

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA – IZTAPALAPA**



**Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**Unidad Iztapalapa**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**“Determinación de la vía de apoptosis inducida en cáncer cervicouterino a través  
de la combinación farmacológica de Metformina, Oxamato de Sodio y  
Doxorrubicina en un modelo *in vitro*”**

**TESIS**

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

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

**BIÓL. ROCIO IZAMARY DELGADO WALDO**

**COMITÉ TUTORAL**

**CO-DIRECTOR INTERNO: Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz**

**CO-DIRECTOR EXTERNO: Dr. Carlos Pérez Plasencia**

**ASESORA: Dra. Nadia Judith Jacobo Herrera.**

**CIUDAD DE MÉXICO A 17 DE ENERO 2020**

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 Biol. Rocío Izamary Delgado Waldo fue depositaria de la beca de CONACyT No 636814 que le fue otorgada para sus estudios de Maestría durante el periodo de septiembre 2017 a agosto 2019.

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:

**“Determinación de la vía de apoptosis inducida en cáncer cervicouterino a través de la combinación farmacológica de Metformina, Oxamato de Sodio y Doxorubicina en un modelo *in vitro*”**

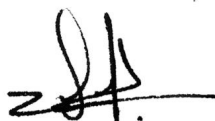
Que presentó:

Biol. Rocío Izamary Delgado Waldo

El día 17 de enero del año 2020

**Jurado:**

1 Dra. Nadia Jacobo Herrera



2 Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz



3 Dra. Roxana Uri Miranda Labra



4 Dra. Gabriela Figueroa González



## 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](mailto:mcgr@xanum.uam.mx)

### CO-DIRECTOR EXTERNO:

**Dr. Carlos Pérez Plasencia.**

Investigador en Ciencias Médicas.

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

e-mail: [carlos.pplas@gmail.com](mailto:carlos.pplas@gmail.com)

### ASESOR:

**Dra. Nadia Judith Jacobo Herrera.**

Investigadora en Ciencias Médicas.

Adscripción: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición

Salvador Zubirán INCMN SZ.

e-mail: [nadia.jacobo@gmail.com](mailto:nadia.jacobo@gmail.com)

*Every story has an end but in life every ending is just a new beginning*

*¿Sabes qué pasa cuando decides que ya no aceptarás lo que sea?*

*Obtienes más...*

*Dedicatoria:*

*A mis padres, por ser el motor de mi vida  
para seguir logrando mis sueños.*

*Agradecimientos:*

*A mis queridos padres y hermanos, nunca encontraré alguna manera de agradecer todo lo que han hecho por mi, por seguirme apoyando en mi carrera profesional, por darme su compañía, amor y esfuerzo, por ayudarme a crecer día con día y enseñarme a luchar con toda el alma sin rendirme. Hoy nuevamente concluyo otra etapa de mis estudios profesionales, me lleno de orgullo y siento que ese mismo orgullo está dentro de ellos.*

*A Eden, para que esta tesis sea un ejemplo y motivación para seguir adelante y sobretodo que nadie le diga que no lo puede hacer, te amo niño!*

*A mis amigos Arely, Paulina, Mau, David, Ferchis y Maritza, por brindarme su amistad sincera durante tantos años, y que aunque no los vea tan seguido, tienen un lugar especial en mi corazón.*

*A mis queridos amigos Jossi y Rebeca, más que amigos son mis hermanos, gracias por apoyarme con las decisiones que he tomado, que nos han llevado a varios problemas en todos lados xd, pero los hemos sabido resolver (si, claro!) y yo sé que cualquier problema que tenga siempre contaré con ustedes amigos, los amo!. A Ceeey que a pesar de no haberla tratado mucho se ha convertido en una gran amiga y sobretodo por defenderme de Jossi. A Carlos que es una persona que admiro y*

*quiero mucho, siempre lo tendré presente y será un ejemplo para mí. A todos los demás amiguitos del Lab L11, Sam, David, Orco, Oliver los quiero mucho!.*

*A Leo por motivarme a hacer muchas cosas que no pensé que podría hacer y recordarme a la persona que solía ser. Te quiero!*

*A mi ex tutora de licenciatura, la Dra. Vero, por seguirme teniendo paciencia sin mandarme muy lejos y por seguir haciendo de mí una persona responsable.*

*Agradezco infinitamente al Dr. Carlos Pérez Plascencia por aceptarme en su laboratorio. Por brindarme su confianza. Gracias por guiarme para concluir esta etapa y aprovecharé todas las enseñanzas que me ha dejado en este tiempo.*

*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.*

*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.*

*Finalmente a mí porque soy la mejor*



Resumen en español.

El cáncer cérvico uterino (CaCu) es la segunda neoplasia más frecuente en México con 7, 869 casos y 4, 121 muertes, siendo un problema de salud pública. La mayoría de los casos de CaCu, se originan en el epitelio estratificado del cérvix; surge por crecimiento incontrolable de las células y se sabe desde 1977 que el factor etiológico responsable del 99.7% de esta neoplasia es el virus del papiloma humano (VPH). El genoma del VPH se caracteriza por la presencia de las oncoproteínas E6 y E7, las cuales son necesarias para mantener el fenotipo tumoral, a través de la regulación del metabolismo de la célula tumoral conocido como Efecto Warburg, el cual consiste en la reprogramación el metabolismo energético para satisfacer la concentración de glucosa, glutamina y oxígeno para favorecer la proliferación y crecimiento celular; siendo un objetivo terapéutico de gran potencial. En este trabajo se utilizó una combinación terapéutica de 3 fármacos (triple terapia) que inhibe el metabolismo de la célula tumoral: metformina –inhibidor del complejo I de la cadena transportadora de electrones– oxamato de sodio –inhibidor de la lactato deshidrogenasa A (LDHA)– y doxorubicina, –inhibidor de la topoisomerasa II– fármaco de primera línea para el tratamiento de varios tipos de cáncer. Se determinó la citotoxicidad de la triple terapia a través de la concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>); los resultados mostraron que la triple terapia farmacológica inhibe la proliferación en un modelo *in vitro* de cáncer cérvico uterino. Se analizó la muerte celular por apoptosis a través de citometría de flujo, mostrando que las células tratadas con la triple terapia farmacológica se encontraban en mayor porcentaje en apoptosis tardía. Se detectó la expresión de proteínas relacionadas con apoptosis a través de un arreglo, encontrando que la triple terapia farmacológica induce la expresión de proteínas involucradas en la vía intrínseca de la apoptosis; finalmente estos resultados se corroboraron a través de la detección de proteínas mediante western blot. Estos resultados muestran que la desregulación del metabolismo energético de la célula tumoral causada por la administración de la triple terapia farmacológica induce apoptosis intrínseca.

## Abstract:

Cervix cancer is a public health concern, in Mexico it is the second leading cause of death by cancer behind breast cancer in women, with 13 960 new diagnostics every year and 4 769 deaths in 2015. Cervix cancer originates in most types of cancer in the stratified epithelium, arises from the uncontrollable growth of cells and it is known since 1977 the etiological factor responsible for 99.7% of this neoplasm is the human papillomavirus (HPV) producing changes in cellular functions that favor the replication of viral particles and the transformation of normal cells to cancer cells favoring processes like high proliferation, apoptosis resistance, poor prognosis, and lack of an effective therapy. Previous studies have shown that the cervical cancer progression can be associated with deregulated cellular energetics (Warburg effect). This alteration plays an important role in tumor progression as it provides essential energy for cell proliferation and tumor growth; therefore, it has shown great potential as a therapeutic target. In this work, we used a combination therapy aimed to disrupt tumor cell energy pathways: metformin –an inhibitor of the electron transport chain complex I– and sodium oxamate –an LDH-A inhibitor– in combination with doxorubicin, the standard treatment for many types of cancer. We estimated inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) in combination therapies. Our results showed that the triple therapy suppressed the proliferation *in vitro* model. We next assessed cell death through flow cytometry; cells exposed to the triple therapy showed early apoptosis. Finally, we detected the expression of apoptosis-related gene products by protein microarray and western blot analysis. Our results provide useful clues for targeting deregulated cellular energetics in cervical cancer through metabolism inhibitors and triggering apoptosis.

## Índice general

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1    Cáncer .....	1
1.2    Cáncer cervicouterino .....	2
1.3    Metabolismo de la célula tumoral.....	6
1.4    mTOR .....	8
1.5    Apoptosis .....	10
1.6    Terapias actuales.....	11
1.7    Propuesta de tratamientos farmacológicos.....	11
1.8    Combinación terapéutica. ....	14
<b>2. Justificación. ....</b>	<b>15</b>
<b>3. Pregunta de investigación .....</b>	<b>15</b>
<b>4. Hipótesis .....</b>	<b>15</b>
<b>5. Objetivos.....</b>	<b>15</b>
<b>6. Particulares.....</b>	<b>16</b>
<b>7. Material y Métodos .....</b>	<b>16</b>
7.1    Cultivo celular .....	16
7.2    IC <sub>50</sub> de las líneas celulares HeLa, SiHa y CaSki .....	16
7.3    Análisis de la muerte celular .....	18
7.4    Inmunodetección .....	18
7.5    Evaluación morfológica de la apoptosis .....	21
<b>8. Resultados. ....</b>	<b>22</b>
8.1    Evaluación citotóxica de los fármacos .....	22
8.2    Análisis de muerte celular. ....	23
8.3    Perfil de proteínas involucradas en apoptosis.....	25
8.4    Detección de proteínas involucradas en apoptosis .....	27
8.5    Evaluación morfológica .....	29
<b>9. Discusión.....</b>	<b>33</b>
<b>10. Conclusión.....</b>	<b>39</b>
<b>11. Referencias .....</b>	<b>40</b>

## Índice de figuras

FIGURA 1: "HALLMARKS DEL CÁNCER" .....	1
FIGURA 2: INCIDENCIA Y MORTALIDAD DE LOS DIFERENTES TIPOS DE CÁNCER. ....	2
FIGURA 3: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL APARATO REPRODUCTOR FEMENINO. ....	3
FIGURA 4: EPITELIOS ESPECIALIZADOS DEL CUELLO DEL UTERO. ....	3
FIGURA 5: GENOMA DEL VPH.....	5
FIGURA 6: MODULACIÓN DEL EFECTO WARBURG POR LAS ONCOPROTEÍNAS DEL VPH. ....	6
FIGURA 7: PROCESOS DE OBTENCIÓN DE ENERGÍA ENTRE LAS CÉLULAS NORMALES Y CÉLULAS TUMORALES.....	8
FIGURA 8: VÍAS DE SEÑALIZACIÓN APOPTÓTICA: INTRÍNSECA Y EXTRÍNSECA. ....	11
FIGURA 9: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA DOXORRUBICINA $C_{27}H_{29}NO_{11}$ .....	13
FIGURA 10: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA METFORMINA: $C_4H_{11}N_5$ . ....	13
FIGURA 11: ESTRUCTURA QUÍMICA DEL OXAMATO DE SODIO: $C_2H_2NNAO_3$ .....	14
FIGURA 12: CONCENTRACIÓN INHIBITORIA 50. ....	23
FIGURA 13: GRÁFICAS DE PUNTOS OBTENIDAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN CÉLULAS HELa, SiHa Y CaSki. ....	24
FIGURA 14: GRÁFICAS DE PUNTOS OBTENIDAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN CÉLULAS HELa, SiHa Y CaSki. ....	25
FIGURA 15: PERFIL DE PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN APOPTOSIS. ....	27
FIGURA 16. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN APOPTOSIS. CASPASA-3, CASPASA-8, P21 Y XIAP SE DETECTARON EN 3 LÍNEAS CELULARES A 4, 8, 12 Y 24 H DE TRATAMIENTO CON LA TRIPLE TERAPIA FARMACOLÓGICA. A HELa B)SiHa C)CaSki. SE USÓ ACTINA COMO CONTROL DE CARGA Y CAMPTOTECINA COMO CONTROL POSITIVO.....	28
FIGURA 17: ASPECTO MORFOLÓGICO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN CÉLULAS HELa. ....	30
FIGURA 18: ASPECTO MORFOLÓGICO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN CÉLULAS SiHa. ....	31
FIGURA 19: ASPECTO MORFOLÓGICO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN CÉLULAS CaSki. ....	32

## Índice de tablas

TABLA 1: GRUPOS EXPERIMENTALES.....	18
TABLA 2. LISTADO DE ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA WESTERN BLOT. ....	21

# 1. Introducción

## 1.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por una serie sucesiva de mutaciones en genes supresores de tumores y activación de oncogenes (Hassanpour y Dehghani, 2017) provocando un cambio en procesos como: mantenimiento de la señalización proliferativa, evasión de supresores de crecimiento y de apoptosis, aumento del potencial replicativo, angiogénesis y metástasis, así como inestabilidad genómica, evasión de la respuesta inmune, inflamación continua y desregulación del metabolismo energético, que son características distintivas o “hallmarks del cáncer” que adquieren las células normales para su progresión al cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011) (Figura 1). Los tipos más comunes que causan un mayor número de muertes al año a nivel mundial son: pulmonar, mamario, hepático, colorrectal y cérvico uterino (Aggarwal et al., 2015; Ferlay et al., 2015).

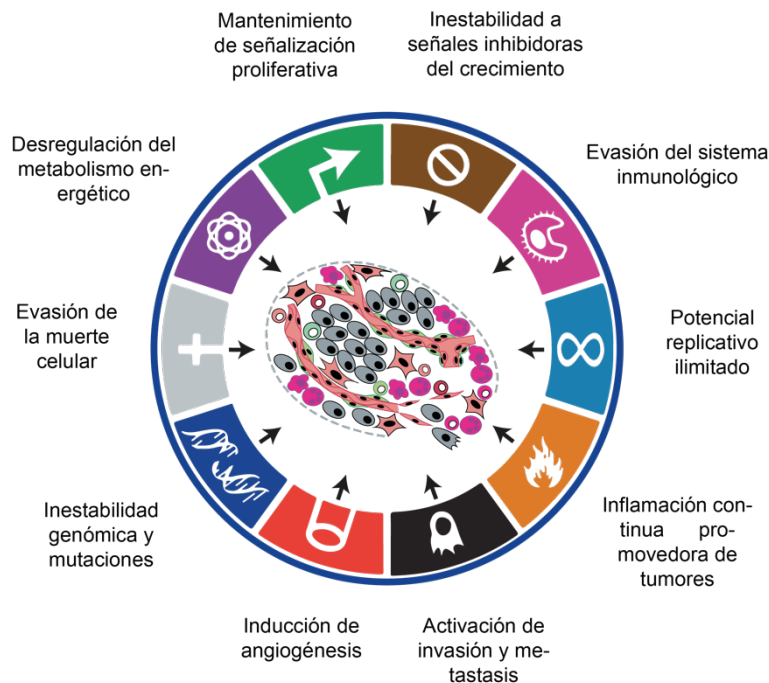


Figura 1: “Hallmarks del cáncer”.

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

## 1.2 Cáncer cervicouterino

### 1.2.1 Incidencia y mortalidad del cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCu) es la tercera neoplasia más frecuente a nivel mundial en mujeres de 25 a 65 años. En México, se ha reportado una incidencia de 13, 960 casos y 4, 769 muertes al año, siendo un problema de salud pública ocupando la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres (Bray et al., 2018) (Figura 2).

