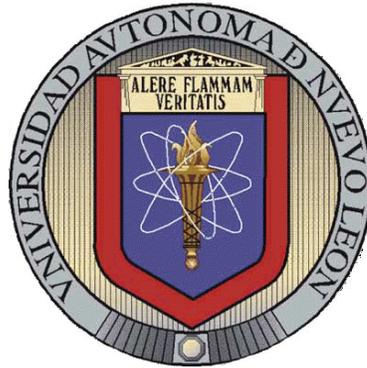


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFFECTO DEL DICLOROACETATO DE SODIO SOBRE LÍNEAS CELULARES DE
CÁNCER *IN VITRO* Y SOBRE UN MODELO DE MELANOMA MURINO

Por

Q. B. P. CRYSTEL ALEYVICK SIERRA RIVERA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGÍA

Octubre 2011

EFFECTO DEL DICLOROACETATO DE SODIO SOBRE LÍNEAS CELULARES DE
CÁNCER *IN VITRO* Y SOBRE UN MODELO DE MELANOMA MURINO

Comité de tesis

Director de tesis

Dr. Moisés Armides Franco Molina

Asesor externo

Dr. Arturo Chávez Reyes

Secretario

Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Vocal

Dr. Pablo Zapata Benavides

Vocal

Dr. Edgar Mendoza Gamboa

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Moisés Armides Franco Molina.

DEDICATORIA

A mami y papi:

Virginia Rivera Guzmán y Alejandro Sierra Gutiérrez

Gracias por su confianza, apoyo y amor incondicional que me han dado siempre, por estar presentes en momentos felices y sobre todo en los difíciles, ayudándome a solucionar los obstáculos que se me han presentado en el camino, con los cuales hemos aprendido juntos. Gracias por motivarme y orientarme en el trayecto de mi vida, guiándome a tomar las mejores decisiones. Esta meta más cumplida también es un logro suyo, porque gracias a ustedes he podido llegar hasta el día de hoy.

Recuerden que siempre los voy a querer mucho!!!

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a mis ángeles por estar siempre cuidándome y ayudándome a salir adelante, dándome fortaleza para culminar con mis objetivos.

Al Dr. Moisés A. Franco Molina, por ser mi director, asesor de tesis y amigo, pero especialmente por los consejos y el apoyo brindado en los momentos difíciles. Gracias por todos los conocimientos transmitidos a lo largo de este tiempo y principalmente por ayudarme a crecer como persona y profesionalmente.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, por todo su apoyo y por permitirme desarrollar este proyecto en el Laboratorio de Inmunología y Virología.

Al Dr. Pablo Zapata, Dr. Edgar Mendoza Gamboa y Dr. Arturo Chávez por su disponibilidad para ayudarme en el área experimental, por proporcionar sus conocimientos y reactivos para desarrollar este proyecto.

A todos los maestros que de manera directa e indirecta, han participado en mi desarrollo profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado durante la realización de este trabajo.

A mis amigos y compañeros de maestría: Edgarito, José Juan (alias Malva), Luigi, Luisillo por estar conmigo por largas horas de trabajo en el lab, mientras platicábamos amablemente jajaja.... A Gerardo, Nacho, Lula, Diana, Marisol, Faby, Cyntia, Karlilla, Jessy, Emanuel, por estar en las buenas y en las malas.

A todos los integrantes de otros laboratorios del Departamento de Inmunología y Virología por su gran ayuda y amabilidad: Edgar, Chago, Beto, Ashanti, Lizz, Jinny, Regina, Ángel, Claudio, Manuel, Itza, Teo, y a todas las personas que de alguna u otra forma colaboraron en la realización de esta tesis.

