metastásica y de una neoplasia diferente para ver si el efecto era el mismo, en este caso se trabajó con la línea celular MDA-MB-231 derivada de CaMa. Y los resultados obtenidos siguieron la misma tendencia que con la línea celular de CCR, observando una disminución significativa de todas las proteínas de la vía con la

triple terapia a comparación con la monoterapia y la combinación de Metformina/Oxamato (Figura13).

a)



b)



c)

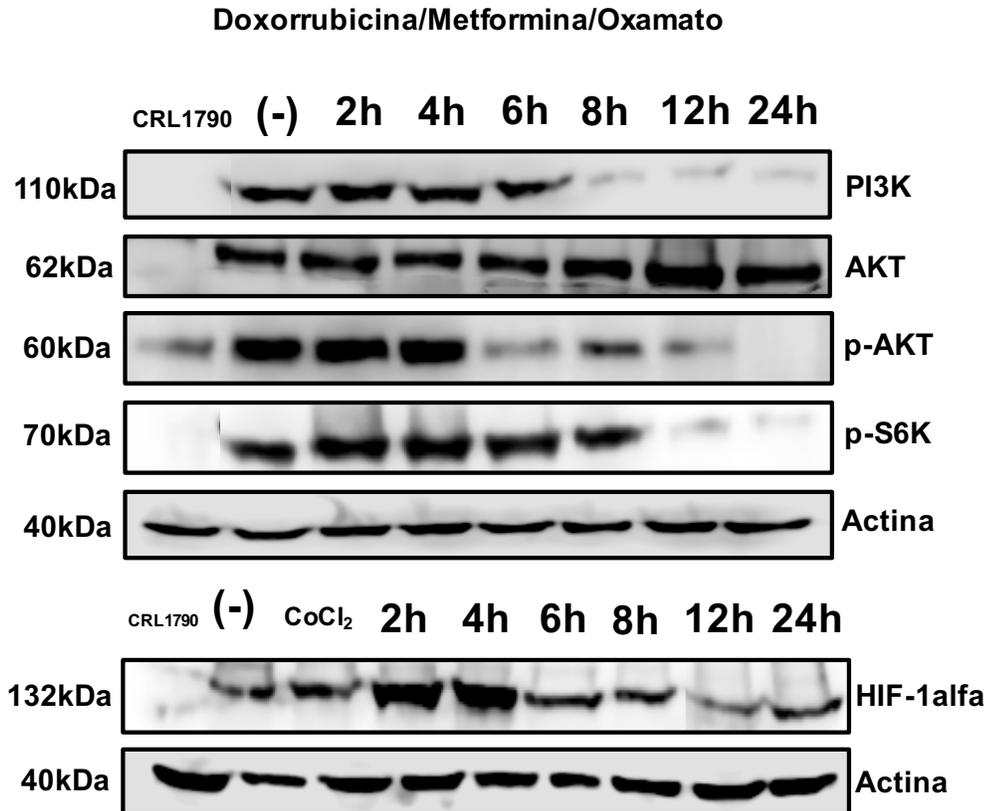


Figura 13. Detección de las proteínas de la vía de señalización de HIF-1 mediante Western Blot a 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas de exposición con a) Doxorrubicina, b) Metformina/Oxamato y c) Doxorrubicina/Metformina/Oxamato en la línea celular MDA-231.

Dado que se vio en HCT116 que mTOR empezaba a disminuir a partir de las 12 horas, se decidió medir esta proteína de gran importancia, reduciendo los intervalos de tiempo para mostrar mucho mas clara la diferencia (Figura 14). Y se observó que con la triple terapia la detección p-mTOR disminuía significativamente a partir de las 12 horas, mientras que con los otros tratamientos no se presentaba cambio alguno.

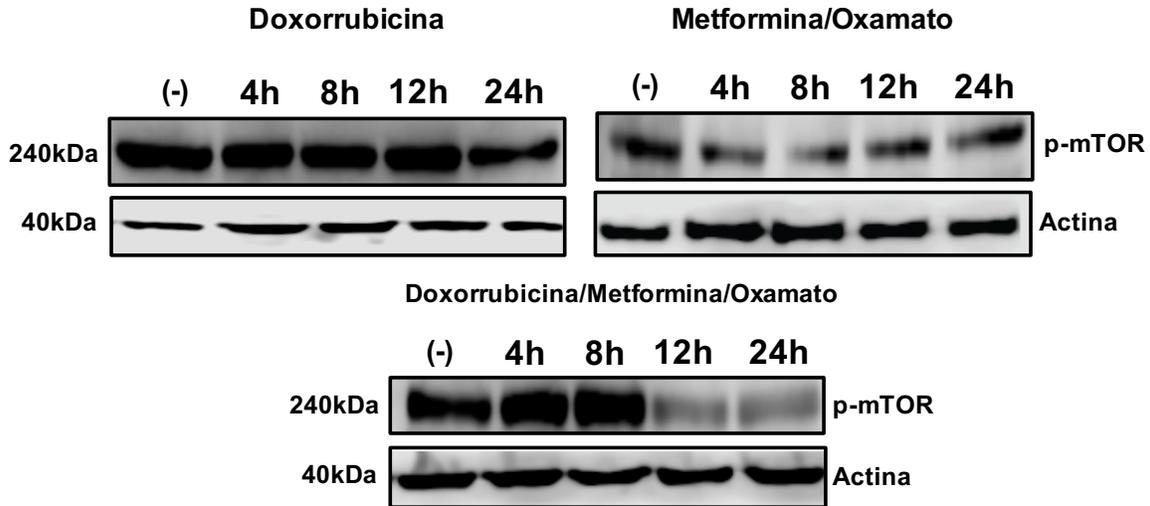


Figura 14. Detección de la proteína p-mTOR mediante Western Blot a 4, 8, 12 y 24 horas de exposición con Doxorubicina, Metformina/Oxamato y Doxorubicina/Metformina/Oxamato en la línea celular MDA-231.

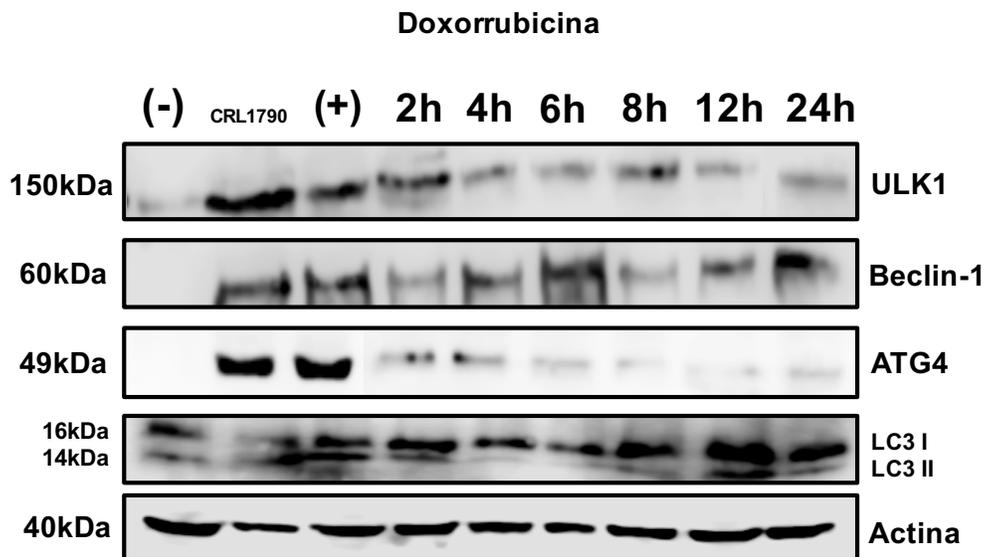
8.2. Detección de proteínas involucradas en la autofagia

En la autofagia existen proteínas esenciales que participan en la inducción y en las diferentes etapas del desarrollo de este proceso, tales como: ULK1, Beclin-1, ATG4 y LC3-I y II. Aparte de que se ha demostrado que la vía de síntesis de HIF-1 alfa al estar desregulada, puede inhibir procesos de muerte celular como apoptosis y autofagia. Por lo tanto, se decidió medir la expresión de estas proteínas con los diferentes tratamientos.