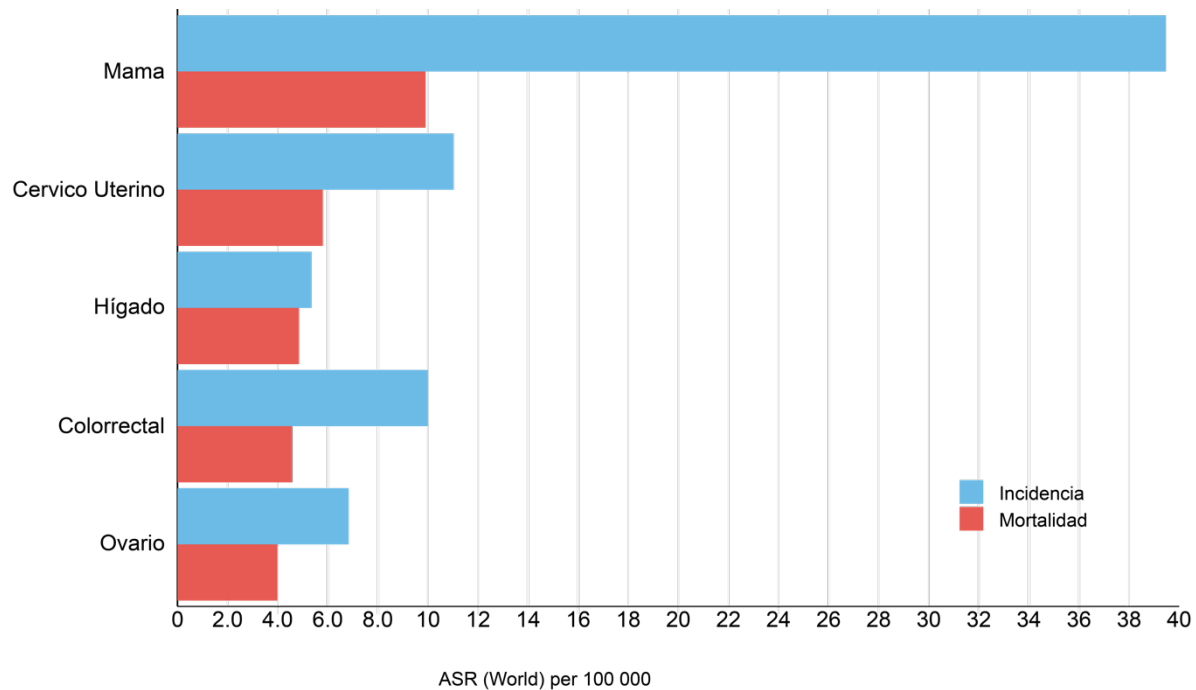


Figura 2: Incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer. En ambos sexos a nivel mundial (Tasa por cada 100 000 personas) (Tomada y modificada de (Bray et al., 2018))

### 1.2.2 Anatomía del cérvix

Anatómicamente el cérvix una estructura cilíndrica que conecta el útero y la vagina, tiene tres funciones principales: crea el canal de parto, permite y facilita el paso de espermatozoides al útero y funge como barrera para inhibir el paso de bacterias u otros agentes infecciosos al útero. (Kurita, 2018). El cérvix se compone de dos regiones: el endocérvix y ectocérvix (Figura 3); el endocérvix es la porción superior del cuello uterino que está revestido por una sola capa plegada de epitelio columnar que forma las

glándulas endocervicales secretoras de moco que contiene glucoproteínas (Kurita, 2018; Mahendroo y Nallasamy, 2018); el ectocérvix es la porción inferior del cuello uterino, revestido por epitelio escamoso estratificado con múltiples capas celulares (Mahendroo y Nallasamy, 2018). Las células se forman en la capa basal por división mitótica, mientras que las células hijas se mueven hacia arriba, cambiando gradualmente la morfología cuboidal a plana (Kurita, 2018). La transición entre estos dos tipos de células es llamada unión escamocolumnar (SCJ). (Mahendroo y Nallasamy, 2018) (Figura 4).

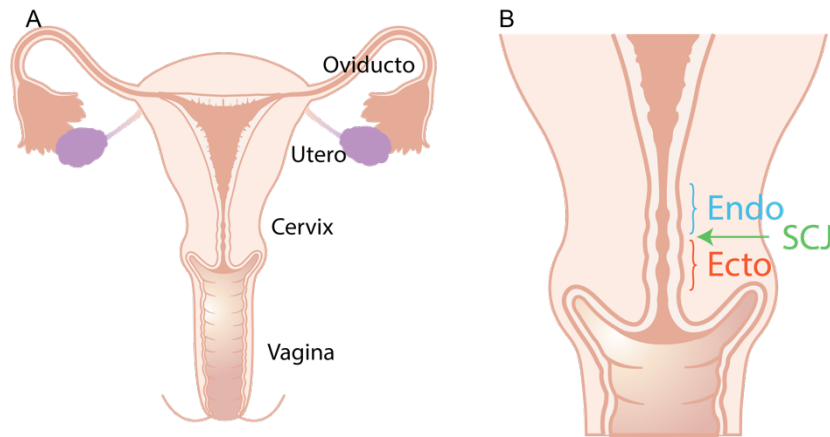


Figura 3: Representación esquemática del aparato reproductor femenino.  
a) El cuello uterino une la vagina con el útero. b) Cuello del útero, dividido en dos epitelios especializados.

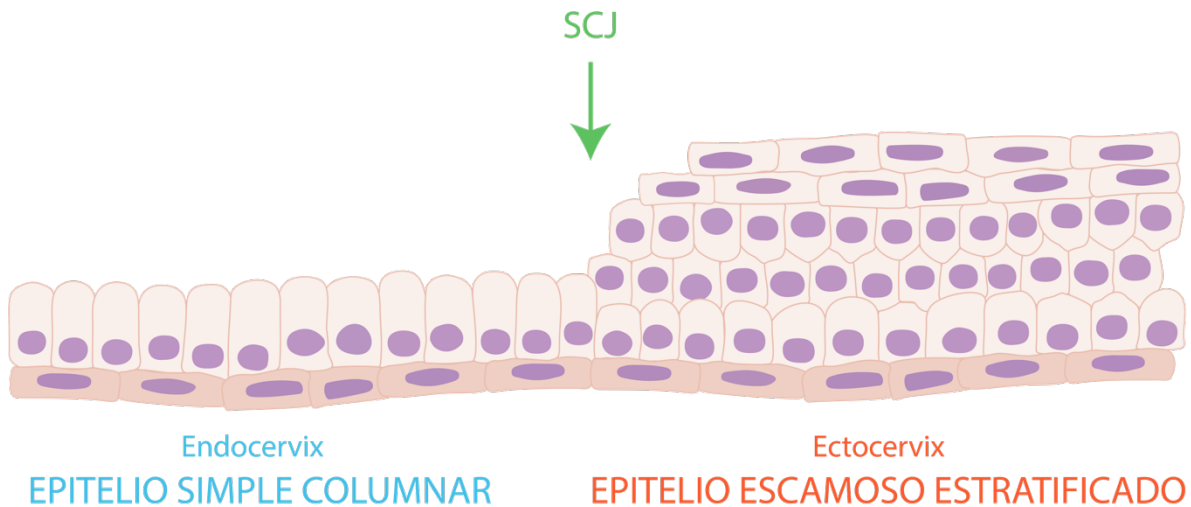


Figura 4: Epitelios especializados del cuello del útero..  
Endocervix con epitelio columnar simple (izquierda), la unión escamocolumnar (zona de transformación (flecha verde) y el ectocérvix con epitelio escamoso estratificado (derecha).

En la mayoría de los casos de CaCu, éste se origina en el epitelio estratificado del cérvix. El CaCu surge por el crecimiento incontrolable de estos tipos celulares y se sabe desde 1977 que el factor etiológico responsable del 99.7% de esta neoplasia es el virus del papiloma humano (VPH) (zur Hausen, 2009).

### 1.2.3 VPH y cáncer cervicouterino

El VPH infecta a través de lesiones en el epitelio o a través del ectocérvix, zona de transición y de transformación de las células (Schiffman et al., 2016), donde las partículas virales entran y se diseminan a la capa basal, produciendo cambios en las funciones celulares que favorecen la replicación de las partículas virales y la transformación de células normales a células cancerígenas (Oyervides-Muñoz et al., 2018). El VPH tiene un genoma circular, dentro se encuentran las regiones codificantes para proteínas tempranas (E1-E7) (Harden y Munger, 2017), las cuales codifican principalmente para las proteínas E6 y E7 que tienen afinidad por p53 y la proteína del retinoblastoma (pRB por sus siglas en inglés) respectivamente, dando lugar a la inestabilidad genómica, inhibición de la apoptosis, aumento de la tasa de proliferación y reprogramación del metabolismo (Doorbar et al., 2015).



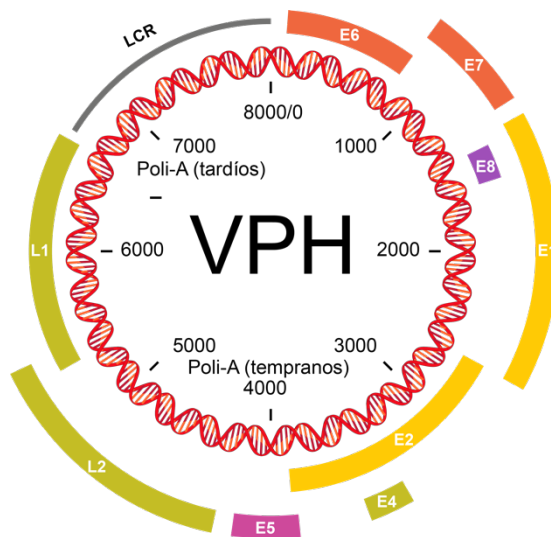


Figura 5: Genoma del VPH.

El genoma del VPH consta de seis genes tempranos (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) dos genes tardíos (L1 y L2) y la región larga de control (LCR) consta de varios elementos promotores y potenciadores.

#### 1.2.4 VPH y metabolismo energético de la célula tumoral.

E6 y E7 son las principales oncoproteínas virales que se requieren para preservar el fenotipo tumoral, ya que favorecen el metabolismo aberrante de la célula tumoral y contribuyen a la radio y quimiorresistencia a través del aumento de la actividad de las enzimas glucolíticas, así como la inhibición del ciclo de Krebs y la cadena respiratoria (Martínez-Ramírez et al., 2018). La evidencia acumulada sugiere que el VPH está involucrado en el metabolismo reprogramado de las células de cáncer cervical a través de interacciones proteicas (Martínez-Ramírez et al., 2018). E6 interactúa con la proteína asociada a E6 (E6AP), para inducir la degradación de p53 y la inhibición de apoptosis (Madan et al., 2011); p53 regula negativamente genes implicados en glucólisis como el regulador de apoptosis TIGAR, un factor transcripcional que inhibe la glucólisis y regula la proteína de ensamblaje de citocromo c oxidasa (SCO2) que regula positivamente la fosforilación oxidativa (FOSOX) (Matoba et al., 2006). E6 interactúa con c-MYC (oncogén viral de la mielocitomatosis aviar), factor de transcripción que promueve la expresión de genes como la enolasa A, hexoquinasa II, lactato deshidrogenasa A, fosfofructoquinasa y transportador de glucosa. E6 también activa mTORC1 y regular la vía de señalización

PI3K-AKT. La oncoproteína E7 promueve la transcripción del factor inducible por hipoxia 1 (HIF1). Una expresión alta de HIF1 participa en la transcripción de transportadores de glucosa, contribuyendo al efecto Warburg a través de la regulación positiva de la glucólisis y la regulación negativa de la FOSOX (Martínez-Ramírez et al., 2018).

Todas estas interacciones conducen a la síntesis rápida de ATP obtenida por el metabolismo energético alterado, lo que podría ayudar a satisfacer las altas demandas de energía de las células cancerosas durante la proliferación. De esta manera, las proteínas del VPH pueden promover el metabolismo energético de la célula tumoral (Martínez-Ramírez et al., 2018).

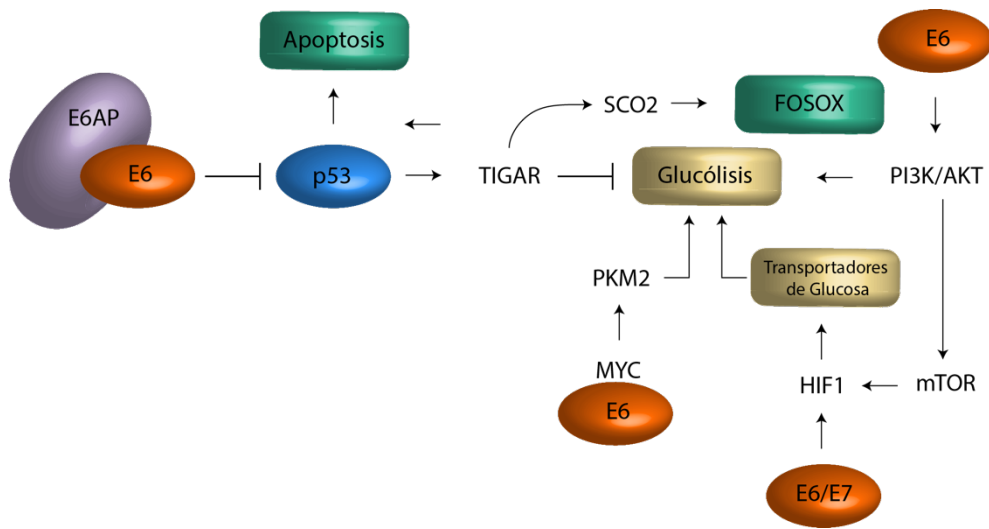


Figura 6: Modulación del efecto Warburg por las oncoproteínas del VPH. Las proteínas virales E6 y E7 activan la vía glucolítica.

### 1.3 Metabolismo de la célula tumoral

Todas las células diferenciadas en condiciones normales, dependen de la glucólisis para la obtención de energía, sin embargo, si hay una disminución de oxígeno (hipoxia), las células mediante glucólisis anaerobia, redirigen el piruvato generado por glucólisis a la Lactato deshidrogenasa (LDH), para la producción de lactato. Así, permiten que continúe la glucólisis por la conversión de NADH a NAD<sup>+</sup> (dinucleótido de nicotinamida adenina),

teniendo como resultado una producción de trifosfato de adenosina (ATP) mínima, comparada con la fosforilación oxidativa (FOSOX) (Berg et al., 2002).

En las células tumorales hay una reprogramación del metabolismo conocido como “efecto Warburg”; este metabolismo consiste en un cambio en la generación de ATP a través de la degradación de piruvato a lactato y oxida la forma reducida de NADH a NAD<sup>+</sup> a través de la enzima reversible LDH-A (Miskimins et al., 2014) y no por fosforilación oxidativa, incluso en concentraciones normales de oxígeno (Wu y Zhao, 2013) (Figura X).

Aunque la producción de ATP por la glucólisis aerobia es más rápida que la FOSOX es menos eficiente, ya que genera 4 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa (Zheng, 2012). Sin embargo, este cambio metabólico crea un ambiente ácido en la célula, lo cual promueve la activación de oncogenes como HIF1 y c-MYC, que promueven la transcripción de genes que codifican GLUT (transportadores de glucosa) y otras enzimas glucolíticas como, HKI y II (hexocinasa I y II) PFK-1 y 2 (fosfofructucinasa 1 y 2), PDH (piruvato deshidrogenasa), LDHA y GAPDH (gliceraldehido 3-fosfodeshidrogenasa) (Nagao et al., 2019), promoviendo el flujo glucolítico, disminuyendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la célula y evitando procesos de muerte celular. Además, la activación de HIF1 aumenta la captación de glucosa en las células cancerosas y regula positivamente a la LDHA (Stubbs y Griffiths, 2010). Este cambio exige que las células tumorales tengan una captación mayor de glucosa para satisfacer sus necesidades de crecimiento y proliferación (Cairns et al., 2011).

Existen diversos mecanismos moleculares que alteran el metabolismo celular, para la generación de ATP de manera rápida y un aumento en la biosíntesis de macromoléculas (hidratos de carbono, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos). Uno de esos mecanismos es la activación de la vía de señalización de PI3K, que activa río abajo a AKT1 y estimula la glucólisis mediante la activación de enzimas glucolíticas clave como la HK y PFK-2 y el aumento de la expresión y translocación a la membrana de los transportadores de glucosa. Además, AKT regula la vía de señalización de la cinasa mTOR la cual a su vez, regula indirectamente la traducción del ácido ribonucleico mensajero (RNAm), la

biogénesis de ribosomas y la activación de factores de transcripción como HIF-1, incluso bajo condiciones de normoxia (Cairns et al., 2011).