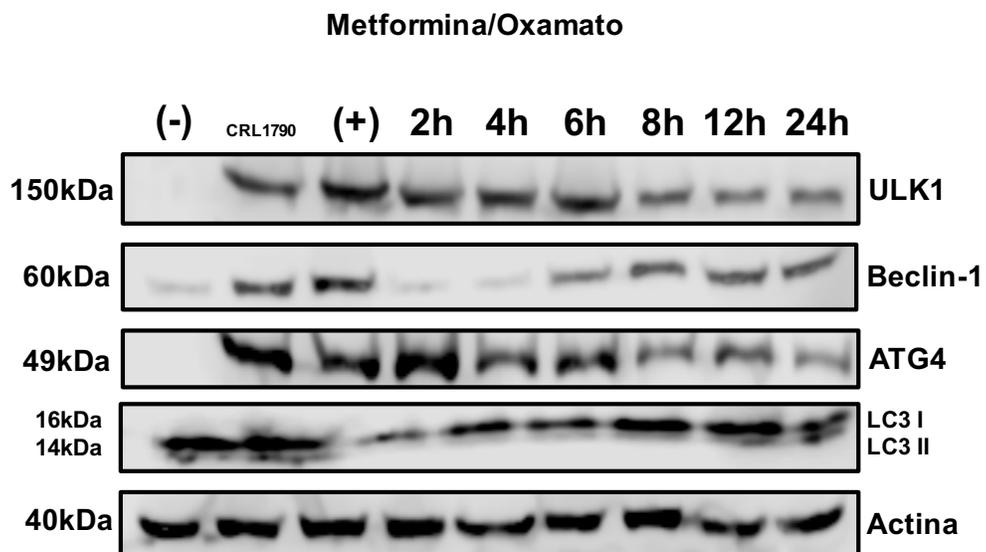
En la figura 15 podemos observar la detección de las principales proteínas involucradas en el proceso de autofagia y como con la monoterapia de Doxorubicina no hay un aumento significativo de estas proteínas, asimismo también podemos ver que con la combinación de Metformina/Oxamato hay un aumento de estas proteínas, pero no lo suficiente como para inducir el proceso de autofagia. Sin embargo, con la combinación de los tres fármacos podemos observar un aumento considerable y significativo de todas estas proteínas. Algo que cabe resaltar, es que en la línea tumoral HCT116 (Control negativo) no hay detección de

estas proteínas, mientras que en las células no tumorales CRL1790 si hay presencia de cada una de ellas. Para corroborar esto, se utilizó rapamicina (Control positivo) para la inducción de la autofagia.

a)



b)



c)

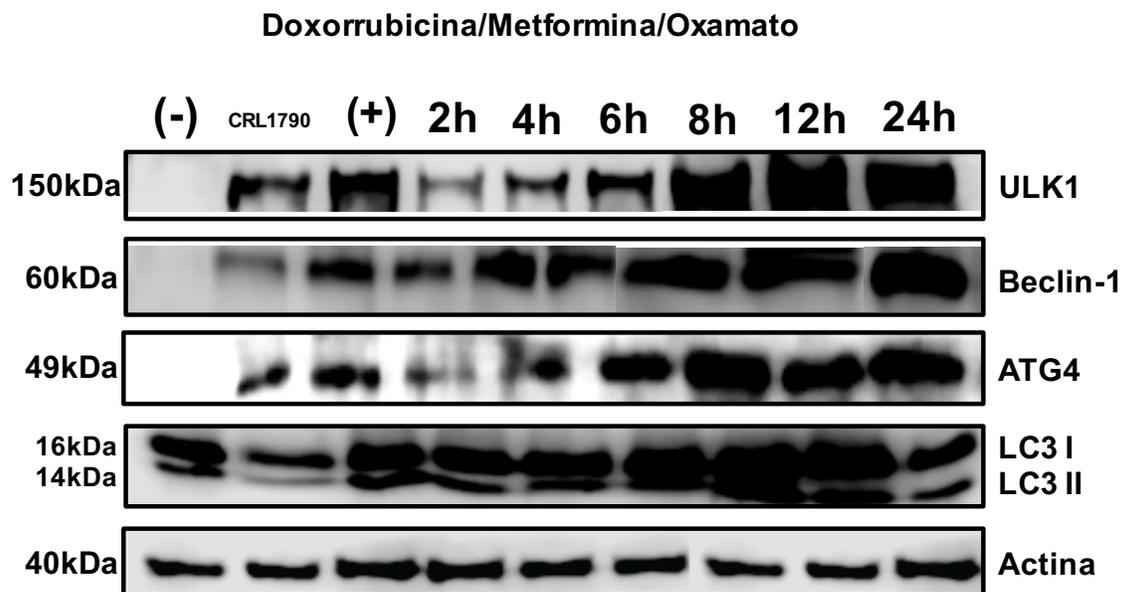
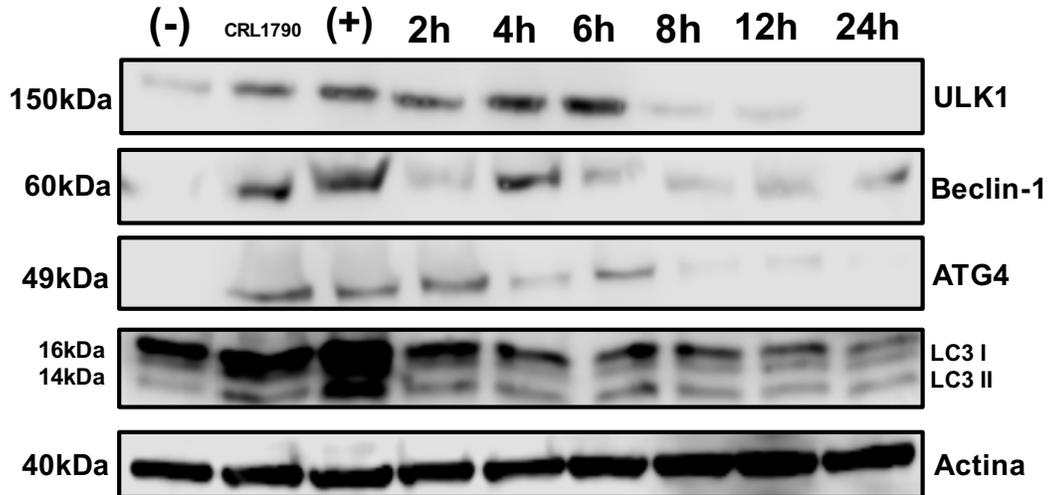


Figura 15. Detección de las proteínas involucradas en el proceso de autofagia mediante Western Blot a 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas de exposición con a) Doxorrubicina, b) Metformina/Oxamato y c) Doxorrubicina/Metformina/Oxamato en la línea celular HCT116.

Del mismo modo, se evaluó la detección de estas mismas proteínas, pero ahora en células tumorales de CaMa con los diferentes tratamientos y tiempos (Figura 16), observando así el mismo patrón con la triple terapia y el aumento de la detección de estas proteínas a comparación de los otros dos tratamientos.

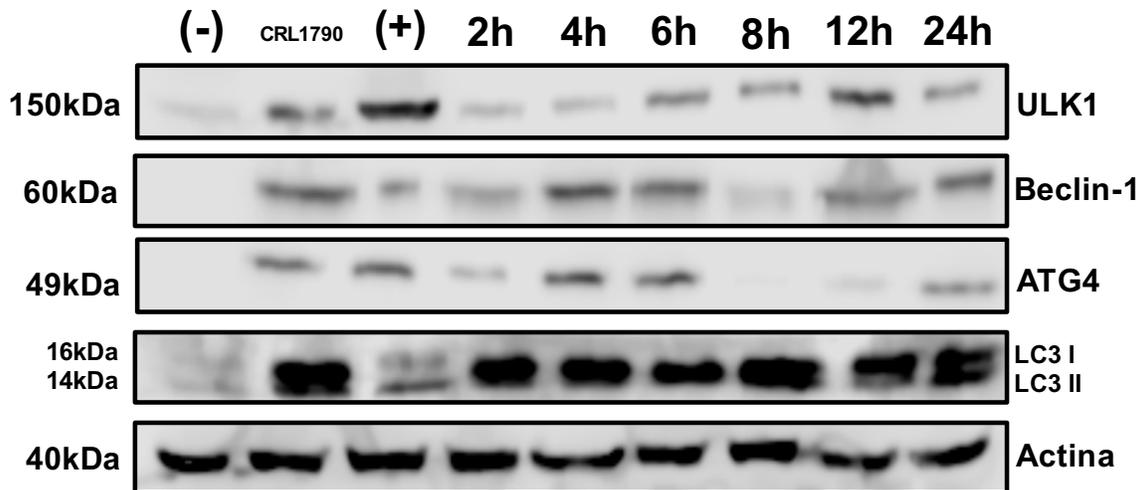
a)

Doxorubicina



b)

Metformina/Oxamato



c)

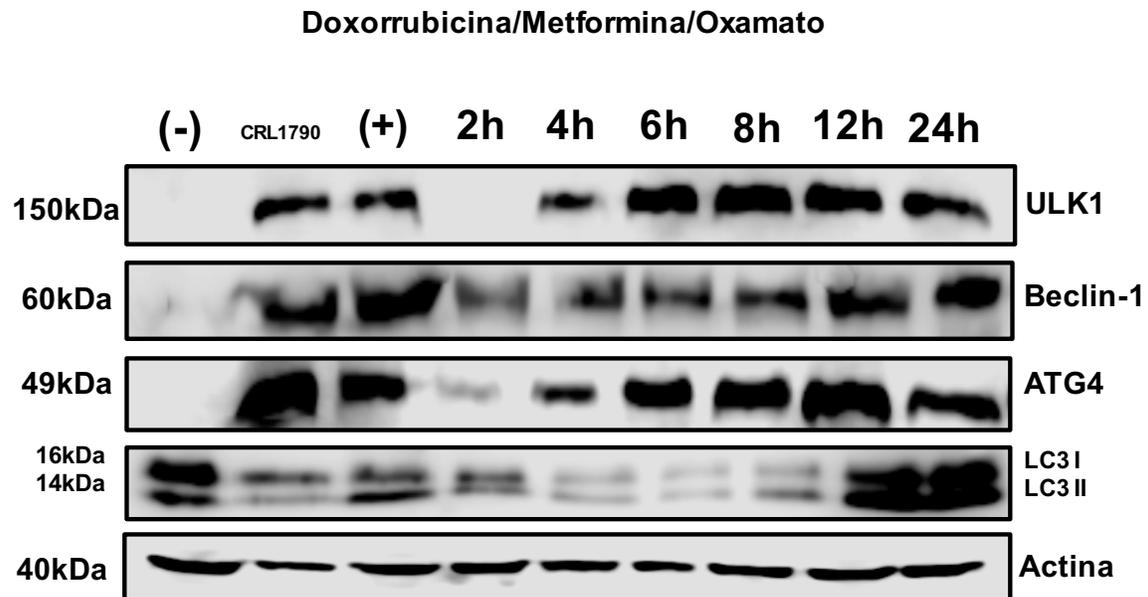


Figura 16. Detección de las proteínas involucradas en el proceso de autofagia mediante Western Blot a 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas de exposición con a) Doxorrubicina, b) Metformina/Oxamato y c) Doxorrubicina/Metformina/Oxamato en la línea celular MDA-231.

8.3. Expresión Relativa de miR-106a involucrado en el proceso de autofagia

Se decidió evaluar la expresión de miR-106a ya que se ha demostrado un vínculo funcional entre la hipoxia y la expresión de microRNAs, sugiriendo que el factor de transcripción HIF-1 probablemente regula diferentes microRNAs involucrados en distintos procesos biológicos, entre ellos miR-106a (Tabla 5), el cual se ha visto que regula la primera etapa de inicio del proceso de autofagia.

Tabla 5. MicroRNAs regulados por HIF-1 en condiciones de hipoxia.

MicroRNA	Symbol	MicroRNA expression ratio in indicated cell line								ANOVA P value
		HT29		HCT116		MCF7		MDA-MB231		
		24 h/0 h	48 h/0 h	24 h/0 h	48 h/0 h	24 h/0 h	48 h/0 h	24 h/0 h	48 h/0 h	
miR-103-1	MIRN103-1	2.33	3.46	1.11	1.71	2.56	1.72	2.38	3.19	0.00228
miR-103-2	MIRN103-2	2.31	2.91	1.22	1.70	2.58	2.07	2.6	3.76	0.00228
miR-106a	MIRN106A	1.76	2.03	1.01	1.41	2.18	1.26	1.84	1.52	0.00241
miR-107	MIRN107	1.94	2.61	1.07	1.75	2.65	1.66	2.76	3.90	0.00231
miR-107	MIRN107	2.04	3.26	1.22	1.86	2.72	1.60	2.47	3.37	0.00228
miR-125b-1	MIRN125B1	1.83	2.07	1.07	1.52	1.71	1.64	1.51	1.13	0.00234
miR-181a-1	MIRN213	2.29	3.02	1.17	1.44	1.61	1.05	1.87	2.24	0.00398
miR-181a-2	MIRN181A	2.01	2.73	1.01	1.44	1.87	1.47	2.13	2.84	0.00241
miR-181b-1	MIRN181B1	2.17	3.38	1.17	1.96	1.97	1.47	1.97	2.66	0.00228
miR-181b-2	MIRN181B2	2.17	3.33	1.04	1.66	1.73	1.28	1.95	1.98	0.00268
miR-181c	MIRN181C	2.74	3.33	1.11	1.48	1.26	1.17	1.6	1.75	0.0083
miR-192	MIRN192	1.75	2.19	1.07	1.30	2.7	1.63	1.33	1.86	0.00262
miR-195	MIRN195	1.45	2.26	1.51	1.51	1.59	1.15	1.17	1.02	0.00622
miR-21	MIRN21	2.81	4.00	1.26	2.09	2.86	1.79	2.28	1.34	0.00242
miR-21	MIRN21	2.62	3.51	1.34	1.92	2.6	1.66	1.71	1.12	0.00231
miR-210	MIRN210	2.92	3.85	2.47	3.73	4.33	3.77	1.45	0.94	0.00241
miR-213-5p	MIRN213	2.14	2.90	1.3	1.10	1.25	1.04	1.64	1.86	0.00961
miR-23a	MIRN23A	2.42	3.73	0.97	2.02	2.5	1.71	2.71	3.41	0.00231
miR-23b	MIRN23B	2.7	3.39	1.05	1.82	1.87	1.45	2.76	3.57	0.00241
miR-24-1-3p	MIRN24-1	2.44	4.09	0.98	1.75	2.22	1.30	2.33	1.52	0.00483
miR-26a	MIRN26A1	1.91	2.87	1.12	1.99	2.06	1.58	2.21	2.04	0.00228
miR-26a-1	MIRN26A1	2.3	3.46	1.14	2.06	2.5	1.88	1.81	1.72	0.00228
miR-26a-2	MIRN26A2	1.94	2.62	1.1	1.57	1.37	1.07	1.54	1.66	0.0046
miR-26b	MIRN26B	2.21	3.24	1.29	2.04	3.23	2.40	2.32	2.96	0.00213
miR-27a	MIRN27A	1.77	2.48	1.13	1.51	2.14	1.65	1.18	1.44	0.00241
miR-30b	MIRN30B	2.74	3.96	1.52	2.11	2.38	1.54	1.5	1.40	0.00234
miR-93-1	MIRN93	1.84	1.79	1.02	1.34	2.18	1.54	1.86	1.56	0.00231

Por lo tanto, se evaluó la expresión relativa de miR-106a en dos líneas celulares no tumorales (CRL1790 para CCR y MCF10A para CaMa) y en las dos líneas tumorales (HCT116 Y MDA-231) en condiciones basales y con los diferentes tratamientos. En las gráficas se puede ver que con Doxorrubicina y Metformina/Oxamato el nivel de expresión de miR-106a se reduce en comparación del control negativo (sin tratamiento). Sin embargo, podemos observar que la expresión de miR-106a con la combinación de los tres fármacos muestra una disminución significativa en comparación con el control negativo; esta disminución es más evidente dependiendo del tiempo de exposición a los fármacos. Asimismo,

se demostró una relación inversa entre el nivel de expresión de miR-106a y su posible gen blanco ULK1, ya que con la triple terapia, la expresión de dicho microRNA disminuye mientras que la detección de ULK1 aumenta (Figura 17).

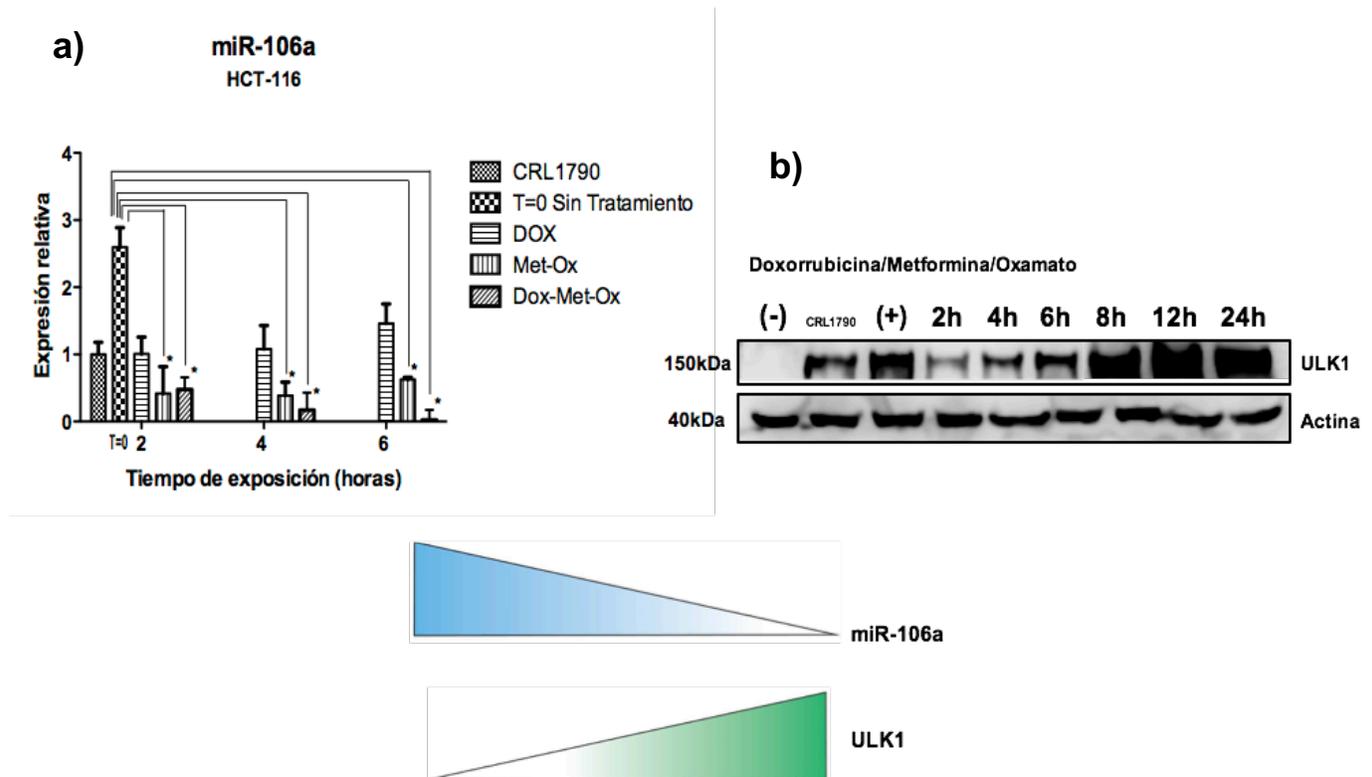


Figura 17. **a)** Expresión relativa de miR-106a a 2, 4 y 6 horas de exposición con Doxorubicina, Metformina/Oxamato y Doxorubicina/Metformina/Oxamato en la línea celular HCT116. (* $p=0.05$). **b)** Western Blot del posible blanco de miR-106a.