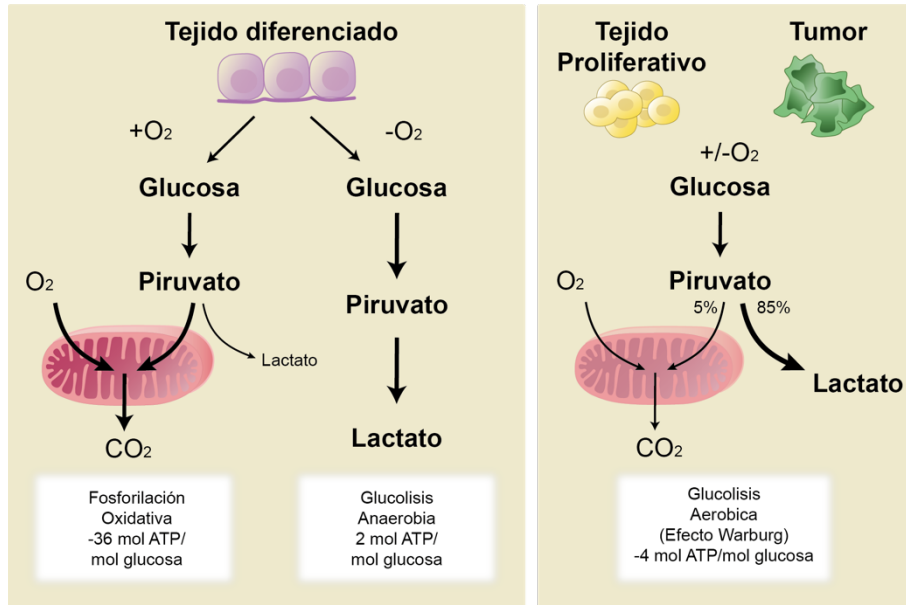


Figura 7: Procesos de obtención de energía entre las células normales y células tumorales. (Tomado y modificado de (Vander Heiden et al., 2009))

#### 1.4 mTOR

mTOR (mammalian Target of Rapamycin) es una cinasa serina/treonina que pertenece a la familia de proteínas de fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) e interactúa con varias proteínas para formar el complejo 1 de mTOR (mTORC1) (Vander Heiden et al., 2009). mTOR regula procesos como biosíntesis de proteínas, lípidos, organelos y la inhibición de autofagia y apoptosis (Laplanche y Sabatini, 2012a).

mTORC1 tiene cinco componentes principales: mTOR –la subunidad catalítica del complejo–, la proteína reguladora asociada de mTOR (Raptor regulatory-associated protein of mTOR), mLST8 conocido como G $\beta$  (G protein beta subunit-like), sustrato AKT rico en prolina de 40kDa (PRAS40) y DEPTOR (DEP-domain-containing mTOR-interacting protein) (Laplanche y Sabatini, 2009).

mTORC1 es una vía de señalización que integra señales intra y extracelulares, funge como regulador central de la célula, ya que regula positivamente el crecimiento y la proliferación celular controlando la homeostasis celular. Se activa por factores de crecimiento y por la disponibilidad de nutrientes (Martin y Hall, 2005).

El proceso de activación sucede a través de la proteína RAS-related GTP-binding protein (RAG por sus siglas en inglés), de la familia de GTPasas pequeñas RAS. Un heterodímero RAG media la translocación de mTORC1 desde el citoplasma a la superficie de los lisosomas, donde se activa Rheb. Una alta relación ATP/AMP activa mTORC1 mediante la prevención de la activación de la AMPK (proteína cinasa activada por AMP) (Laplante y Sabatini, 2012a). Esta activación promueve eventos importantes como la síntesis de proteínas, la cual se requiere para el crecimiento celular, fosforilando una amplia gama de sustratos, como el eIF4E (factor de iniciación eucariótico 4E), la 4E-BP1 (proteína de unión 1) y el S6K1 (proteína ribosomal S6 cinasa beta-1), los cuales a su vez favorecen la biogénesis de ribosomas mediante la estimulación de la transcripción de RNA ribosomal (RNAr) (Laplante y Sabatini, 2009). Otro evento importante es la síntesis de lípidos que es fundamental para el crecimiento y la proliferación celular; a través de la regulación de la proteína de unión al elemento regulador del esteroide (SREBP1 por sus siglas en inglés) y el receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR- $\gamma$ , por sus siglas en inglés) factores de transcripción que controlan la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en la homeostasis de lípidos y colesterol (Porstmann et al., 2008). Y finalmente la autofagia que es un proceso de sobrevivencia celular o modulador de muerte celular promovido por la vía mTOR. Este evento se activa cuando la disponibilidad de nutrientes es limitada y cuando hay una disminución de factores de crecimiento, a través de AMPK que fosforila a TSC2 y RAPTOR, conduciendo a la disminución de la actividad de mTORC1 y así una la promoción de la autofagia (Laplante y Sabatini, 2012b) degradando los organelos y complejos protéicos para la obtención de energía (Glick et al., 2010; Paquette et al., 2018). Actualmente se sabe que la desregulación en la vía mTOR promueve el desarrollo y progresión del cáncer a través de las señales de factores de crecimiento y nutrientes (Ilagan y Manning, 2016). Por lo

que podría ser un blanco terapéutico al inhibir los procesos de crecimiento, proliferación, promoción de autofagia y apoptosis (Hua et al., 2019).

### 1.5 Apoptosis

La apoptosis, es un proceso importante de muerte celular programada; juega un papel fundamental en el mantenimiento del número de células, contribuyendo a la homeostasis celular, ya que permite la eliminación de células dañadas. La apoptosis es un programa de muerte celular regulado por la familia de proteínas cistein-aspartato proteasas (caspasas) (Glick et al., 2010; Paquette et al., 2018), zimógenos que se activan por escisión a través de otra caspasa y son reguladas a través de dos vías de señalización: la vía extrínseca que es mediada por receptores de muerte, estos receptores pertenecen a un subgrupo de la superfamilia TNFR (tumor necrosis factor receptors), que incluye TNFR, Fas y TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). La activación de estos receptores conduce a la activación de caspasas iniciadoras, como la caspasas 8 y la activación de la caspasa efectora 3, que conlleva a la fragmentación del DNA induciendo muerte celular (Portt et al., 2011). Por otro lado, la vía intrínseca o mitocondrial, promueve la activación de proteínas de la familia BH3, que actúan como moléculas pro-apoptóticas, interactuando con las proteínas BCL-2 (B-cell lymphoma 2) y BAX-BAK; este complejo permite la salida de proteínas al espacio intermembranal, tales como el "citocromo c" al citosol, reclutando Apaf-1 y pro-caspasa-9, necesarios para la formación del apoptosoma, complejo que activa la caspasa 9 y finalmente termina en la escisión de la caspasa 3.

La inducción farmacológica de muerte celular por apoptosis a través de la supresión del efecto Warburg podría utilizarse como una nueva estrategia terapéutica antitumoral.

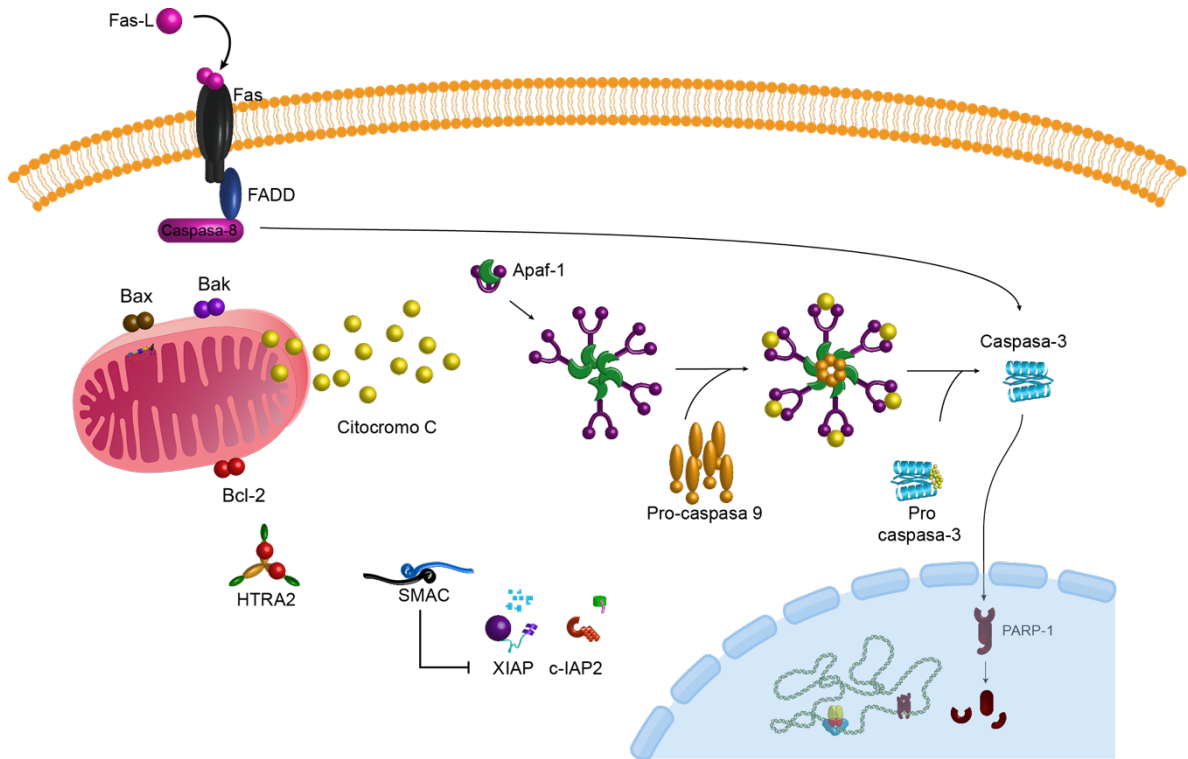


Figura 8: Vías de señalización apoptótica: intrínseca y extrínseca. La apoptosis puede iniciarse mediante señales que se originan en la membrana plasmática a través de la ligadura del receptor de muerte (vía extrínseca) o en la mitocondria (vía intrínseca).

## 1.6 Terapias actuales

Actualmente no existe una terapia efectiva para el CaCu, sin embargo, se utiliza radioterapia y agentes quimioterapéuticos como el cisplatino, clasificado como inhibidor de la síntesis de DNA es el más utilizado en la clínica para este fenotipo tumoral, sin embargo, se han observado múltiples efectos secundarios, como hepatotoxicidad, cardiotoxicidad y nefrotoxicidad (Dasari y Tchounwou, 2014).

## 1.7 Propuesta de tratamientos farmacológicos

El metabolismo de la célula tumoral ha sido un campo prometedor para el desarrollo de nuevas terapias que podrían ser efectivas para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, entre ellos el CaCu. En este campo se pretende investigar análogos de moléculas o inhibidores específicos de las vías de generación de energía de la célula tumoral (Jang

et al., 2013). Actualmente se busca evaluar fármacos ya aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) con distintos fines terapéuticos conjuntamente con fármacos ya existentes con actividad antitumoral con poca o nula toxicidad, es decir, se ha propuesto el uso de terapias combinadas que bloqueen simultáneamente diversos blancos terapéuticos para detener la progresión tumoral (Meng et al., 2014).

En nuestro grupo de trabajo se propuso que probablemente la combinación de Metformina Oxamato de sodio y Doxorubicina (triple terapia) inciden en las vías de generación de energía de la célula tumoral (vía mTOR y la glucólisis) y la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos; promueven la inhibición de la proliferación y el crecimiento celular; centrando nuestro interés en la reprogramación del metabolismo de la célula tumoral induciendo procesos de muerte celular como apoptosis. Anteriormente, en nuestro grupo de trabajo se demostró *in vivo* e *in vitro* en dos modelos de cáncer, que la triple terapia farmacológica inhibe el crecimiento tumoral a través de la probable inducción de mecanismos de muerte celular; apoptosis y/o autofagia. A continuación, se describen los mecanismos de acción de cada uno de los fármacos propuestos, la triple terapia que se propone en el presente trabajo incluye los siguientes fármacos:

#### 1.7.1 Doxorubicina

La doxorubicina (Dox) pertenece al grupo de las antraciclinas; es el fármaco anticancerígeno comúnmente empleado y aprobado por la FDA para el tratamiento de diversos tipos de cáncer como mama, ovario (CaOv), próstata (CP) y colorectal (CCR) (Rathore y Cekanova, 2015). El mecanismo de acción de Dox es a través de la inducción de la muerte celular a través de 3 vías: la inhibición de la TOPII (topoisomerasa II); la formación de aductos al DNA; y la inducción de estrés oxidativo (Kumral et al., 2015). La aplicación clínica de Dox se ve cada día más limitada debido a su alta toxicidad, por lo que se ha propuesto su uso en combinación con otros fármacos que disminuyan su toxicidad y aumenten su eficacia (Fraczkowska et al., 2018).



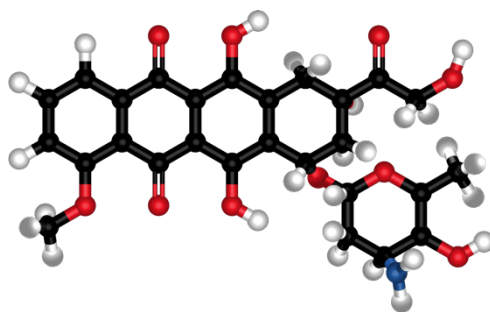


Figura 9: Estructura química de la Doxorubicina  $C_{27}H_{29}NO_{11}$ .

### 1.7.2 Metformina

La metformina (Met) se ha empleado como fármaco hipoglucemiante para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2); actualmente también se utiliza como anticancerígeno (Leone et al., 2014) debido a que disminuye la respiración celular al inhibir específicamente al complejo I de la cadena respiratoria la oxidoreductasa de NADH:ubiquinona (Ben Sahra et al., 2008; Imai et al., 2015) también activa a AMPK y glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, induciendo la disminución de la generación de ATP. Se ha encontrado que es un fármaco inocuo, seguro y eficaz como monoterapia y en combinación con otros fármacos para algunos tipos de cáncer por sus características antigluce miantes (Feng et al., 2014; Takahashi et al., 2014).

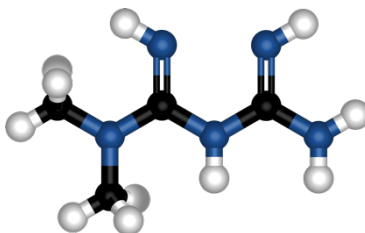


Figura 10: Estructura química de la Metformina:  $C_4H_{11}N_5$ .

### 1.7.3 Oxamato de sodio

El oxamato de sodio, (Oxa) es un análogo estructural del piruvato y se caracteriza por ser un inhibidor competitivo del sitio activo de la LDH-A. Sin embargo, es un fármaco que aún no está aprobado por la FDA y se necesitan más estudios para demostrar que es un fármaco seguro (Granchi et al., 2013; Miskimins et al., 2014). Se caracteriza por una

capacidad baja de absorción dentro de las células, debido a su estructura química altamente polar (Wong-Baeza et al., 2015). En los últimos años, el Oxa se ha utilizado como antitumoral experimentalmente *in vivo* e *in vitro* debido a que bloquea la glucólisis anaeróbica y así evita la conversión de piruvato a lactato en el citosol y la acidosis láctica, fenómeno común en el microambiente tumoral (Yang et al., 2014; Zhao et al., 2015).

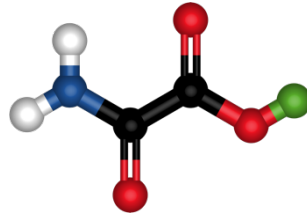


Figura 11: Estructura química del Oxamato de Sodio:  $C_2H_2NNaO_3$ .