Del mismo modo se evaluó la expresión relativa de miR-106a pero ahora en la línea tumoral MDA-231 con la triple terapia, presentando el mismo patrón de disminución de la expresión del miRNA y un aumento en la detección de su posible gen blanco ULK1, (Figura 18).

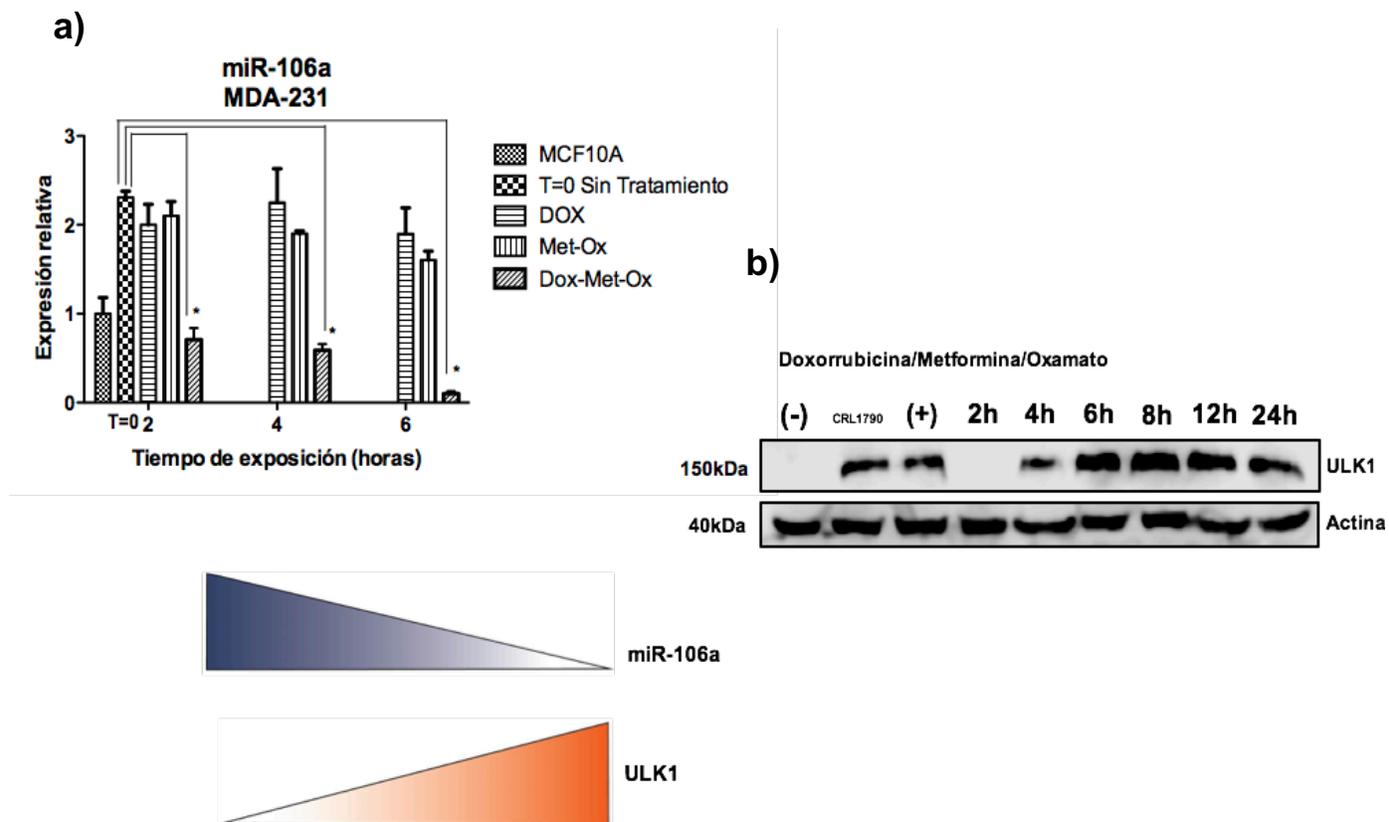


Figura 18. a) Expresión relativa de miR-106a a 2, 4 y 6 horas de exposición con Doxorrubicina, Metformina/Oxamato y Doxorrubicina/Metformina/Oxamato en la línea celular MDA-231. (* $p=0.05$). **b)** Western Blot del posible blanco de miR-106a.

8.4. Validación del blanco de miR-106a mediante ensayo de Luciferasa

Para validar que efectivamente miR-106a tiene como blanco directo a ULK1, se llevó a cabo un ensayo de Luciferasa basado en el estudio de los mecanismos de expresión y regulación génica.

En base a los resultados obtenidos, se corroboró que efectivamente miR-106a tiene como blanco directo a ULK1 a través de su unión a su región 3'UTR. En la figura 19 podemos observar una gráfica de la actividad relativa de luciferasa. Se observó que en presencia del mimic de miR-106a la actividad de luciferasa disminuye significativamente, sin embargo, al transfectar el antimir, la actividad de luciferasa se restablece. Esto significa que hay una regulación directa entre este microRNA y el mRNA de ULK1. Asimismo, se realizó un Western Blot de las células transfectadas con estas condiciones para corroborar que se estuviera dando la represión de la proteína de ULK1, lo cual fue evidente al ver la misma tendencia que se llevó a cabo con el ensayo de luciferasa.

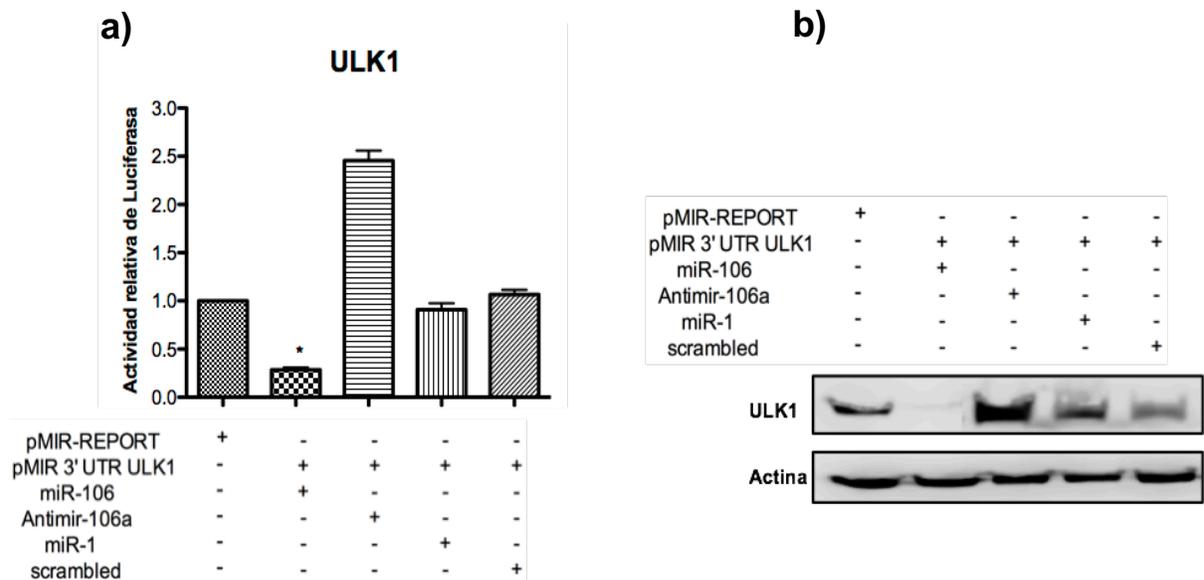


Figura 19. a) Actividad relativa de Luciferasa en células HCT116 transfectadas con las diferentes condiciones que se muestran en la gráfica. B) Western Blot de las células HCT116 transfectadas con las mismas condiciones experimentales.

Del mismo modo, todo este procedimiento se llevó a cabo en la línea tumoral MDA-231, obteniendo resultados similares como con los de la línea tumoral de CCR (Figura 20).