### 1.8 Combinación terapéutica.

Se ha observado que la inhibición de las principales fuentes de obtención de energía de la célula tumoral a través de la combinación de los fármacos Met y Oxa, así como con sus análogos podría dar lugar a un agotamiento completo de ATP y al aumento de la muerte celular. (Miskimins et al., 2014; Chaube et al., 2015; Xintaropoulou et al., 2015; Lea et al., 2016). Mientras que al combinar los fármacos ya mencionados con quimioterapias, se podrían mejorar las tasas de respuesta, disminuir la reincidencia y disminuir los efectos secundarios; Figueroa-González et al., (2016) realizaron estudios *in vitro* con marcadores asociados a inflamación, encontrando que la combinación de Met, Oxa y Dox disminuye proteínas como p-NFKB, p-IKB; además demostraron que también induce apoptosis y autofagia en cáncer. Finalmente García-Castillo et al., (2017) observaron que en modelos *in vivo* de cáncer de mama triple negativo tratados con la triple terapia no hubo un aumento en la masa tumoral ni reincidencia posterior al tratamiento, en comparación con las terapias individuales. Finalmente, mediante modelos *in vitro* se demostró que la triple terapia inhibe la proliferación celular a través de la inducción de apoptosis por la vía de mTOR.

## 2. Justificación.

El CaCu es un problema de salud pública que constituye una causa importante de mortalidad en nuestro país. En la actualidad, existen terapias convencionales como quimioterapia y radioterapia, sin embargo, no hay una terapia eficaz y específica para este tipo de cáncer. Recientemente la inducción de la apoptosis a través de la inhibición del metabolismo de las células tumorales ha sido un campo prometedor para el desarrollo de nuevas terapias que probablemente puedan ser efectivas para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, entre ellos el CaCu.

Este trabajo consiste en determinar si el empleo de la triple terapia farmacológica compuesta por Metformina, Oxamato de sodio y Doxorrubicina (que tiene menos efectos secundarios que el cisplatino) induce muerte celular por apoptosis intrínseca, en un modelo *in vitro* de CaCu, a través de la inhibición de la glucólisis y la vía mTOR, responsables de la generación de energía importantes para la proliferación y crecimiento de la célula tumoral, con el objeto de establecer una posible terapia más específica y con baja toxicidad para el tratamiento de esta neoplasia.

## 3. Pregunta de investigación

¿La combinación farmacológica de Metformina, Oxamato de Sodio y Doxorrubicina en un modelo *in vitro* de cáncer cervicouterino, induce apoptosis intrínseca?

## 4. Hipótesis

Con base en el escenario metabólico de la célula tumoral, la combinación de fármacos inhibidores de las vías de generación de energía Met y Oxa, en combinación con Doxorrubicina, promoverán la disminución de la proliferación inducida por la activación de la vía intrínseca de la apoptosis en un modelo *in vitro* de CaCu empleando las líneas celulares HeLa, SiHa y CaSki.

## 5. Objetivos

## General

Determinar la vía de apoptosis que induce la combinación farmacológica de metformina oxamato de sodio y doxorrubicina en un modelo *in vitro* de CaCu.

## 6. Particulares

- Evaluar la citotoxicidad de los fármacos en combinación en las líneas celulares de CaCu.
- Analizar la muerte celular que induce la triple terapia sobre las líneas celulares de CaCu.
- Analizar el perfil de proteínas involucradas en apoptosis que induce la triple terapia farmacológica sobre la línea celular HeLa de CaCu.
- Validar la detección de proteínas involucradas en apoptosis inducidas por la triple terapia farmacológica sobre las líneas celulares de CaCu.
- Evaluar morfológicamente la apoptosis que induce la triple terapia farmacológica en líneas celulares de CaCu.

## 7. Material y Métodos

### 7.1 Cultivo celular

Se emplearon las líneas celulares de CaCu HeLa, SiHa y CaSki de la American Type Culture Collection (ATCC) proporcionadas por el laboratorio 11 del Instituto Nacional de Cancerología. Las cuales fueron sembradas en cajas de cultivo de 100 x15 mm con medio DMEM/F-12 GIBCO® suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% de la marca CORNING y mantenidas en una incubadora (Thermo Scientific) a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Todos los ensayos serán mantenidos bajo estas condiciones.

### 7.2 IC<sub>50</sub> de las líneas celulares HeLa, SiHa y CaSki

Con el objetivo de determinar la concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) de los fármacos en combinación: Doxorrubicina (Doxolem® RU, 10mg/5ml), Metformina (Santa Cruz

Biotechnology) y Oxamato de sodio (Santa Cruz Biotechnology), se empleó el ensayo colorimétrico de Sulforodamina B (SRB) siguiendo el protocolo descrito por Vichai y Kirtikara (2006). Se determinó la densidad celular fundamentada en la estructura de la SRB y su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas, proporcionando un índice del contenido de proteína celular, por lo cual se establece una relación directa entre el número de células viables y la cantidad de SRB diluido.

De esta manera, se obtuvo la IC<sub>50</sub> de los fármacos en combinación como se muestra en la tabla 1. Las líneas celulares seleccionadas se utilizaron por las diferencias de sus características moleculares, incluido el tipo de infección por VPH, así como el grado de expresión de p53, grado de invasión y finalmente por el grado de respuesta a la quimioterapia (Hietanen et al., 2000; Magaldi et al., 2012; Filippova et al., 2014). Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos, con una densidad de 1x10<sup>4</sup> células por pozo, contenidas en 100µl de medio DMEM/F-12 con 24 h de adherencia. Después se retiró el medio y las células fueron expuestas a los tratamientos ya mencionados con medio DMEM/F-12 suplementado con SFB al 2% para evitar la competencia entre el exceso de nutrientes y los tratamientos experimentales.

Después de los tiempos establecidos, las células se fijaron con ácido tricloroacético (TCA) frío al 10% y teñidas con Sulforodamina- B (SRB) (MP BIOMEDICALS) durante 30 min. Posteriormente las placas fueron lavadas 4 veces con ácido acético al 1%; finalmente se dejaron secar a temperatura ambiente y se añadieron 200µl de Tris base 10 mM (Promega, USA) con pH 10.5 para solubilizar el colorante. El número de células viables es directamente proporcional a la cantidad de colorante disuelto, por lo que se determinó la supervivencia celular a través de la densidad óptica (DO) la cual se midió en un lector de microplacas (EPOCH, Biotek) a 510 nm. La IC<sub>50</sub> se determinó a partir de una gráfica dosis-respuesta gradual con el software GraphPad Prism versión 5.0. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y de manera independiente.

Fármacos	[ ] Tratamientos	Tiempo de Exposición
Dox/Met/Oxa	0.5 $\mu$ M, 15 mM, 10 mM	12 y 24 Hrs
Dox/Met/Oxa	1 $\mu$ M, 20 mM, 15 mM	
Dox/Met/Oxa	1.5 $\mu$ M, 25 mM, 20 mM	
Dox/Met/Oxa	2 $\mu$ M, 30 mM, 25 mM	
Dox/Met/Oxa	2.5 $\mu$ M, 35 mM, 30 mM	

*Tabla 1: Grupos experimentales. concentraciones y tiempo de exposición de los fármacos para determinar las IC<sub>50</sub>.*

### 7.3 Análisis de la muerte celular

Con el objetivo de analizar si la terapia farmacológica induce muerte celular por apoptosis, se realizó el ensayo de citometría de flujo. El cual se fundamenta en la capacidad que tiene la Anexina V y el Ioduro de Propidio (IP) para unirse a las células en proceso de muerte celular. A través del kit de Anexina V/IP (BD Cat. 556547) se determinó la fase de apoptosis que presenten las células expuestas a la triple terapia siguiendo las indicaciones del fabricante, empleando la IC<sub>50</sub> obtenidas previamente.

Las líneas celulares de CaCu, fueron sembradas en placas de 6 pozos con una densidad de  $5 \times 10^5$  células en cada pozo con las condiciones ya mencionadas y con 24 h de adherencia. Después del tiempo de exposición de los fármacos, las células se tripsinizaron y colectaron por centrifugación, resuspendiéndolas en 250  $\mu$ L de buffer de unión a Anexina V. Se agregaron 2.5  $\mu$ L de Anexina V y 2.5  $\mu$ L de IP y posteriormente fueron incubadas por 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Las células se analizaron en un citómetro BD FACSCalibur acoplado al software Cell Pro versión 5.1. Los ensayos se realizaron por triplicado y de manera independiente.

### 7.4 Inmunodetección

Para determinar la vía por la cuál la triple terapia farmacológica induce la apoptosis, se realizó un screening de las proteínas relacionadas con la apoptosis usando el microarreglo de detección de proteínas (RayBio® C-Series Human Apoptosis Antibody

Array 1 (AAH-APO-1-2)) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todos los reactivos fueron preparados y utilizados en el momento del ensayo. Para sustentar este resultado, se realizaron inmunodetecciones por western blot de las proteínas sobre o subexpresadas en el microarreglo.

#### 7.4.1 Extracción de proteínas

Se realizaron diferentes extracciones para la obtención de proteínas. Para ello, se emplearon las líneas celulares de CaCu las cuales se mantuvieron en placas Petri (100x15mm) con una confluencia celular del 80% con las condiciones ya mencionadas y con 24 h de adherencia; una vez concluido ese lapso la línea celular HeLa fue expuesta a 12 h con la terapia farmacológica para el microarreglo, y las líneas celulares HeLa, SiHa y CaSki fueron expuestas a los tratamientos farmacológicos por 4, 8, 12 y 24 h; con un control negativo sin tratamiento y uno positivo (camptotecina) para WB.

Para llevar a cabo la extracción protéica se retiró el medio de cultivo de las placas Petri y fueron lavadas con PBS no estéril al 1X y se agregó el concentrado de buffer de lisis suplementado con una mezcla (coctel) de inhibidores de proteasa. Después las células fueron cosechadas con un scrapper. El contenido se colectó en un microtubo de 1.5 ml, que se sometió a agitaciones constantes en vórtex para deshacer los agregados celulares. Finalmente se centrifugó a 12, 000 rpm durante 30 minutos para separar los residuos celulares insolubles. La cantidad de proteínas obtenidas se cuantificó con base en la técnica colorimétrica Bradford. La lectura se realizó en un lector de placas Epoch (Biotek) a 580 nm.

#### 7.4.2 Microarreglo protéico

Se colocó la membrana del microarreglo con el lado impreso hacia arriba en un contenedor de plástico. La membrana se bloqueó durante 30 min a temperatura ambiente con el buffer de bloqueo en rotación constante. Después de este periodo, se retiró el buffer y se incubó la muestra protéica obtenida de la extracción (1000 µg/ml) a 4° C toda

la noche en rotación continua. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se retiró la muestra y se realizaron 3 lavados con Wash Buffer 1 al 1X y 2 lavados con Wash Buffer 2 al 1X durante 5 min cada lavado en rotación constante. Posteriormente la membrana se incubó con el concentrado de HRP-Streptavidina al 1X toda la noche a 4° C en rotación constante. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se retiró la muestra y se realizaron 3 lavados con Wash Buffer 1 al 1X y 2 lavados con Wash Buffer 2 al 1X durante 5 min cada lavado en rotación constante.

Finalmente, la membrana fue colocada sobre papel óptico para remover los excesos de buffer y fue transferida a una hoja de plástico con el lado impreso hacia arriba y se incubó con 500µl del buffer de detección C y D a una concentración 1:1 durante 5 min a temperatura ambiente sin rotación. La detección de los inmunocomplejos se realizó en el digitalizador C-Digit Blot Scanner (Li-COR) y las imágenes resultantes se analizaron en el software ImageStudio (Li-COR).

#### 7.4.3 Western Blot

Las muestras de proteínas (25µg) obtenidas de la extracción fueron separadas mediante el sistema SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) Para ello se empleó el equipo Mini-PROTEAN Tetra System (BioRad). La separación de proteínas se llevó a cabo a 80 volts por 2 horas aproximadamente. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de PDVF Millipore (polifluoruro de vinilideno) con un poro de 0.45µm mediante transferencia semi-seca en un equipo Trans-blot turbo (BioRad) a 20 volts por 30 min. 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 h. Posteriormente se realizaron 4 lavados con TBS-Tween y se incubaron 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 incubaron con el Ab secundario correspondiente por 2 h 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).

Anticuerpo	No de catálogo	Anticuerpo secundario
Caspasa 3	sc-7148	Rabbit
Caspasa 8	sc-5263	Mouse
p21	sc-397	Rabbit
XIAP	ab28151	Mouse
Actina	sc-47778	Mouse
Anti-mouse IgG-HRP	7076s	
Anti-rabbit IgG-HRP	7074s	

*Tabla 2. Listado de anticuerpos utilizados para Western Blot.  
Para la detección de proteínas involucradas en la muerte celular por apoptosis en las líneas celulares de CaCu.*

## 7.5 Evaluación morfológica de la apoptosis

El daño en el ADN es una de las principales características de la apoptosis. La visualización del daño en el ADN se logra empleando la técnica de tinción TUNEL, (marcado de final de corte de dUTP de Terminal desoxinucleotidil transferasa, por sus siglas en inglés), que se fundamenta en la capacidad que tiene la enzima deoxynucleotidyl transferasa de catalizar la adición de nucleótidos dUTP a los extremos 3' libre de ADN fragmentado. Mediante el uso de dUTPs que están marcados con FITC emiten fluorescencia y se puede identificar específicamente las células apoptóticas. Para ello, se emplearon las líneas celulares de CaCu, las cuales fueron sembradas en cajas de 6 pozos conteniendo en cada pozo un cubreobjetos previamente tratado con polilisina con una densidad de  $4 \times 10^5$  células en cada pozo con las condiciones ya mencionadas y con 24 h de adherencia. Las células fueron expuestas a la combinación farmacológica durante 12 y 24 h. Después del tiempo de exposición de los fármacos, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y a través del kit DeadEnd Fluorometric TUNEL System Cat. G3250 se evaluó la apoptosis siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente,

las células se observaron en un microscopio confocal LEICA TCS SP8X (se evaluaron 5 campos diferentes), las imágenes resultantes se analizaron en el software Leica Application Suite X y finalmente las imágenes se procesaron en el software Ilustrador.

## 8. Resultados.

### 8.1 Evaluación citotóxica de los fármacos

Se observó que el porcentaje de inhibición del crecimiento celular de los 3 fármacos en combinación (Doxorrubicina, Metformina y Oxamato de sodio) incrementó conforme aumentó la concentración del fármaco, es decir, es dosis dependiente, así como también influyó el tiempo de exposición al fármaco.

Los resultados obtenidos mostraron que la combinación de los tres fármacos induce la inhibición de la proliferación celular. La  $IC_{50}$  para esta combinación se estableció a concentraciones de 25mM/ 20mM/ 1.5 $\mu$ M para Metformina, Oxamato y Doxorrubicina, respectivamente a las 12 h (figura 12 a, b y c), mientras que para las 24 h las  $IC_{50}$  fueron de 20mM/ 15mM/ 1 $\mu$ M para Metformina, Oxamato y Doxorrubicina (figura 12 d, e y f), respectivamente. Las combinaciones de los 3 fármacos a 12 h (figura 12 a, b y c) mostraron un porcentaje de inhibición menor en comparación con las células tratadas a las 24 h (figura 12 d, e y f), ya que se necesita mayor concentración de cada fármaco para obtener el 50% de inhibición a las 12 h (Figura 12).

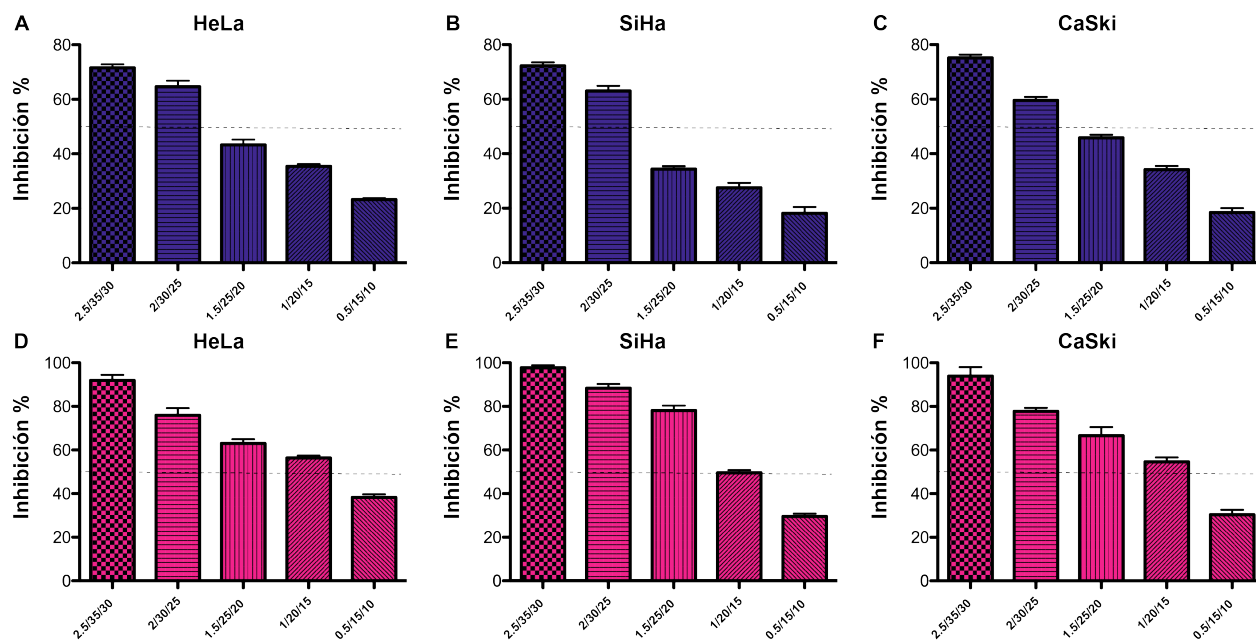


Figura 12: Concentración Inhibitoria 50. de fármacos en combinación a 12 y 24 horas de exposición, en las líneas celulares HeLa, SiHa y CaSki. HeLa 12 h, B) SiHa 12 h, C) CaSki 12 h, D) HeLa 24 h, E) SiHa 24 h, F) CaSki 24 h.

## 8.2 Análisis de muerte celular.

Con la finalidad de sustentar si la triple terapia induce muerte celular por apoptosis, se utilizó el método de Anexina V/PI, a través de citometría de flujo. Las gráficas de puntos obtenidas muestran el porcentaje de células en muerte celular por apoptosis. En la figura 13A se observa que en las células HeLa tratadas con la triple terapia farmacológica a las 12h se induce apoptosis tardía con 85.1%, mientras que a las 24h se presenta el 73.8% de células en apoptosis tardía (14A). En la figura 13B se muestra que las células SiHa tratadas con la triple terapia farmacológica a 12h se induce el 76.6% de células en apoptosis tardía y a las 24h un 84.4% de células en apoptosis tardía (14B). Finalmente, en la figura 13C se observa que las células CaSki tratadas con la triple terapia farmacológica a las 12h se indujo un 62.7% de apoptosis tardía mientras que a las 24h tienen un 54.1% (14C). Estos resultados demuestran que las células tratadas con la triple terapia farmacológica en combinación induce muerte celular por apoptosis tardía, sugiriendo que los fármacos podrían estar ejerciendo una sinergia entre ellos.

## 12 Horas

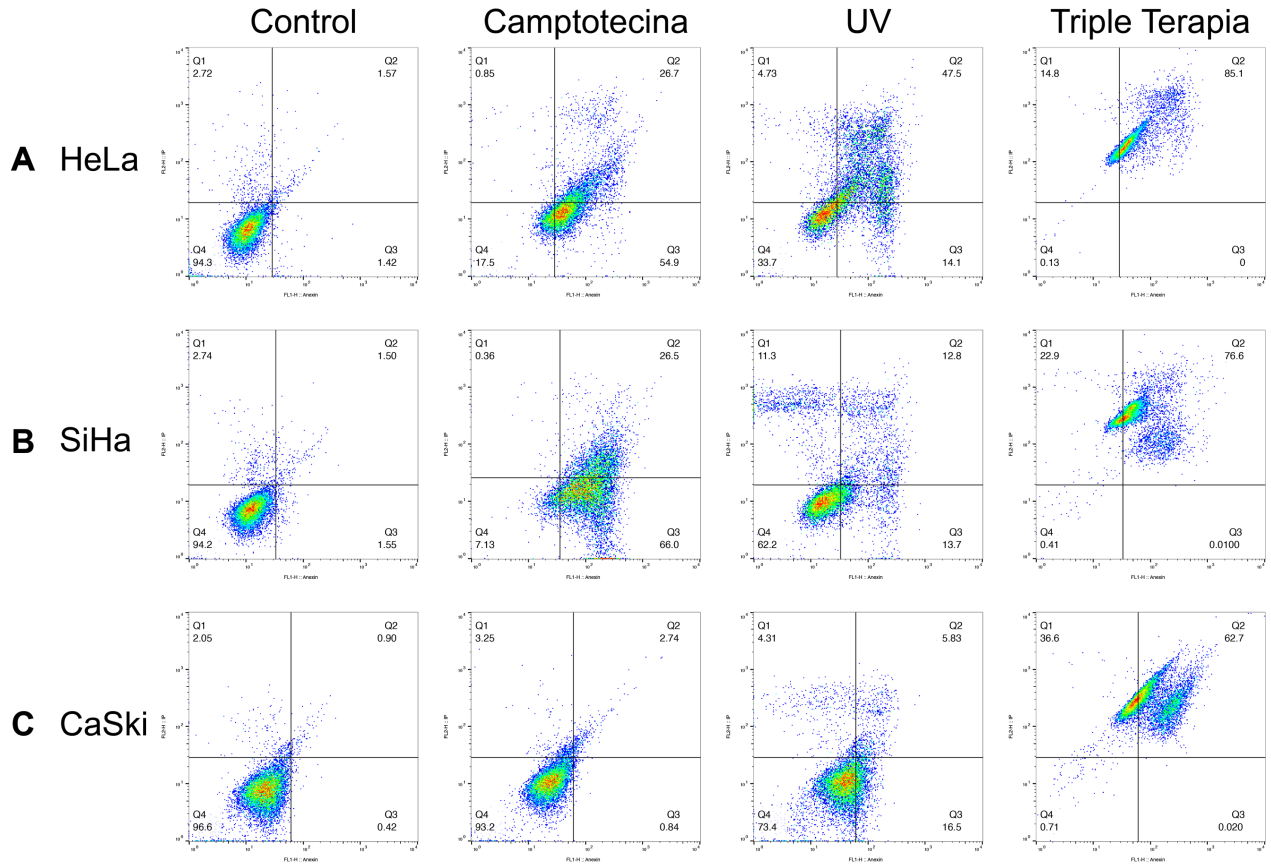


Figura 13: Gráficas de puntos obtenidas por citometría de flujo en células HeLa, SiHa y CaSki. Células expuestas a la triple terapia farmacológica a 12 horas. A) HeLa, B) SiHa, C) CaSki

## 24 Horas

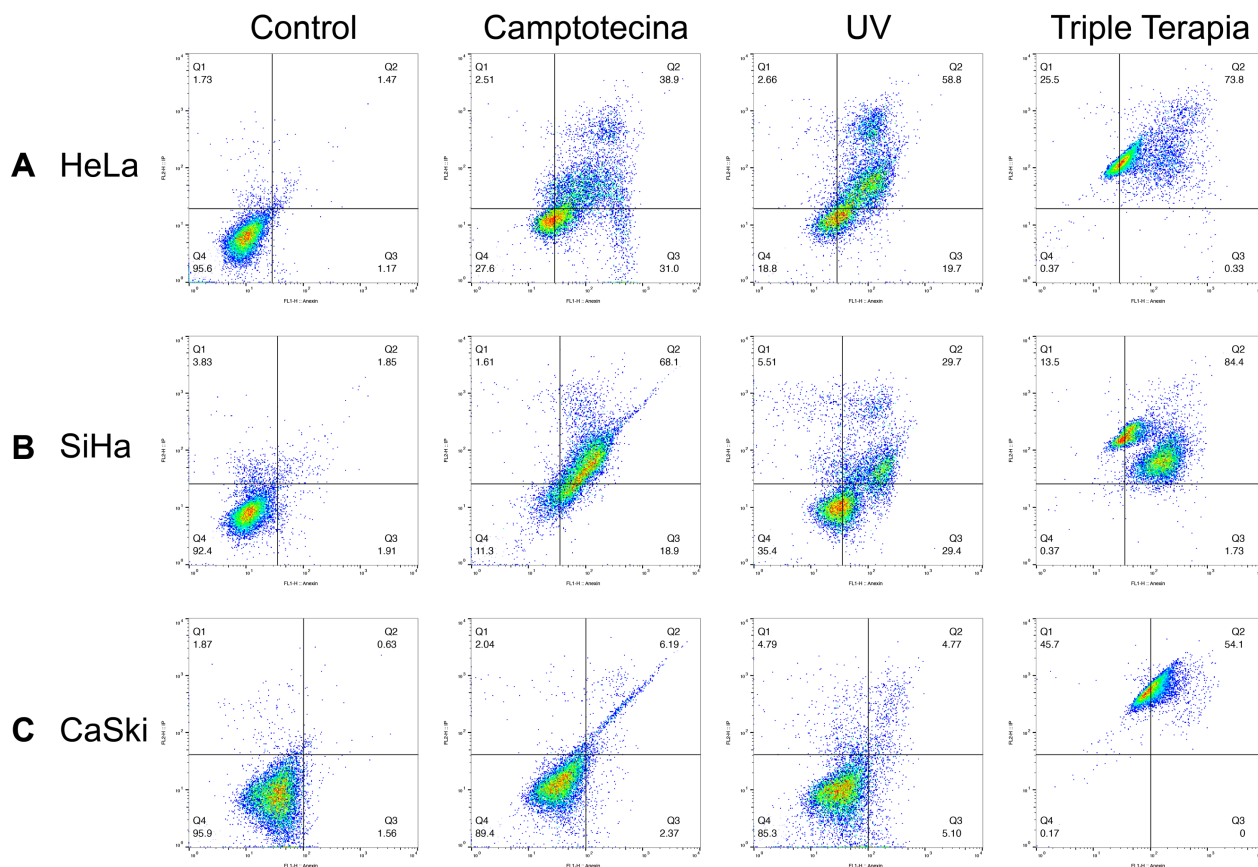


Figura 14: Gráficas de puntos obtenidas por citometría de flujo en células HeLa, SiHa y CaSki. Células expuestas a la triple terapia farmacológica a 24 horas. A) HeLa, B) SiHa, C) CaSki

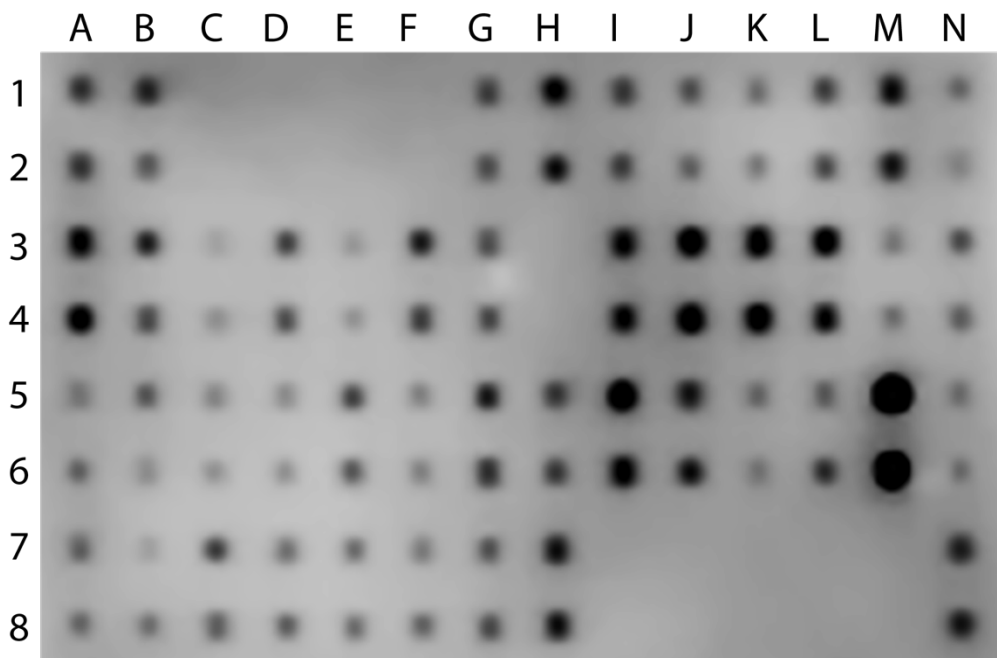
### 8.3 Perfil de proteínas involucradas en apoptosis

Mediante un análisis del perfil de proteínas involucradas en apoptosis (figura 15C), se realizó la detección de la intensidad luminosa de cada punto que corresponde a un anticuerpo específico. En la figura 15C se muestra el mapa del microarreglo donde se encuentra la localización de cada proteína; se demostró que las células tratadas a 12 h con la triple terapia farmacológica hubo un aumento en la detección de proteínas como BAD, BAX, caspasa 3, citocromo C, CD40-R, CD40-L, Fas-R, Fas-L, HTRA2, p21, p27, p53, XIAP, Survivina, HSP27, HSP60, HASP70 y SMAC (Figura 15A y B). Mientras tanto, los niveles de detección de las demás proteínas se mantuvieron sin cambios (Figura 15A y B). El control positivo se utilizó para normalizar los resultados de la membrana

### A Sin tratamiento



### B HeLa 12 horas triple terapia



**C**

Each antibody is spotted in duplicate vertically	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	
	1	POS	POS	NEG	NEG	BLANK	BLANK	Bad	Bax	Bcl-2	Bcl-w	BID	BIM	Caspase-3	Caspase-8
	2														
	3	CD40 (TNFRSF5)	CD40 Ligand (TNFSF5)	cIAP-2	CytoC	DR6 (TNFRSF21)	Fas (Apo-1)	Fas Ligand (TNFSF6)	BLANK	HSP27	HSP60	HSP70	HTRA2	IGF-1	IGF-2
	4														
	5	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-3	IGFBP-4	IGFBP-5	IGFBP-6	IGF-1 R	Livin	p21	p27	p53	SMAC	Survivin	TNF RI (TNFRSF1A)
	6														
	7	TNF RII (TNFRSF1B)	TNF alpha	TNF beta	TRAIL R1 (TNFRSF10A)	TRAIL R2 (TNFRSF10B)	TRAIL R3 (TNFRSF10C)	TRAIL R4 (TNFRSF10D)	XIAP	BLANK	BLANK	NEG	NEG	NEG	POS
8															

POS = Positive control spot  
 NEG = Negative control spot  
 BLANK = Blank spot

**D**

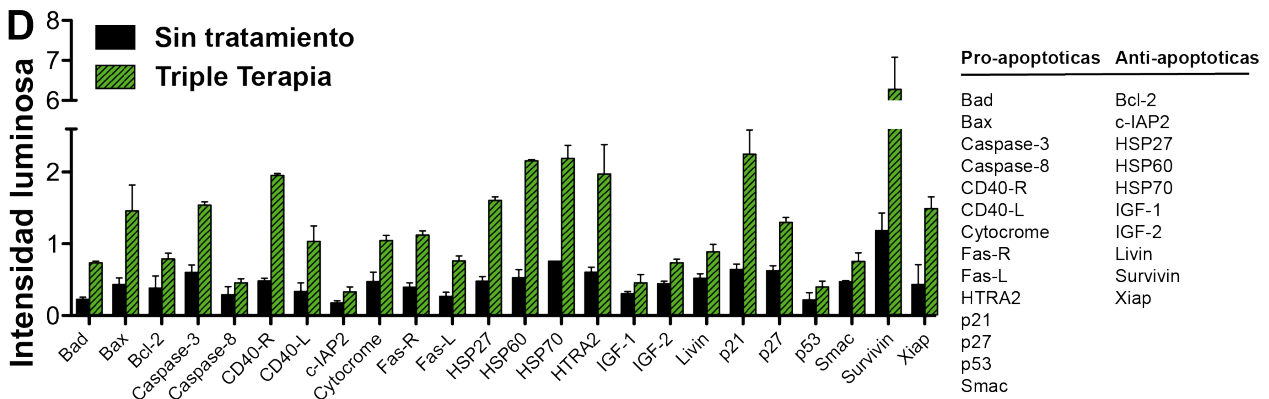


Figura 15: Perfil de proteínas involucradas en apoptosis.