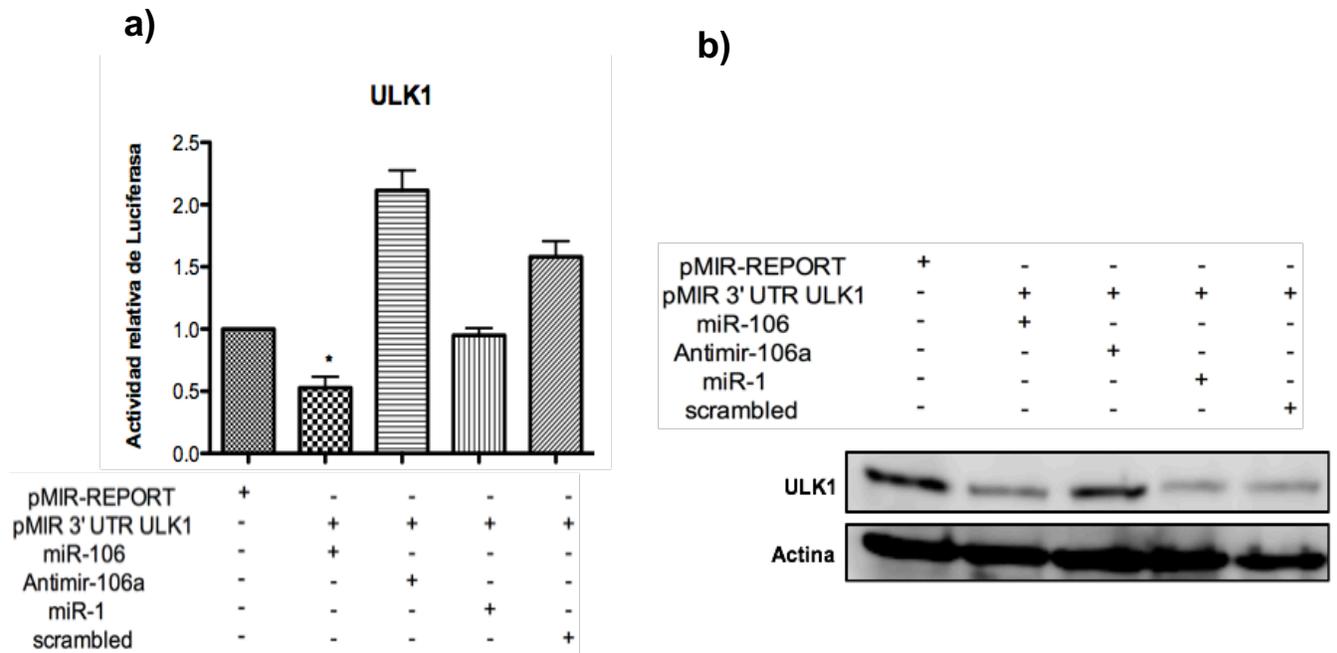


Figura 20. a) Actividad relativa de Luciferasa en células MDA-231 transfectadas con las diferentes condiciones que se muestran en la gráfica. b) Western Blot de las células MDA-231 transfectadas con las mismas condiciones experimentales.

9. DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó la participación de HIF-1 y los sustratos río arriba de la vía de señalización PI3K/AKT que sintetizan este factor de transcripción y que participa en la regulación de un proceso de muerte celular denominado autofagia, el cual fue inducido por la combinación de 3 fármacos (Doxorrubicina, Metformina y Oxamato de sodio).

Los resultados mostraron que la combinación farmacológica aquí propuesta inhibe proteínas esenciales que forman parte de la vía de PI3K / AKT/ HIF-1 la cual es activada en la mayoría de los cánceres humanos. Asimismo, esta vía es conocida por desempeñar un papel clave en numerosas funciones celulares incluyendo proliferación, adhesión, migración, invasión, metabolismo y supervivencia, por lo que el bloqueo de esta vía con esta novedosa triple terapia es de suma importancia para las futuras terapias contra el cáncer. Por lo tanto, la inhibición de la vía de PI3K y por tanto la síntesis de HIF-1 alfa es debido al mecanismo de acción de los diferentes fármacos evaluados en combinación.

La metformina en sinergia con los otros dos fármacos indujo autofagia debido a que actúa sobre la vía AMPK/mTOR, este fármaco ejerce su función inhibiendo al complejo 1 de la mitocondria, lo que conlleva a una activación de la proteína AMPK la cual va a impedir la fosforilación del complejo mTOR y por ende ULK1 va a llevar a cabo la inducción de la autofagia (Cerezo et al, 2014). Es importante mencionar que la metformina es un hipoglucemiante que reduce los niveles de glucosa en la sangre lo que conlleva a la inhibición de factores de transcripción como EIF4E y

provoca la disminución de la tasa metabólica. Por otra parte, el efecto del Oxamato de Sodio se le atribuye a que tiene la función de inhibir la lactato deshidrogenasa (LDH-A), una enzima esencial en el proceso de glucólisis, mediante la unión al sitio activo de la LDH-A lo que impide la unión del piruvato y su conversión a lactato en el citosol, impidiendo la acidosis láctica que es un fenómeno común en el microambiente tumoral y se relaciona con la proliferación celular, metástasis, y la inhibición de la respuesta inmune contra las células del cáncer (Zhou et al., 2014). Por lo tanto, una vez que se deja de producir lactato, las células de cáncer entran en un estado de estrés celular al no poder tomar nutrientes del medio lo que resulta en la muerte celular por autofagia debido al déficit de nutrientes. Y por último, la Doxorrubicina que es un quimioterapéutico convencional el cual es un intercalante del DNA y a su vez inhibe la biosíntesis de ácidos nucleicos produciendo muerte celular. Entonces, al actuar en conjunto, los fármacos inhibieron las proteínas de la vía de HIF-1 alfa, ocasionando así la inducción de la autofagia mediante la inhibición de este factor de transcripción que es el que regula negativamente a ULK1. Los resultados mostraron que la combinación de estos fármacos es necesaria para inhibir así el crecimiento de células tumorales y metástasis a través de la inhibición de HIF1 α y de sus componentes río arriba. La monoterapia de base que es la Doxorrubicina y la combinación de Metformina/Oxamato de sodio no produjeron cambio alguno en la detección de estas proteínas y por lo tanto no se encontró un aumento en la detección de proteínas esenciales en la autofagia, en contraste con lo obtenido con la triple terapia: una disminución en las proteínas de la vía de señalización de HIF-1 y a su vez un aumento en la detección de proteínas involucradas en la autofagia.

Posiblemente, una vez inhibida la vía de señalización de PI3K / AKT/ HIF-1, ya no hay inhibición del principal inductor de la autofagia, ULK1, y por lo tanto puede llevarse a cabo el proceso de muerte celular por autofagia (R. C. Wang et al., 2012). Esto es importante, ya que sugiere que la inhibición dirigida de esta vía perjudicaría a las células malignas y relativamente a las células sanas, por lo que la inhibición de ciertos componentes de la vía PI3K / Akt / mTOR puede detener el crecimiento de células tumorales o sensibilizar a las células cancerosas a la quimioterapia.

Posteriormente, se evaluó un microRNA (miR-106a) que está involucrado en la autofagia y que posiblemente este sujeto a regulación por parte del factor de transcripción HIF-1. Se ha demostrado que los microRNAs regulan diferentes funciones críticas en muchos procesos celulares y fisiológicos, así como también se conoce que existe un vínculo funcional entre la hipoxia y los microRNAs, ya que se sabe que la hipoxia es una característica esencial del microambiente neoplásico (Chen & Sang, 2016). Por lo tanto, que HIF-1 pudiera regular un panel de microRNAs nos llevó a medir los niveles de expresión de miR-106a en las dos líneas celulares tumorales para conocer el efecto. Los resultados obtenidos nos muestran que los niveles de expresión de este miRNA en células HCT116 y MDA-231 en condiciones basales (sin tratamiento) presentan niveles altos. Esto puede deberse a que en el proceso de autofagia miR-106a juega un papel importante como oncogen inhibiendo a una proteína esencial (ULK1) involucrada en la inducción del proceso de autofagia (Fu et al., 2012). Por lo tanto, estos niveles de expresión elevados pueden atribuirse a que las células en condiciones normales expresan estos genes y por lo tanto no se lleva un proceso de autofagia. Por otra parte, de

los diferentes tratamientos farmacológicos, podemos observar que únicamente la triple terapia disminuye significativamente el nivel de expresión de este microRNA, de una forma tiempo dependiente. Esto se le puede atribuir al efecto de este sobre las diferentes vías de señalización (AMPK/mTOR, glucólisis) que inhiben proteínas involucradas en procesos como proliferación, diferenciación y metástasis bloqueando así los procesos de muerte celular que también están regulados por microRNAs, por lo tanto una vez que inhibimos dichas proteínas con los fármacos puede darse muerte celular por autofagia lo que resulta en una disminución de este microRNA involucrado en este proceso. Posiblemente la disminución de este microRNA sea el primer paso seguido de la inducción de la autofagia dada por la activación de proteínas esenciales en este proceso como resultado de la disminución del miRNA. Dicha hipótesis se sustenta con lo mostrado en el 2012 por Blandino et al quienes mostraron que la modulación de miRNAs podría ser parte del mecanismo de acción de la metformina, debido a que este fármaco induce la expresión de DICER influyendo directamente en la biosíntesis de los microRNAs. Por lo que se sugiere que se está llevando a cabo un mecanismo similar con la combinación de los tres fármacos, es decir, existe una inhibición del microRNA el cual inhibe proteínas inductoras de autofagia, por lo tanto, al estar inhibido este miRNA, ya no existe inhibición de las proteínas inductoras de la autofagia y así se puede llevar a cabo este proceso.