Perfil de proteínas relacionadas con apoptosis en células HeLa. Se analizaron cantidades iguales de extractos de proteínas de células sin tratamiento: (A) y tratadas con la triple terapia farmacológica a 12 h de exposición: (B). (C): Mapa que muestra la ubicación de los anticuerpos relacionados con la apoptosis detectados en el Kit de apoptosis. (D): Las intensidades quimioluminiscentes se cuantificaron mediante densitometría. Se usó un control positivo para normalizar los resultados de la membrana.

#### 8.4 Detección de proteínas involucradas en apoptosis

Para sustentar los resultados obtenidos en el microarreglo, se realizó la inmunodetección de proteínas mediante western-blot de: caspasa-3, caspasa-8, p21 y XIAP, estas proteínas son importantes ya que participan en las vías de apoptosis. En la figura 16 se observa que a diferentes tiempos de exposición con la triple terapia farmacológica la detección de caspasa-3 involucrada en la vía intrínseca de la apoptosis aumenta en las tres líneas celulares, mientras que no se observa cambio en la detección de la caspasa-8 involucrada en la vía extrínseca de la apoptosis en la línea celular HeLa, correspondiente con los datos obtenidos en el microarreglo, sin embargo en la línea

celular SiHa se observa un aumento en la detección de caspasa-8 a 24h de tratamiento, mientras que en línea celular CaSki, se observa un aumento de caspasa-8 hasta las 12h, y disminuye a las 24h.

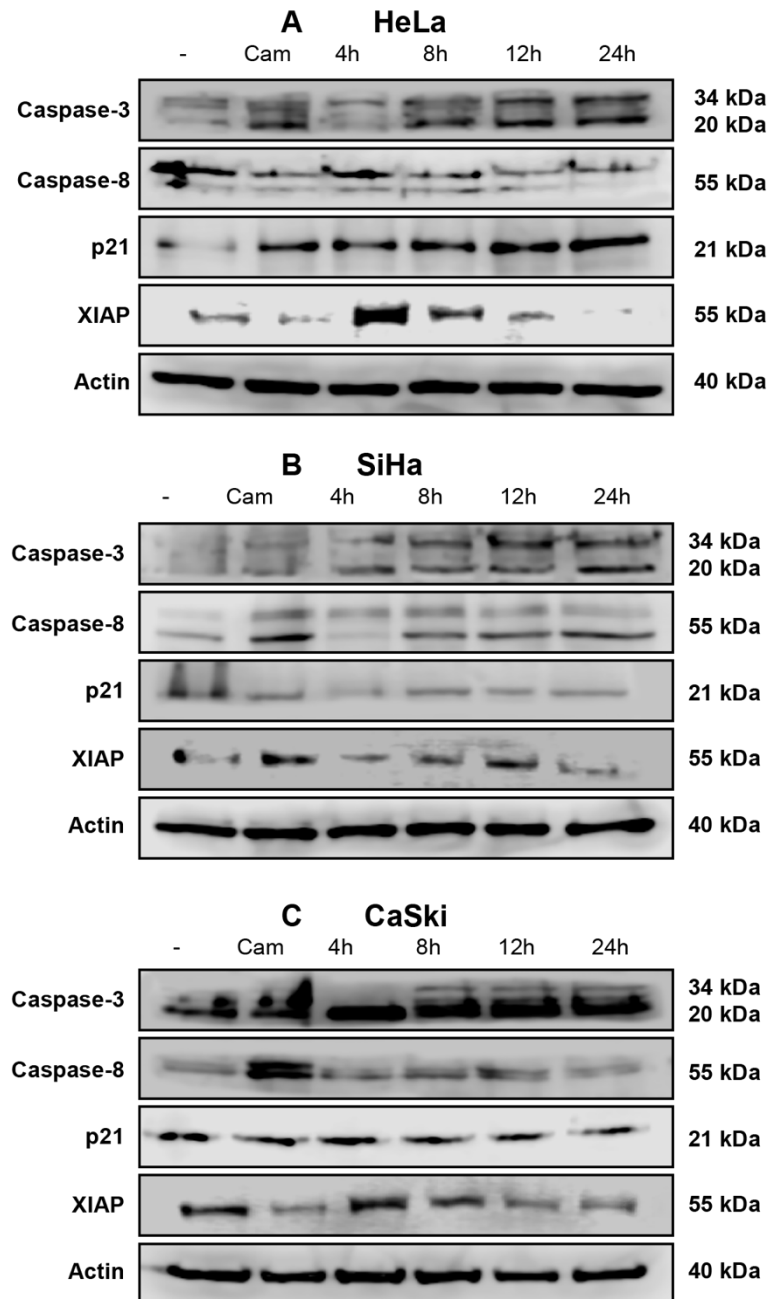


Figura 16. Detección de proteínas involucradas en apoptosis. Caspasa-3, Caspasa-8, p21 y XIAP se detectaron en 3 líneas celulares a 4, 8, 12 y 24 h de tratamiento con la triple terapia farmacológica. A) HeLa B) SiHa C) CaSki. Se usó actina como control de carga y camptotecina como control positivo.



Así mismo se observó un aumento en la detección de la proteína p21, involucrada en la inhibición del ciclo celular en la fase G1 a S en la línea celular HeLa; con respecto a esta proteína no se observaron cambios significativos en SiHa y CaSki. Finalmente, la detección en XIAP en las tres líneas celulares disminuyó conforme transcurrió el tiempo de exposición a la triple terapia, haciendo destacar que en HeLa a 24h, se abate su detección.

### 8.5 Evaluación morfológica

Con la finalidad de validar si la triple terapia induce la fragmentación del DNA, se realizó la evaluación morfológica de las células a través del ensayo TUNEL con las 3 líneas celulares. En las figuras 17, 18 y 19, se muestran tres paneles; el primero el marcaje con DAPI en azul, (marcador fluorescente que se une a regiones enriquecidas en adenina y timina), el segundo panel muestra la el marcaje con TUNEL en verde y el tercer panel muestra el sobrelapado “merge” del panel 1 y 2; con las líneas celulares expuestas a 12 h de tratamiento con la triple terapia farmacológica (17, 18 y 19B) así como el control positivo (UV) (17, 18 y 19C). En la figura 17, 18 y 19 A y B (panel en verde) se observa la formación de micronúcleos, pequeños cuerpos extranucleares que se originan a partir de fragmentos de cromátidas y/o cromosomas que se originan en la anafase de las células en división y no se incluyen en el núcleo principal durante la telofase. Así mismo se observó la condensación del DNA en la periferia de la membrana nuclear, formando una estructura creciente, mientras que, en el control negativo, como es de esperarse, no se observó fragmentación del DNA (17, 18 y 19D).

En las figuras 17, 18 y 19A se observan en el panel 2 y 3 marcados con verde, a las 24 h de tratamiento la formación de cuerpos apoptóticos, detección de DNA fragmentado en toda la célula, así como el control positivo (UV) (17, 18 y 19C) características de apoptosis tardía. Además, se aprecia que, con la triple terapia, hay pérdida de adhesión celular, así como disminución en la proliferación, ya que hay separaciones entre las células en comparación con las células sin tratamiento donde se observó que las células se mantienen unidas (17, 18 y 19D).

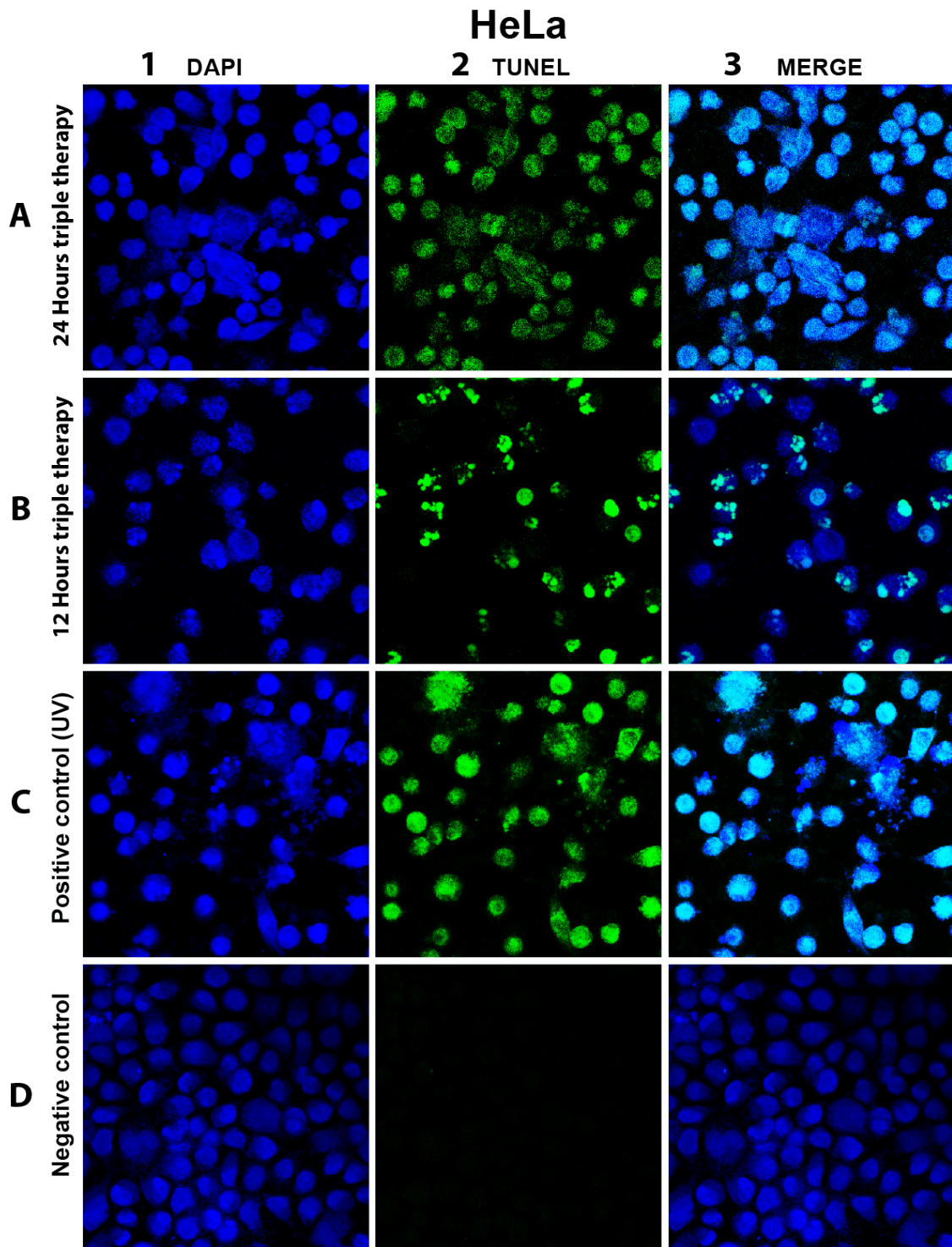


Figura 17: Aspecto morfológico de la fragmentación del ADN en Células HeLa. Imágenes de fluorescencia tomadas con microscopio confocal LEICA a 63x con DAPI (panel 1), TUNEL (panel 2) (marcado de final de corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa TUNEL) y MERGE (panel 3) en células HeLa sin tratamiento (D), UV (control positivo)(C) y triple terapia farmacológica a 12 (B) y 24 (A) h de exposición.

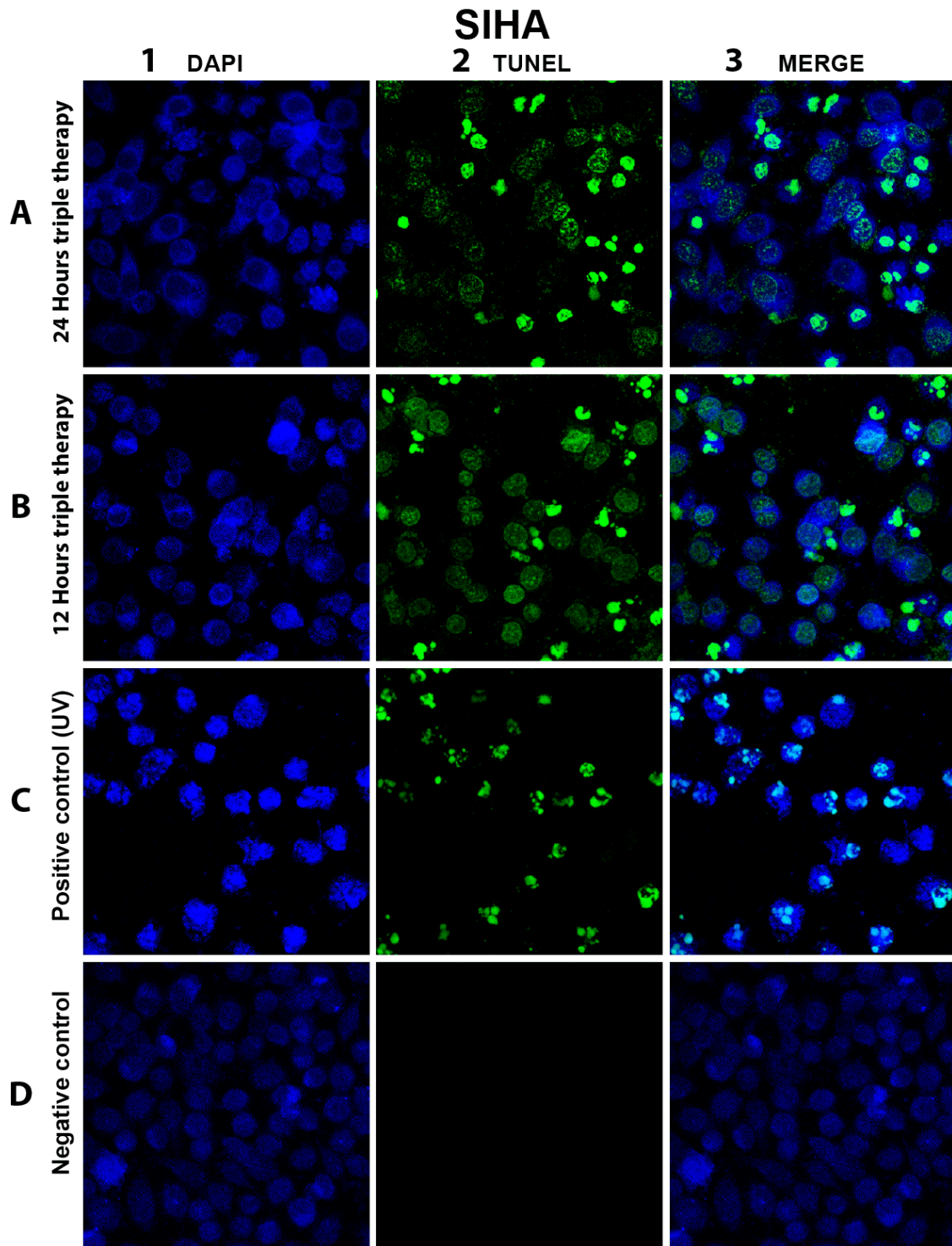
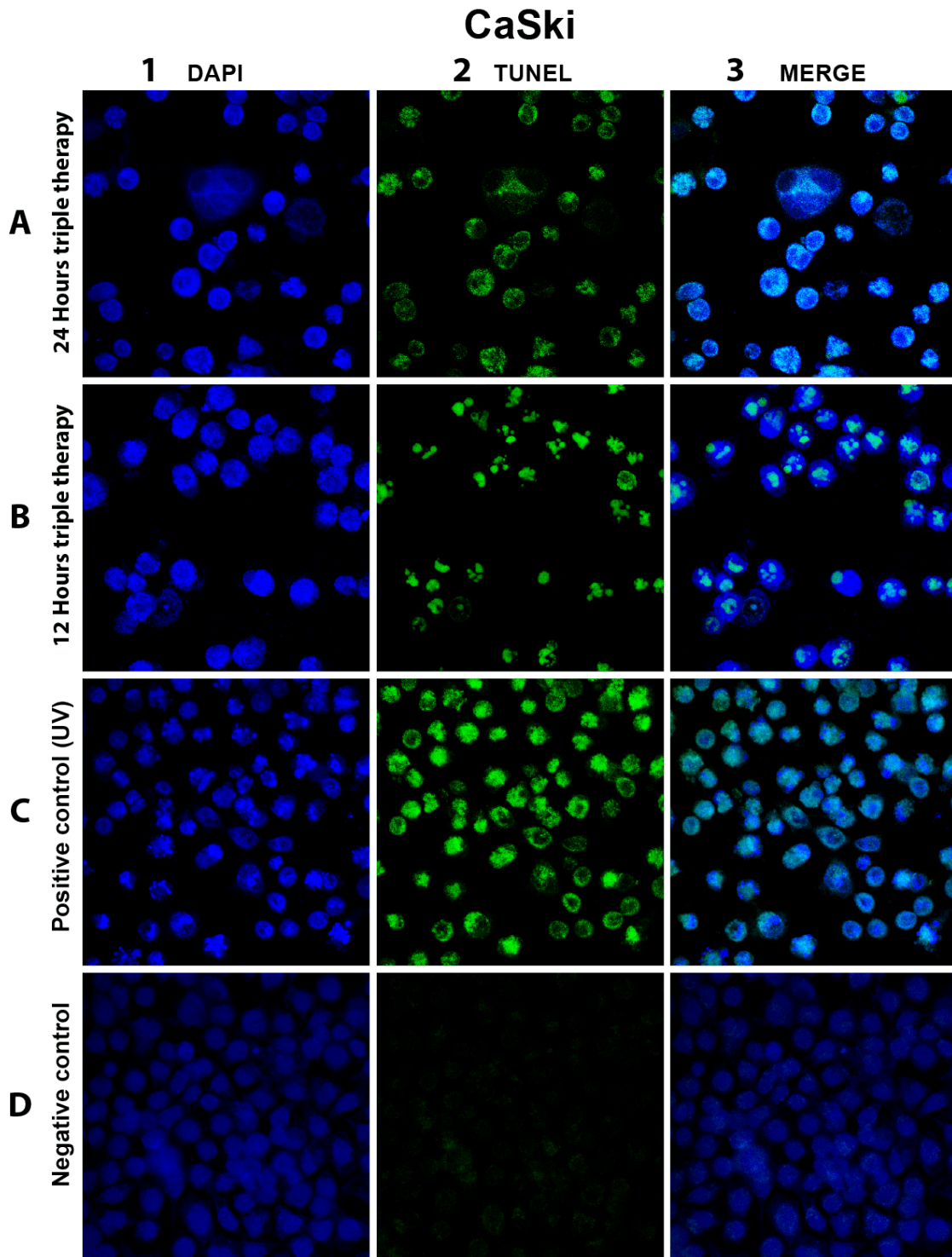


Figura 18: Aspecto morfológico de la fragmentación del ADN en células SiHa. Imágenes de fluorescencia tomadas con microscopio confocal LEICA a 63x con DAPI (panel 1), TUNEL (panel 2) (marcado de final de corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa TUNEL) y MERGE (panel 3) en células SiHa sin tratamiento(D), UV (control positivo)(C) y triple terapia farmacológica a 12(B) y 24 (A) h de exposición.



*Figura 19: Aspecto morfológico de la fragmentación del ADN en células CaSki. Imágenes de fluorescencia tomadas con microscopio confocal LEICA a 63x con DAPI (panel 1), TUNEL (panel 2) (marcado de final de corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa TUNEL) y MERGE (panel 3) en células CaSki sin tratamiento(D), UV (control positivo)(C) y triple terapia farmacológica a 12(B) y 24(A) h de exposición.*

## 9. Discusión

Las células de cáncer cervicouterino, tienen altas tasas glucolíticas (Martínez-Ramírez et al., 2018). La glucosa es utilizada como fuente de carbono para los procesos anabólicos necesarios para la proliferación y la generación de nucleótidos, lípidos y proteínas (Liberti y Locasale, 2016). Varios estudios sugieren que las vías metabólicas de la célula tumoral pueden llegar a ser blancos terapéuticos potenciales para la reducción de la progresión y crecimiento celular *in vitro* (Chaube et al., 2015; Kishton y Rathmell, 2015; Columbano y Giordano, 2017; García-Castillo et al., 2017; Luengo et al., 2017) promoviendo posiblemente procesos de muerte celular como apoptosis. En este estudio, se trabajó con la combinación farmacológica de metformina, oxamato de sodio y doxorubicina, que inducen apoptosis al inhibir las vías de generación de energía como glucólisis aeróbica y FOSOX, así como la síntesis de ácidos nucleicos.

Previamente en los resultados del laboratorio, se encontró la IC<sub>50</sub> de los fármacos individuales y en combinación para modelos *in vitro* e *in vivo* de cáncer de mama triple negativo (García-Castillo et al., 2017); observando que los fármacos individuales tienen una concentración mayor que la de las combinaciones. Similar a los resultados obtenidos en este trabajo donde las concentraciones que se obtuvieron para cáncer CaCu fueron: 25mM/ 20mM/ 1.5µM para Metformina, Oxamato y Doxorubicina, respectivamente a las 12 h, mientras que para las 24 h las IC<sub>50</sub> fueron de 20mM/ 15mM/ 1µM. Concentraciones por debajo de las dosis letales 50 (LD<sub>50</sub>) (Wishart et al., 2018) y menores a las concentraciones individuales reportadas previamente para cáncer de mama y cáncer colorectal (García-Castillo et al., 2017) (Figueroa-González et al., 2016).

La importancia de la sinergia de los tres fármacos se hace presente cuando se observa la diferencia entre los resultados obtenidos con esta terapia y cualquiera de los que se hallaron empleando los fármacos individualmente o en pares. La interacción sinérgica entre los fármacos Met, Ox y Dox es probablemente mediada por la inhibición simultánea del complejo I en la cadena transportadora de electrones (Met), la LDH-A (Ox) (Miskimins et al., 2014) y por el aumento de apoptosis causada por Dox (Jang et al., 2013).

En este trabajo, no se utilizaron los fármacos individuales puesto que se había observado previamente que no tenían efecto; tal como lo descrito por Zhao et al., 2015 donde evaluaron apoptosis temprana caracterizada por el plegamiento de la membrana y apoptosis tardía caracterizada por la disrupción de la membrana celular y fragmentación del DNA a través de citometría de flujo en células tratadas con oxamato, observando que inducen hasta 14% de apoptosis tardía, mientras que el 75% de células se encuentran viables. De manera similar Tian et al., 2016 observó que las células tratadas solo con metformina inducen hasta 6% de células en apoptosis tardía, mientras que el 76% de las células son viables.

En este trabajo se realizó la detección de apoptosis temprana y tardía por citometría de flujo encontrando que con la triple terapia farmacológica hay hasta 80% de las células en apoptosis tardía (células post-apoptóticas o secundarias necróticas) en las líneas celulares HeLa, SiHa y CaSki a 12 y 24 h (Patel et al., 2006). Se observó además que la línea celular CaSki, mostró resistencia tanto a la camptotecina como a radiación UV, sin embargo, con la triple terapia se induce apoptosis. Resultados similares a los reportados por García-Castillo et al., 2017 en donde demuestra que la triple terapia farmacológica induce apoptosis tardía en cáncer de mama desde las 24 h, mencionando que la triple terapia disminuyó el efecto citotóxico de la doxorubicina y restableció la capacidad de muerte de las células por apoptosis en cortos tiempos.

La apoptosis celular es un proceso biológico que está asociado con la activación de las caspasas. La caspasa-3 es un efector importante de la apoptosis que se activa mediante dos vías de señalización: la vía mediada por el receptor de la muerte, que involucra la caspasa-8 y la caspasa-10, y la vía mediada por las mitocondrias, con caspasa-9. En este trabajo a través de un perfil de proteínas involucradas en apoptosis se encontró que la triple terapia farmacológica a las 12 h indujo aumento en la detección de proteínas como: aumento en la detección de proteínas como BAD, (BCL2, agonista asociado a la muerte celular) es un miembro pro-apoptótico de la familia de Bcl-2, tiene un dominio only BH3 y participa en el inicio de la apoptosis. Se activa a través de la desfosforilación e interactúa con Bcl-2 y Bcl-xl. Esta inhibición permite la activación de Bax y Bak, para

inducir la apoptosis celular. Se ha reportado que la disminución de la proteína BAD contribuye a la inhibición del crecimiento tumoral; Jiang et al., 2013 descubrieron la sobreexpresión de BAD en líneas celulares de cáncer de pulmón y en ratones atímicos disminuía la proliferación celular y estaba asociado con un aumento en la apoptosis intrínseca, al observar aumento en la detección de proteínas como BAX, Citocromo C y caspasa 3. Resultado similar al encontrado en el perfil de proteínas, donde se observa un aumento en la detección de Bax, citocromo C y caspasa 3, pero no de caspasa-8, estos resultados nos indican que probablemente la triple terapia induce apoptosis intrínseca y no extrínseca.

Cabe destacar que a pesar que hay aumento en la detección de proteínas de la vía intrínseca de la apoptosis, también hay aumento en la detección de proteínas de la vía extrínseca como el receptor y ligando de Fas, así como el receptor y ligando del miembro de la familia de TNF, CD40; la unión del ligando a sus respectivos receptores conduce a la trimerización del receptor y a la formación del complejo de señalización inductor de muerte (DISC), la proteína adaptadora FADD se ancla en el DISC donde interactúan los dominios de muerte (DED) de ambas proteínas (Jan y Chaudhry, 2019). Este complejo, recluta a la procaspasa-8/10 donde interactúan con FADD a través de los dominios DED (Alcivar et al., 2003). La activación de la caspasa-8/10 puede tomar 2 vías: escisión de caspasa-3 o escisión de Bid (Kantari y Walczak, 2011).

En el primer caso, la caspasa-8/10 escinde directamente a la casapasa-3 y hay expresión baja o ausente de XIAP, sin embargo cuando hay abundante XIAP se inhibe la caspasa-3, por lo que la célula opta por la segunda vía: donde la caspasa-8/10 escinde a Bid en tBid (truncated Bid) la cual se une a regiones ricas de cardiolipina en la mitocondria formando un poro para producir la liberación de citocromo c, para la formación del apoptosoma y activación de la caspasa-9, así como la liberación de Smac / DIABLO para la neutralización de XIAP, conduciendo a la activación de los efectores: caspasa-3, -7 y finalmente la inducción de apoptosis (Kantari y Walczak, 2011). Esto concuerda con los resultados de este trabajo, donde se observó un aumento en la detección de proteínas como CD40R, CD40L, Fas-R, Fas-L, XIAP y SMAC. Sin embargo, como ya se mencionó,

no hay un aumento en la detección de la caspasa-8, iniciadora de la vía extrínseca. Kantari y Walczak, 2011, mencionan que la caspasa-10 al igual que la caspasa-8 tiene dominio DED en tándem, de esta manera la caspasa-10 podría estar tomando el lugar de la caspasa-8 (Alcivar et al., 2003) sugiriendo que la triple terapia farmacológica podría estar induciendo apoptosis extrínseca mediada por mitocondrias en las células CaCu.

Otro inhibidor que se encontró sobreexpresado en el perfil de proteínas involucradas en apoptosis fue survivina, proteína que se activa en respuesta a estímulos apoptóticos e inhibe la activación de la caspasa-9, SMAC / DIABLO y la unión con XIAP para mejorar su actividad inhibitoria (Garg et al., 2016). Se ha demostrado que la proteína Survivina se asocia con SMAC / DIABLO y caspasa-3 inhibiendo la apoptosis (Song et al., 2003). De acuerdo con los resultados reportados en este trabajo, la sobreexpresión de survivina en las células tratadas con la triple terapia farmacológica esta relaciona con el aumento de proteínas proapoptóticas, como caspasas y SMAC, objetivos directos de survivina.

Así mismo en respuesta al estímulo apoptótico, se induce el aumento de la expresión de la familia de proteínas de choque térmico (HSP). La expresión de Hsp70 inducida por el estrés protege a las células de la muerte celular, al inhibir la apoptosis extrínseca mediante la inhibición de la escisión de Bid a través de la inactivación de caspasa-8/10; y la apoptosis extrínseca mediante la activación de la vía de señalización de PI3K/Akt que regula negativamente a Bad y caspasa-9 (Kumar et al., 2016). Mientras que la HSP60 está involucrada en el plegamiento de proteínas de las mitocondrias, evitando así la agregación de proteínas que es especialmente necesaria en condiciones de estrés celular. Se ha visto que HSP60 inhibe al citocromo c, impidiendo que se desencadene la apoptosis (Wiechmann et al., 2017).

Estos datos sugieren que la proporción de miembros pro y anti-apoptóticos inducidos por la triple terapia farmacológica a las 12 h de exposición se mantiene equitativo, sin embargo, a mayor exposición, hay un aumento en las proteínas proapoptóticas y una disminución en las proteínas antiapoptóticas. Debido al papel que juega la caspasa-3 como ejecutor, también se detectaron niveles de expresión de caspasa-3 para confirmar



la apoptosis celular. Los resultados demostraron que hubo un aumento en la caspasa-3 escindida indicando que las células estaban experimentando apoptosis, así mismo la detección de XIAP fue menor a 24 h.

La apoptosis es un proceso complejo de múltiples pasos que involucra una serie de señales biológicas. Su caracterización incluye cambios morfológicos como contracción celular, condensación de cromatina, fragmentación nuclear y protuberancias de membrana citoplasmática (Su et al., 2019). Por lo general, se requieren varias h desde el inicio hasta la culminación de la muerte y estos eventos van a depender del ciclo celular de la célula, el estímulo y la vía apoptótica.

Las características morfológicas tempranas de la apoptosis en el núcleo son la condensación de cromatina y la fragmentación nuclear. La condensación comienza en la periferia de la membrana nuclear, formando una estructura creciente. Durante las etapas posteriores de la apoptosis, el núcleo se condensa más. Estas características morfológicas se caracterizan por la escisión de las caspasas. Así mismo en esta etapa la laminina es capaz de mantener la integridad estructural del núcleo. Otra característica importante es que las células pierden contacto con las células vecinas ya que cuando se induce la apoptosis, la caspasa-3 se activa y escinde a  $\beta$ -catenina en el extremo amino y carboxilo, desestabilizando las uniones adherentes (Suzanne y Steller, 2009). Estos datos concuerdan con los datos obtenidos en este trabajo, como se observa en las figuras 17, 18, 19, A y B, donde las células tratadas con la triple terapia farmacológica a las 12 h muestra núcleos condensados y fragmentados, así mismo se observa que las células pierden contacto unas con otras a 12 y a 24 h de tratamiento. Estos resultados son consistentes con los encontrados por Dietz et al., 2019 en donde observaron que en células apoptóticas de cáncer de pulmón, mostraban menor adherencia que las células control, mencionaban además que la adherencia estaba mediada por SOX2. Así mismo, (Utani et al., 2010) indujo apoptosis en células HeLa, observando que, en las primeras horas, se observa la formación de micronúcleos mediados por la pérdida total de p53.

Durante el paso final de la ejecución de la apoptosis, morfológicamente, la membrana plasmática forma protuberancias circulares, las cuales se separarán de la célula para generación de cuerpos apoptóticos. Se ha demostrado que estas protuberancias son formadas por caspasa-3 a través de la activación de ROCK1, permitiendo la fosforilación de la proteína MLC (cadena ligera de miosina). La fosforilación de MLC por ROCK1 promueve la contracción de actomiosina y reorganización del citoesqueleto, conduciendo a la formación de protuberancias (Zhang et al., 2018). Posteriormente, las células se encogen y finalmente las protuberancias se separan formando cuerpos apoptóticos (Ziegler y Groscurth, 2004). En los resultados de este trabajo, se observa que las células tratadas con la triple terapia farmacológica a 24 h comienza la formación de cuerpos apoptóticos, por lo que esto nos sugiere que las células no han concluido la apoptosis.