Cabe resaltar, es que la disminución de la expresión de miR-106a pueda deberse a su vez a la inhibición del factor de transcripción HIF-1 alfa, ya que se ha visto que en condiciones de hipoxia, HIF-1 es capaz de regular un panel de microRNAs

involucrados en diferentes procesos de la biología de la célula tumoral, entre ellos, procesos de muerte celular como la autofagia. Por lo tanto, la disminución de la expresión de miR-106a y el aumento en la detección de su posible proteína blanco ULK1 con la exposición a la triple terapia, pueda deberse primero que nada a la inhibición de la vía PI3K/AKT, la cual es la responsable de la síntesis de HIF-1 alfa (Masoud & Li, 2015). Por lo que una vez inhibida esta vía, ya no se puede llevar a cabo la síntesis de HIF-1 alfa y por lo tanto no hay quien regule a miR-106a. Lo que ocasiona que no haya inhibición de la principal proteína inductora de autofagia ULK1, por lo que se puede llevar a cabo este proceso de muerte celular.

Los resultados obtenidos con el ensayo de luciferasa mostraron que miR-106a se une a la región 3'UTR del mRNA de ULK1, estos hallazgos nos indican que ULK1 se encuentra bajo regulación directa por parte de miR-106a, inhibiendo así su función de inducir el proceso de autofagia. Sin embargo, cuando ponemos el antimir-106a, la función de ULK1 se restablece, indicando la inducción del proceso de autofagia.

Se sabe que en la mayoría de los casos la monoterapia en cáncer puede desarrollar quimioresistencia en la mayoría de los pacientes, por lo que actualmente se están desarrollando terapias usando combinaciones de fármacos inhibidores que participen en diferentes vías de señalización que están mutadas en el cáncer e involucradas en procesos biológicos como apoptosis y autofagia, como los fármacos propuestos en este proyecto de tesis.

Asimismo, a pesar de que se han publicado una serie de estudios sobre la hipoxia y el cáncer humano, la regulación fisiológica y fisiopatológica de la hipoxia aún es poco conocida. Por lo que la investigación sobre los microRNAs promete abrir un panorama sobre el mecanismo que subyace en la regulación de la hipoxia, por dos razones. En primer lugar, los microRNAs pueden responder rápidamente al estrés causado por la hipoxia mediante la modulación post-transcripcional / traduccional a nivel celular. Y, en segundo lugar, son capaces de regular de numerosos genes que influyen en múltiples componentes de una vía de señalización de forma simultánea. Es importante entender la base y la función reguladora de estos microRNAs en respuesta a la hipoxia, así como desarrollar nuevos fármacos terapéuticos y preventivos que se dirijan a estos microRNAs regulados en condiciones de hipoxia (Rachagani et al., 2015).

Finalmente, cabe resaltar que no se conocen a fondo los factores que intervengan en la regulación de la expresión de diferentes microRNAs, tal es el caso de miR-106a, del cual solamente se sabe que posiblemente pueda estar siendo regulado por HIF-1, sin embargo, aun no se ha validado dicha hipótesis. Por lo tanto, es sumamente importante analizar el mecanismo de regulación entre este factor de transcripción y los microRNAs, lo que nos llevaría a proponer redes complejas de regulación entre genes muy importantes que afecten al inicio y progresión del cáncer.

10. Conclusiones

- 1) Se comprobó que la terapia combinatoria farmacológica de Doxorubicina/Metformina/Oxamato de sodio disminuye la detección de proteínas esenciales de la vía de síntesis de HIF-1 alfa, induciendo muerte celular por autofagia al aumentar la detección de las proteínas inductoras de este proceso.
- 2) Se conoció el nivel de expresión de miR-106a involucrado en el proceso de autofagia con la triple terapia a los diferentes tiempos de exposición, resultando en la disminución de los niveles de expresión, lo que sugiere una gran importancia de estas moléculas como marcadores moleculares en la autofagia para un posible diagnóstico y pronóstico temprano. Asi como tambien, se vio que miR-106a posiblemente este siendo regulado por HIF-1.
- 3) Se comprobó que miR-106a regula directamente a ULK1 a través de su unión a la región 3'UTR de este mRNA. Lo que demuestra que esta proteína es blanco directo de miR-106a.

11. Bibliografía

- Abdel-Rahman, W. M., Lotsari-Salomaa, J. E., Kaur, S., Niskakoski, A., Knuutila, S., Jarvinen, H., . . . Peltomaki, P. (2016). The Role of Chromosomal Instability and Epigenetics in Colorectal Cancers Lacking beta-Catenin/TCF Regulated Transcription. *Gastroenterol Res Pract*, 2016, 6089658. doi:10.1155/2016/6089658
- Agani, F., & Jiang, B. H. (2013). Oxygen-independent regulation of HIF-1: novel involvement of PI3K/AKT/mTOR pathway in cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, 13(3), 245-251.
- Aparicio, I. M., Espino, J., Bejarano, I., Gallardo-Soler, A., Campo, M. L., Salido, G. M., . . . Tapia, J. A. (2016). Autophagy-related proteins are functionally active

- in human spermatozoa and may be involved in the regulation of cell survival and motility. *Sci Rep*, 6, 33647. doi:10.1038/srep33647
- Ben-Hamo, R., & Efroni, S. (2015). MicroRNA regulation of molecular pathways as a generic mechanism and as a core disease phenotype. *Oncotarget*, 6(3), 1594-1604. doi:10.18632/oncotarget.2734
- Bhaskar, A., & Tiwary, B. N. (2016). Hypoxia inducible factor-1 alpha and multiple myeloma. *Int J Adv Res (Indore)*, 4(1), 706-715.
- Chae, Y. K., Arya, A., Malecek, M. K., Shin, D. S., Carneiro, B., Chandra, S., . . . Giles, F. (2016). Repurposing metformin for cancer treatment: current clinical studies. *Oncotarget*, 7(26), 40767-40780. doi:10.18632/oncotarget.8194
- Chen, S., & Sang, N. (2016). Hypoxia-Inducible Factor-1: A Critical Player in the Survival Strategy of Stressed Cells. *J Cell Biochem*, 117(2), 267-278. doi:10.1002/jcb.25283
- DePeralta, D. K., Wei, L., Ghoshal, S., Schmidt, B., Lauwers, G. Y., Lanuti, M., . . . Fuchs, B. C. (2016). Metformin prevents hepatocellular carcinoma development by suppressing hepatic progenitor cell activation in a rat model of cirrhosis. *Cancer*, 122(8), 1216-1227. doi:10.1002/cncr.29912
- Divolis, G., Mavroeydi, P., Mavrofydy, O., & Papazafiri, P. (2016). Differential effects of calcium on PI3K-Akt and HIF-1alpha survival pathways. *Cell Biol Toxicol*, 32(5), 437-449. doi:10.1007/s10565-016-9345-x
- Durso, D. F., Bacalini, M. G., do Valle, I. F., Pirazzini, C., Bonafe, M., Castellani, G., . . . Nardini, C. (2017). Aberrant methylation patterns in colorectal cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*, 8(8), 12820-12830. doi:10.18632/oncotarget.14590
- Farmer, R. E., Ford, D., Forbes, H. J., Chaturvedi, N., Kaplan, R., Smeeth, L., & Bhaskaran, K. (2017). Metformin and cancer in type 2 diabetes: a systematic review and comprehensive bias evaluation. *Int J Epidemiol*, 46(2), 745. doi:10.1093/ije/dyx046
- Fu, L. L., Wen, X., Bao, J. K., & Liu, B. (2012). MicroRNA-modulated autophagic signaling networks in cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 44(5), 733-736. doi:10.1016/j.biocel.2012.02.004

- Fujiwara, N., Usui, T., Ohama, T., & Sato, K. (2016). Regulation of Beclin 1 Protein Phosphorylation and Autophagy by Protein Phosphatase 2A (PP2A) and Death-associated Protein Kinase 3 (DAPK3). *J Biol Chem*, *291*(20), 10858-10866. doi:10.1074/jbc.M115.704908
- Gelsomino, F., Barbolini, M., Spallanzani, A., Pugliese, G., & Cascinu, S. (2016). The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. *Cancer Treat Rev*, *51*, 19-26. doi:10.1016/j.ctrv.2016.10.005
- Gomez-Sanchez, R., Yakhine-Diop, S. M., Rodriguez-Arribas, M., Bravo-San Pedro, J. M., Martinez-Chacon, G., Uribe-Carretero, E., . . . Gonzalez-Polo, R. A. (2016). mRNA and protein dataset of autophagy markers (LC3 and p62) in several cell lines. *Data Brief*, *7*, 641-647. doi:10.1016/j.dib.2016.02.085
- Grant, M. K., Seelig, D. M., Sharkey, L. C., & Zordoky, B. N. (2017). Sex-dependent alteration of cardiac cytochrome P450 gene expression by doxorubicin in C57Bl/6 mice. *Biol Sex Differ*, *8*, 1. doi:10.1186/s13293-016-0124-4
- Gulyaeva, L. F., & Kushlinskiy, N. E. (2016). Regulatory mechanisms of microRNA expression. *J Transl Med*, *14*(1), 143. doi:10.1186/s12967-016-0893-x
- Guo, B., Tam, A., Santi, S. A., & Parissenti, A. M. (2016). Role of autophagy and lysosomal drug sequestration in acquired resistance to doxorubicin in MCF-7 cells. *BMC Cancer*, *16*(1), 762. doi:10.1186/s12885-016-2790-3
- Gurtner, A., Falcone, E., Garibaldi, F., & Piaggio, G. (2016). Dysregulation of microRNA biogenesis in cancer: the impact of mutant p53 on Drosha complex activity. *J Exp Clin Cancer Res*, *35*, 45. doi:10.1186/s13046-016-0319-x
- Han, C., Yang, B., Zuo, W. S., Zheng, G., Yang, L., & Zheng, M. Z. (2016). The Feasibility and Oncological Safety of Axillary Reverse Mapping in Patients with Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. *PLoS One*, *11*(2), e0150285. doi:10.1371/journal.pone.0150285
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Harada, H. (2016). Hypoxia-inducible factor 1-mediated characteristic features of cancer cells for tumor radioresistance. *J Radiat Res*, *57 Suppl 1*, i99-i105. doi:10.1093/jrr/rrw012

- Heart, E. A., Karandrea, S., Liang, X., Balke, M. E., Beringer, P. A., Bobczynski, E. M., . . . Gray, J. P. (2016). Mechanisms of Doxorubicin Toxicity in Pancreatic beta-Cells. *Toxicol Sci*, *152*(2), 395-405. doi:10.1093/toxsci/kfw096
- Henderson, L. M., Miglioretti, D. L., Kerlikowske, K., Wernli, K. J., Sprague, B. L., & Lehman, C. D. (2015). Breast Cancer Characteristics Associated With Digital Versus Film-Screen Mammography for Screen-Detected and Interval Cancers. *AJR Am J Roentgenol*, *205*(3), 676-684. doi:10.2214/AJR.14.13904
- Holm, J., Li, J., Darabi, H., Eklund, M., Eriksson, M., Humphreys, K., . . . Czene, K. (2016). Associations of Breast Cancer Risk Prediction Tools With Tumor Characteristics and Metastasis. *J Clin Oncol*, *34*(3), 251-258. doi:10.1200/JCO.2015.63.0624
- Jezequel, P., Loussouarn, D., Guerin-Charbonnel, C., Champion, L., Vanier, A., Gouraud, W., . . . Campone, M. (2015). Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: importance of immune response. *Breast Cancer Res*, *17*, 43. doi:10.1186/s13058-015-0550-y
- Ji, W., Sun, B., & Su, C. (2017). Targeting MicroRNAs in Cancer Gene Therapy. *Genes (Basel)*, *8*(1). doi:10.3390/genes8010021
- Kala, R., Peek, G. W., Hardy, T. M., & Tollefsbol, T. O. (2013). MicroRNAs: an emerging science in cancer epigenetics. *J Clin Bioinforma*, *3*(1), 6. doi:10.1186/2043-9113-3-6
- Kaminska, M., Ciszewski, T., Lopacka-Szatan, K., Miotla, P., & Staroslawska, E. (2015). Breast cancer risk factors. *Prz Menopauzalny*, *14*(3), 196-202. doi:10.5114/pm.2015.54346
- Karanasios, E., Walker, S. A., Okkenhaug, H., Manifava, M., Hummel, E., Zimmermann, H., . . . Ktistakis, N. T. (2016). Autophagy initiation by ULK complex assembly on ER tubulovesicular regions marked by ATG9 vesicles. *Nat Commun*, *7*, 12420. doi:10.1038/ncomms12420
- Kim, C. G., Ahn, J. B., Jung, M., Beom, S. H., Kim, C., Kim, J. H., . . . Shin, S. J. (2016). Effects of microsatellite instability on recurrence patterns and outcomes in colorectal cancers. *Br J Cancer*, *115*(1), 25-33. doi:10.1038/bjc.2016.161

- Kim, Y. C., & Guan, K. L. (2015). mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest*, 125(1), 25-32. doi:10.1172/JCI73939
- Lee, S. Y., Park, M. J., Lee, H. K., Son, H. J., Kim, C. N., Kim, J. H., & Kang, D. W. (2017). Increased Expression of Thymosin beta4 Is Independently Correlated with Hypoxia Inducible Factor-1alpha (HIF-1alpha) and Worse Clinical Outcome in Human Colorectal Cancer. *J Pathol Transl Med*, 51(1), 9-16. doi:10.4132/jptm.2016.08.23
- Lee, Y. K., & Lee, J. A. (2016). Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *BMB Rep*, 49(8), 424-430.
- Lei, W., He, Y., Shui, X., Li, G., Yan, G., Zhang, Y., . . . Ding, Y. (2016). Expression and analyses of the HIF-1 pathway in the lungs of humans with pulmonary arterial hypertension. *Mol Med Rep*, 14(5), 4383-4390. doi:10.3892/mmr.2016.5752
- Lei, Y., Yi, Y., Liu, Y., Liu, X., Keller, E. T., Qian, C. N., . . . Lu, Y. (2017). Metformin targets multiple signaling pathways in cancer. *Chin J Cancer*, 36(1), 17. doi:10.1186/s40880-017-0184-9
- Levine, B., & Klionsky, D. J. (2017). Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine: Breakthroughs in baker's yeast fuel advances in biomedical research. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(2), 201-205. doi:10.1073/pnas.1619876114
- Li, G., Shan, C., Liu, L., Zhou, T., Zhou, J., Hu, X., . . . Gao, N. (2015). Tanshinone IIA inhibits HIF-1alpha and VEGF expression in breast cancer cells via mTOR/p70S6K/RPS6/4E-BP1 signaling pathway. *PLoS One*, 10(2), e0117440. doi:10.1371/journal.pone.0117440
- Lim, H. J., Wang, X., Crowe, P., Goldstein, D., & Yang, J. L. (2016). Targeting the PI3K/PTEN/AKT/mTOR Pathway in Treatment of Sarcoma Cell Lines. *Anticancer Res*, 36(11), 5765-5771. doi:10.21873/anticancer.11160
- Liu, J., Wei, Q., Guo, C., Dong, G., Liu, Y., Tang, C., & Dong, Z. (2017). Hypoxia, HIF, and Associated Signaling Networks in Chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci*, 18(5). doi:10.3390/ijms18050950

- Lu, Q. Y., Zhang, L., Yee, J. K., Go, V. W., & Lee, W. N. (2015). Metabolic Consequences of LDHA inhibition by Epigallocatechin Gallate and Oxamate in MIA PaCa-2 Pancreatic Cancer Cells. *Metabolomics*, 11(1), 71-80. doi:10.1007/s11306-014-0672-8
- Masoud, G. N., & Li, W. (2015). HIF-1alpha pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*, 5(5), 378-389. doi:10.1016/j.apsb.2015.05.007
- Mehrgou, A., & Akouchekian, M. (2016). The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development. *Med J Islam Repub Iran*, 30, 369.
- Meredith, A. M., & Dass, C. R. (2016). Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *J Pharm Pharmacol*, 68(6), 729-741. doi:10.1111/jphp.12539
- Miskimins, W. K., Ahn, H. J., Kim, J. Y., Ryu, S., Jung, Y. S., & Choi, J. Y. (2014). Synergistic anti-cancer effect of phenformin and oxamate. *PLoS One*, 9(1), e85576. doi:10.1371/journal.pone.0085576
- Murat Dogan, S., Pinar Ercetin, A., Altun, Z., Dursun, D., & Aktas, S. (2015). Gene expression characteristics of breast cancer stem cells. *J BUON*, 20(5), 1304-1313.
- Okugawa, Y., Grady, W. M., & Goel, A. (2015). Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers. *Gastroenterology*, 149(5), 1204-1225 e1212. doi:10.1053/j.gastro.2015.07.011
- Perou, C. M. (2010). Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist*, 15 Suppl 5, 39-48. doi:10.1634/theoncologist.2010-S5-39
- Ponpuak, M., Mandell, M. A., Kimura, T., Chauhan, S., Cleyrat, C., & Deretic, V. (2015). Secretory autophagy. *Curr Opin Cell Biol*, 35, 106-116. doi:10.1016/j.ceb.2015.04.016
- Rachagani, S., Macha, M. A., Menning, M. S., Dey, P., Pai, P., Smith, L. M., . . . Batra, S. K. (2015). Changes in microRNA (miRNA) expression during pancreatic cancer development and progression in a genetically engineered