Nuestros resultados demostraron que la combinación de Metformina, Oxamato y Doxorrubicina conduce a la apoptosis mediada por mitocondria, a través de ambas vías (intrínseca y extrínseca), probablemente por la interacción sinérgica entre los fármacos con la inhibición simultánea del complejo I en la cadena transportadora de electrones (Met), la LDH-A (Ox) (Miskimins et al., 2014) y por el aumento de apoptosis causada por Dox (Jang, Jeong, et al., 2013). Este trabajo nos permite elucidar que el posible mecanismo de acción de estos fármacos se basa en la inhibición de las vías de generación de energía de la célula tumoral: la glucólisis; la vía de mTOR y síntesis de DNA. De esta manera la inhibición combinada de la vía glucolítica posiblemente podría dar lugar al agotamiento completo de ATP celular y a su vez al aumento de la apoptosis mediada por mitocondria.

## 10. Conclusión

- Se comprobó que la terapia combinatoria farmacológica de Doxorubicina/Metformina/Oxamato de sodio induce apoptosis tardía desde las 12 horas de exposición.
- Se determinó que la triple terapia induce la activación de caspasa 3, así como proteínas pro-apoptóticas como BAD, BAX, citocromo c, y proteínas anti apoptóticas como BCL2, XIAP, survivina, etc, sugiriendo que se está llevando a cabo apoptosis dependiente de mitocondria.
- Se comprobó que la triple terapia induce cambios morfológicos involucrados en apoptosis, como la detección de micronúcleos, fragmentación de DNA y formación de cuerpos apoptóticos en las células de cáncer cervicouterino.

## 11. Referencias

- Aggarwal, A., Unger-Saldaña, K., Lewison, G., Sullivan, R. 2015. The challenge of cancer in middle-income countries with an ageing population: Mexico as a case study. *ecancermedicalscience* 9: .
- Alcivar, A., Hu, S., Tang, J., Yang, X. 2003. DEDD and DEDD2 associate with caspase-8/10 and signal cell death. *Oncogene* 22: 291-297.
- de Almagro, M.C., Vucic, D. 2012. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Experimental Oncology* 34: 200-211.
- Ben Sahra, I., Laurent, K., Loubat, A., Giorgetti-Peraldi, S., Colosetti, P., Auburger, P., Tanti, J.F. et al. 2008. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene* 27: 3576-3586.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. 2002. *Biochemistry*. 5th ed. W H Freeman.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68: 394-424.
- Cairns, R.A., Harris, I.S., Mak, T.W. 2011. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews. Cancer* 11: 85-95.
- Chaube, B., Malvi, P., Singh, S.V., Mohammad, N., Meena, A.S., Bhat, M.K. 2015. Targeting metabolic flexibility by simultaneously inhibiting respiratory complex I and lactate generation retards melanoma progression. *Oncotarget* 6: 37281-37299.
- Columbano, A., Giordano, S. 2017. Editorial: Metabolism As a Therapeutic Target. *Frontiers in Oncology* 7: .

- Dasari, S., Tchounwou, P.B. 2014. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology* 0: 364-378.
- Dietz, C., Infanger, M., Romswinkel, A., Strube, F., Kraus, A. 2019. Apoptosis Induction and Alteration of Cell Adherence in Human Lung Cancer Cells under Simulated Microgravity. *International Journal of Molecular Sciences* 20: .
- Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C., Murakami, I. 2015. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in Medical Virology* 25 Suppl 1: 2-23.
- Feng, Y., Ke, C., Tang, Q., Dong, H., Zheng, X., Lin, W., Ke, J. et al. 2014. Metformin promotes autophagy and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma by downregulating Stat3 signaling. *Cell Death & Disease* 5: e1088.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M. et al. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 136: E359-386.
- Figuerola-González, G., García-Castillo, V., Coronel-Hernández, J., López-Urrutia, E., León-Cabrera, S., Arias-Romero, L.E., Terrazas, L. et al. 2016. Anti-inflammatory and Antitumor Activity of a Triple Therapy for a Colitis-Related Colorectal Cancer. *Journal of Cancer* 7: 1632-1644.
- Filippova, M., Filippov, V., Williams, V.M., Zhang, K., Kokoza, A., Bashkirova, S., Duerksen-Hughes, P. 2014. Cellular Levels of Oxidative Stress Affect the Response of Cervical Cancer Cells to Chemotherapeutic Agents. *BioMed Research International*. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/574659/> [Accedido 14 de julio de 2018].
- Fraczkowska, K., Bacia, M., Przybyło, M., Drabik, D., Kaczorowska, A., Rybka, J.,

- Stefanko, E. et al. 2018. Alterations of biomechanics in cancer and normal cells induced by doxorubicin. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 97: 1195-1203.
- García-Castillo, V., López-Urrutia, E., Villanueva-Sánchez, O., Ávila-Rodríguez, M.Á., Zentella-Dehesa, A., Cortés-González, C., López-Camarillo, C. et al. 2017. Targeting Metabolic Remodeling in Triple Negative Breast Cancer in a Murine Model. *Journal of Cancer* 8: 178-189.
- Garg, H., Suri, P., Gupta, J.C., Talwar, G.P., Dubey, S. 2016. Survivin: a unique target for tumor therapy. *Cancer Cell International* 16: .
- Glick, D., Barth, S., Macleod, K.F. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology* 221: 3-12.
- Granchi, C., Paterni, I., Rani, R., Minutolo, F. 2013. Small-molecule inhibitors of human LDH5. *Future Medicinal Chemistry* 5: 1967-1991.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.
- Harden, M.E., Munger, K. 2017. Human papillomavirus molecular biology. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research* 772: 3-12.
- Hassanpour, H., Dehghani, M. 2017. Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice* 4: 127-129.
- zur Hausen, H. 2009. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology* 384: 260-265.
- Hietanen, S., Lain, S., Krausz, E., Blattner, C., Lane, D.P. 2000. Activation of p53 in cervical carcinoma cells by small molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 8501-8506.

- Hua, H., Kong, Q., Zhang, H., Wang, J., Luo, T., Jiang, Y. 2019. Targeting mTOR for cancer therapy. *Journal of Hematology & Oncology* 12: .
- Ilagan, E., Manning, B.D. 2016. Emerging role of mTOR in the response to cancer therapeutics. *Trends in cancer* 2: 241-251.
- Imai, A., Ichigo, S., Matsunami, K., Takagi, H., Yasuda, K. 2015. Clinical benefits of metformin in gynecologic oncology. *Oncology Letters* 10: 577-582.
- Jan, R., Chaudhry, G.-S. 2019. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 9: 205-218.
- Jang, M., Kim, S.S., Lee, J. 2013. Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. *Experimental & Molecular Medicine* 45: e45.
- Jiang, L., Luo, M., Liu, D., Chen, B., Zhang, W., Mai, L., Zeng, J. et al. 2013. BAD overexpression inhibits cell growth and induces apoptosis via mitochondrial-dependent pathway in non-small cell lung cancer. *Cancer Cell International* 13: 53.
- Kantari, C., Walczak, H. 2011. Caspase-8 and Bid: Caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813: 558-563.
- Kishton, R.J., Rathmell, J.C. 2015. Novel Therapeutic Targets of Tumor Metabolism. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)* 21: 62-69.
- Kumar, S., Stokes, J., Singh, U.P., Gunn, K.S., Acharya, A., Manne, U., Mishra, M. 2016. Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. *Cancer letters* 374: 156-166.
- Kumral, A., Giriş, M., Soluk-Tekkeşin, M., Olgaç, V., Doğru-Abbasoğlu, S., Türkoğlu, Ü., Uysal, M. 2015. Effect of olive leaf extract treatment on doxorubicin-induced cardiac, hepatic and renal toxicity in rats. *Pathophysiology: The Official Journal of the International Society for Pathophysiology* 22: 117-123.

- Kurita, T. 2018. Cervix: Cell Biology. En *Reference Module in Biomedical Sciences*, Elsevier.
- Laplante, M., Sabatini, D.M. 2012a. mTOR Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4: .
- Laplante, M., Sabatini, D.M. 2009. mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science* 122: 3589-3594.
- Laplante, M., Sabatini, D.M. 2012b. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149: 274-293.
- Lea, M.A., Guzman, Y., Desbordes, C. 2016. Inhibition of Growth by Combined Treatment with Inhibitors of Lactate Dehydrogenase and either Phenformin or Inhibitors of 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase 3. *Anticancer Research* 36: 1479-1488.
- Leone, A., Di Gennaro, E., Bruzzese, F., Avallone, A., Budillon, A. 2014. New perspective for an old antidiabetic drug: metformin as anticancer agent. *Cancer Treatment and Research* 159: 355-376.
- Liberti, M.V., Locasale, J.W. 2016. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in biochemical sciences* 41: 211-218.
- Luengo, A., Gui, D.Y., Vander Heiden, M.G. 2017. Targeting Metabolism for Cancer Therapy. *Cell chemical biology* 24: 1161-1180.
- Madan, E., Gogna, R., Bhatt, M., Pati, U., Kuppusamy, P., Mahdi, A.A. 2011. Regulation of glucose metabolism by p53: Emerging new roles for the tumor suppressor. *Oncotarget* 2: 948-957.
- Magaldi, T.G., Almstead, L.L., Bellone, S., Prevatt, E.G., Santin, A.D., DiMaio, D. 2012. Primary human cervical carcinoma cells require human papillomavirus E6 and E7



- expression for ongoing proliferation. *Virology* 422: 114-124.
- Mahendroo, M., Nallasamy, S. 2018. Cervix. En *Reference Module in Biomedical Sciences*, Elsevier.
- Martin, D.E., Hall, M.N. 2005. The expanding TOR signaling network. *Current Opinion in Cell Biology* 17: 158-166.
- Martínez-Ramírez, I., Carrillo-García, A., Contreras-Paredes, A., Ortiz-Sánchez, E., Cruz-Gregorio, A., Lizano, M. 2018. Regulation of Cellular Metabolism by High-Risk Human Papillomaviruses. *International Journal of Molecular Sciences* 19: .
- Matoba, S., Kang, J.-G., Patino, W.D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P.J. et al. 2006. p53 Regulates Mitochondrial Respiration. *Science* 312: 1650-1653.
- Meng, X., Zhang, Q., Zheng, G., Pang, R., Hua, T., Yang, S., Li, J. 2014. Doxorubicin combined with celecoxib inhibits tumor growth of medullary thyroid carcinoma in xenografted mice. *Oncology Letters* 7: 2053-2058.
- 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: e85576.
- Nagao, A., Kobayashi, M., Koyasu, S., Chow, C.C.T., Harada, H. 2019. HIF-1-Dependent Reprogramming of Glucose Metabolic Pathway of Cancer Cells and Its Therapeutic Significance. *International Journal of Molecular Sciences* 20: .
- Oyervides-Muñoz, M.A., Pérez-Maya, A.A., Rodríguez-Gutiérrez, H.F., Macias, G.S.G., Fajardo-Ramírez, O.R., Treviño, V., Barrera-Saldaña, H.A., Garza-Rodríguez, M.L. 2018. Understanding the HPV integration and its progression to cervical cancer. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*.
- Paquette, M., El-Houjeiri, L., Pause, A. 2018. mTOR Pathways in Cancer and Autophagy.

*Cancers* 10: .

- Patel, V.A., Longacre, A., Hsiao, K., Fan, H., Meng, F., Mitchell, J.E., Rauch, J. et al. 2006. Apoptotic Cells, at All Stages of the Death Process, Trigger Characteristic Signaling Events That Are Divergent from and Dominant over Those Triggered by Necrotic Cells. *The Journal of biological chemistry* 281: 4663-4670.
- Porstmann, T., Santos, C.R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Leever, S., Griffiths, J.R. et al. 2008. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metabolism* 8: 224-236.
- Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M., Greenwood, M.T. 2011. Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1813: 238-259.
- Rathore, K., Cekanova, M. 2015. A novel derivative of doxorubicin, AD198, inhibits canine transitional cell carcinoma and osteosarcoma cells in vitro. *Drug Design, Development and Therapy* 9: 5323-5335.
- Schiffman, M., Doorbar, J., Wentzensen, N., Sanjosé, S. de, Fakhry, C., Monk, B.J., Stanley, M.A., Franceschi, S. 2016. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers* 2: 16086.
- Song, Z., Yao, X., Wu, M. 2003. Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 23130-23140.
- Stubbs, M., Griffiths, J.R. 2010. The altered metabolism of tumors: HIF-1 and its role in the Warburg effect. *Advances in Enzyme Regulation* 50: 44-55.
- Su, X., Zhang, L., Kang, H., Zhang, B., Bao, G., Wang, J. 2019. Mechanical, nanomorphological and biological reconstruction of early-stage apoptosis in HeLa cells induced by cytochalasin B. *Oncology Reports* 41: 928-938.

- Suzanne, M., Steller, H. 2009. Letting go: modification of cell adhesion during apoptosis. *Journal of Biology* 8: 49.
- Takahashi, A., Kimura, F., Yamanaka, A., Takebayashi, A., Kita, N., Takahashi, K., Murakami, T. 2014. Metformin impairs growth of endometrial cancer cells via cell cycle arrest and concomitant autophagy and apoptosis. *Cancer Cell International* 14: 53.
- Tian, Y., Tang, B., Wang, C., Sun, D., Zhang, R., Luo, N., Han, Z. et al. 2016. Metformin mediates resensitization to 5-fluorouracil in hepatocellular carcinoma via the suppression of YAP. *Oncotarget* 7: 46230-46241.
- Utani, K., Kohno, Y., Okamoto, A., Shimizu, N. 2010. Emergence of Micronuclei and Their Effects on the Fate of Cells under Replication Stress. *PLOS ONE* 5: e10089.
- Vichai, V., Kirtikara, K. 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols* 1: 1112-1116.
- Wiechmann, K., Müller, H., König, S., Wielsch, N., Svatoš, A., Jauch, J., Werz, O. 2017. Mitochondrial Chaperonin HSP60 Is the Apoptosis-Related Target for Myrtucommulone. *Cell Chemical Biology* 24: 614-623.e6.
- Wishart, D.S., Feunang, Y.D., Guo, A.C., Lo, E.J., Marcu, A., Grant, J.R., Sajed, T. et al. 2018. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Research* 46: D1074-D1082.
- Wong-Baeza, C., Noguera-Torres, B., Serna, M., Meza-Toledo, S., Baeza, I., Wong, C. 2015. Trypanocidal effect of the benzyl ester of N-propyl oxamate: a bi-potential prodrug for the treatment of experimental Chagas disease. *BMC Pharmacology & Toxicology* 16: .
- Wu, W., Zhao, S. 2013. Metabolic changes in cancer: beyond the Warburg effect. *Acta*

*Biochimica Et Biophysica Sinica* 45: 18-26.

Xintaropoulou, C., Ward, C., Wise, A., Marston, H., Turnbull, A., Langdon, S.P. 2015. A comparative analysis of inhibitors of the glycolysis pathway in breast and ovarian cancer cell line models. *Oncotarget* 6: 25677-25695.

Yang, Y., Su, D., Zhao, L., Zhang, D., Xu, J., Wan, J., Fan, S., Chen, M. 2014. Different effects of LDH-A inhibition by oxamate in non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget* 5: 11886-11896.

Zhang, Y., Chen, X., Gueydan, C., Han, J. 2018. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Research* 28: 9-21.

Zhao, Z., Han, F., Yang, S., Wu, J., Zhan, W. 2015. Oxamate-mediated inhibition of lactate dehydrogenase induces protective autophagy in gastric cancer cells: involvement of the Akt-mTOR signaling pathway. *Cancer Letters* 358: 17-26.

Zheng, J. 2012. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). *Oncology Letters* 4: 1151-1157.

Ziegler, U., Groscurth, P. 2004. Morphological Features of Cell Death. *Physiology* 19: 124-128.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00211

Matrícula: 2173801246

Determinación de la vía de apoptosis inducida en cáncer cérvico-uterino a través de la combinación farmacológica de Metformina, Oxamato de Sodio y Doxorubicina en un modelo in vitro

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 17 del mes de enero del año 2020 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA  
DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA  
DRA. GABRIELA FIGUEROA GONZALEZ  
DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ



ROCIO IZAMARY DELGADO WALDO  
ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: ROCIO IZAMARY DELGADO WALDO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA

VOCAL

DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA

VOCAL

DRA. GABRIELA FIGUEROA GONZALEZ

SECRETARIO

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