- KrasG12D;Pdx1-Cre mouse (KC) model. *Oncotarget*, 6(37), 40295-40309. doi:10.18632/oncotarget.5641
- Reddy, K. B. (2015). MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer Cell Int*, 15, 38. doi:10.1186/s12935-015-0185-1
- Rhee, Y. Y., Kim, K. J., & Kang, G. H. (2017). CpG Island Methylator Phenotype-High Colorectal Cancers and Their Prognostic Implications and Relationships with the Serrated Neoplasia Pathway. *Gut Liver*, 11(1), 38-46. doi:10.5009/gnl15535
- Riquelme, I., Tapia, O., Espinoza, J. A., Leal, P., Buchegger, K., Sandoval, A., . . . Roa, J. C. (2016). The Gene Expression Status of the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Gastric Cancer Tissues and Cell Lines. *Pathol Oncol Res*, 22(4), 797-805. doi:10.1007/s12253-016-0066-5
- Robinson, P., Kasembeli, M., Bharadwaj, U., Engineer, N., Eckols, K. T., & Tweardy, D. J. (2016). Substance P Receptor Signaling Mediates Doxorubicin-Induced Cardiomyocyte Apoptosis and Triple-Negative Breast Cancer Chemoresistance. *Biomed Res Int*, 2016, 1959270. doi:10.1155/2016/1959270
- Rohatgi, R. A., & Shaw, L. M. (2016). An autophagy-independent function for Beclin 1 in cancer. *Mol Cell Oncol*, 3(1). doi:10.1080/23723556.2015.1030539
- Sakai, E., Fukuyo, M., Ohata, K., Matsusaka, K., Doi, N., Mano, Y., . . . Kaneda, A. (2016). Genetic and epigenetic aberrations occurring in colorectal tumors associated with serrated pathway. *Int J Cancer*, 138(7), 1634-1644. doi:10.1002/ijc.29903
- Sameer, A. S., & Nissar, S. (2016). Epigenetics in diagnosis of colorectal cancer. *Mol Biol Res Commun*, 5(1), 49-57.
- Sanchez-Barriga, J. J. (2017). Mortality trends and risk of dying from colorectal cancer in the seven socioeconomic regions of Mexico, 2000-2012. *Rev Gastroenterol Mex*, 82(3), 217-225. doi:10.1016/j.rgmex.2016.10.005
- Schlafli, A. M., Adams, O., Galvan, J. A., Gugger, M., Savic, S., Bubendorf, L., . . . Berezowska, S. (2016). Prognostic value of the autophagy markers LC3 and

- p62/SQSTM1 in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 7(26), 39544-39555. doi:10.18632/oncotarget.9647
- Shen, G., Li, X., Jia, Y. F., Piazza, G. A., & Xi, Y. (2013). Hypoxia-regulated microRNAs in human cancer. *Acta Pharmacol Sin*, 34(3), 336-341. doi:10.1038/aps.2012.195
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*, 66(1), 7-30. doi:10.3322/caac.21332
- Singhal, H., Greene, M. E., Tarulli, G., Zarnke, A. L., Bourgo, R. J., Laine, M., . . . Greene, G. L. (2016). Genomic agonism and phenotypic antagonism between estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Sci Adv*, 2(6), e1501924. doi:10.1126/sciadv.1501924
- Soliman, G. A., Steenson, S. M., & Etekpó, A. H. (2016). Effects of Metformin and a Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) ATP-Competitive Inhibitor on Targeted Metabolomics in Pancreatic Cancer Cell Line. *Metabolomics (Los Angel)*, 6(3). doi:10.4172/2153-0769.1000183
- Suissa, S., & Azoulay, L. (2014). Metformin and cancer: mounting evidence against an association. *Diabetes Care*, 37(7), 1786-1788. doi:10.2337/dc14-0500
- Tariq, K., & Ghias, K. (2016). Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med*, 13(1), 120-135. doi:10.28092/j.issn.2095-3941.2015.0103
- Terzic, J., Grivennikov, S., Karin, E., & Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2101-2114 e2105. doi:10.1053/j.gastro.2010.01.058
- Tseng, Y. T. (2016). Cardioprotective effect of metformin against doxorubicin cardiotoxicity in rats. *Anatol J Cardiol*, 16(4), 242-243. doi:10.14744/AnatolJCardiol.2016.18505
- Unger-Saldana, K. (2014). Challenges to the early diagnosis and treatment of breast cancer in developing countries. *World J Clin Oncol*, 5(3), 465-477. doi:10.5306/wjco.v5.i3.465

- Valvona, C. J., Fillmore, H. L., Nunn, P. B., & Pilkington, G. J. (2016). The Regulation and Function of Lactate Dehydrogenase A: Therapeutic Potential in Brain Tumor. *Brain Pathol*, 26(1), 3-17. doi:10.1111/bpa.12299
- Verbelen, H., Gebruers, N., & Tjalma, W. (2015). Late effects of cancer treatment in breast cancer survivors. *South Asian J Cancer*, 4(4), 182. doi:10.4103/2278-330X.175956
- Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., . . . Guo, C. (2017). Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer*, 8(5), 761-773. doi:10.7150/jca.17648
- Wang, R. C., Wei, Y., An, Z., Zou, Z., Xiao, G., Bhagat, G., . . . Levine, B. (2012). Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science*, 338(6109), 956-959. doi:10.1126/science.1225967
- White, E. (2015). The role for autophagy in cancer. *J Clin Invest*, 125(1), 42-46. doi:10.1172/JCI73941
- Wigerup, C., Pahlman, S., & Bexell, D. (2016). Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacol Ther*, 164, 152-169. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.04.009
- Wodarz, D., & Zaubler, A. G. (2015). Cancer: Risk factors and random chances. *Nature*, 517(7536), 563-564. doi:10.1038/517563a
- Wu, B. L., Wang, D., Bai, W. J., Zhang, F., Zhao, X., Yi, Y., . . . Xu, J. Z. (2016). An integrative framework to identify cell death-related microRNAs in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 7(35), 56758-56766. doi:10.18632/oncotarget.10779
- Yao, S. (2016). MicroRNA biogenesis and their functions in regulating stem cell potency and differentiation. *Biol Proced Online*, 18, 8. doi:10.1186/s12575-016-0037-y
- Ye, W., Zheng, Y., Zhang, S., Yan, L., Cheng, H., & Wu, M. (2016). Oxamate Improves Glycemic Control and Insulin Sensitivity via Inhibition of Tissue Lactate Production in db/db Mice. *PLoS One*, 11(3), e0150303. doi:10.1371/journal.pone.0150303

- Yu, T., Tang, B., & Sun, X. (2017). Development of Inhibitors Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1 and 2 for Cancer Therapy. *Yonsei Med J*, 58(3), 489-496. doi:10.3349/ymj.2017.58.3.489
- Zambrano, J., & Yeh, E. S. (2016). Autophagy and Apoptotic Crosstalk: Mechanism of Therapeutic Resistance in HER2-Positive Breast Cancer. *Breast Cancer (Auckl)*, 10, 13-23. doi:10.4137/BCBCR.S32791
- Zeczycki, T. N., Maurice, M. S., & Attwood, P. V. (2010). Inhibitors of Pyruvate Carboxylase. *Open Enzym Inhib J*, 3, 8-26. doi:10.2174/1874940201003010008
- Zhao, L., & Zhang, B. (2017). Doxorubicin induces cardiotoxicity through upregulation of death receptors mediated apoptosis in cardiomyocytes. *Sci Rep*, 7, 44735. doi:10.1038/srep44735
- Zhong, Z., Sanchez-Lopez, E., & Karin, M. (2016). Autophagy, Inflammation, and Immunity: A Troika Governing Cancer and Its Treatment. *Cell*, 166(2), 288-298. doi:10.1016/j.cell.2016.05.051
- Zhou, Y., Rideout, W. M., 3rd, Bressel, A., Yalavarthi, S., Zi, T., Potz, D., . . . Heyer, J. (2014). Spontaneous genomic alterations in a chimeric model of colorectal cancer enable metastasis and guide effective combinatorial therapy. *PLoS One*, 9(8), e105886. doi:10.1371/journal.pone.0105886



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

Fecha : 29/08/2017
Página : 1/1

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO de MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL de la alumna REBECA SALGADO GARCIA, matrícula 2153803904, quien cumplió con los 176 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha veintinueve de agosto del 2017 presentó la DEFENSA de su EXAMEN DE GRADO cuya denominación es:

PARTICIPACIÓN DE HIF-1 EN LA REGULACION DE LA AUTOFAGIA INDUCIDA FARMACOLÓGICAMENTE EN CÉLULAS TUMORALES DE MAMA Y COLON

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 40 créditos y el programa consta de 216 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

Aprobada

JURADO

Presidenta

DR. ROXANA URI MIRANDA LABRA

Secretario

DR. ROBERTO EDUARDO LOPEZ URRUTIA

Vocal

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

Vocal

DR. BENJAMIN PEREZ AGUILAR