“Ten en cuenta que el gran amor y los grandes logros requieren grandes riesgos”

Dalai Lama

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
NOMENCLATURA	xv
RESUMEN	xix
ABSTRACT	xxi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	3
3. OBJETIVOS	4
3.1 Objetivo General	4
3.2 Objetivos Específicos	5
4. ANTECEDENTES	6
4.1 Glicólisis	6
4.2 Metabolismo tumoral: Glicólisis aeróbica	7
4.2.1 Glicólisis aeróbica asociada a la resistencia tumoral	9
4.2.2 Mitocondria y apoptosis	15

4.3 Dicloroacetato de sodio (DCA-Na)	18
4.3.1 Farmacología clínica	18
4.3.2 Cinética, absorción y eliminación	19
4.3.3 Efectos sobre el metabolismo	20
4.3.4 Estudios <i>in vitro</i>	23
4.3.5 Estudios <i>in vivo</i>	27
4.3.6 Ensayos clínicos con DCA en humanos	28
4.3.7 Otros usos terapéuticos del DCA en la clínica	29
4.3.8 Toxicidad o efectos secundarios	31
5. MÉTODOS	33
5.1 Cultivos celulares	33
5.2 Obtención y cultivo de macrófagos peritoneales murinos	33
5.3 Dicloroacetato de sodio (DCA-Na)	34
5.4 Evaluación de la viabilidad celular relativa mediante el ensayo de proliferación celular (MTT)	34
5.5 Determinación de senescencia asociada a β -galactosidasa	35
5.6 Determinación de cambios morfológicos por naranja de acridina-bromuro de etidio y detección de apoptosis mediante la técnica de TUNEL	35
5.7 Determinación de la actividad de LDH	36
5.8 Determinación de la actividad de PKA dependiente de AMP cíclico	37

5.9 Extracción de RNA	38
5.9.1 Síntesis de DNA complementario (DNAc)	38
5.10 Determinación de la unión de HIF-1 α al DNA	40
5.11 Determinación de la invasión celular	41
5.12 Determinación de angiogénesis	41
5.13 Animales	43
5.14 Establecimiento del modelo de melanoma murino	43
5.15 Análisis histológicos	44
5.16 Análisis estadístico	44
6. RESULTADOS	45
6.1 El DCA-Na disminuye la VCR de líneas celulares de cáncer sin afectar la viabilidad celular de macrófagos peritoneales murinos	45
6.2 El DCA-Na no induce senescencia en la línea celular B16F10	50
6.3 El DCA-Na induce cambios morfológicos y muerte celular por apoptosis en la línea celular B16F10	52
6.4 El DCA-Na disminuye la actividad de LDH en la línea celular B16F10	55
6.5 El DCA-Na inhibe la actividad de PKA dependiente de AMP cíclico en la línea celular B16F10	57
6.6 El DCA-Na disminuye la expresión de GAPDH en la línea celular B16F10	59

6.7 El DCA-Na afecta la capacidad angiogénica, disminuyendo la unión de HIF-1 α al DNA, invasión y formación de estructuras pro-angiogénicas en la línea celular B16F10	60
6.8 Efecto del DCA-Na sobre la sobrevivencia y mortalidad en ratones C57BL/6 inoculados con células de melanoma murino B16F10	65
6.9 Efecto del DCA-Na sobre el peso corporal, peso-volumen tumoral y metástasis en ratones C57BL/6 inoculados con células de melanoma murino B16F10	67
6.10 Hallazgos patológicos en ratones C57BL/6 inoculados con células de melanoma B16F10 tratados con DCA-Na	70
7. DISCUSION	72
8. CONCLUSIONES	78
LITERATURA CITADA	80
RESUMEN BIOGRÁFICO	91

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Protocolos clínicos con el DCA	29
Tabla 2. Efecto del DCA-Na sobre la VCR en las líneas celulares de cáncer	46
Tabla 3. Efecto del DCA-Na sobre la VCR en la línea celular B16F10	48
Tabla 4. Efecto del DCA-Na sobre el porcentaje de invasión en la línea celular B16F10	63
Tabla 5. Media del tiempo de aparición del tumor, % sobrevivencia, media y porcentaje de mortalidad en ratones C57BL/6 inoculados con células de melanoma murino B16F10	66
Tabla 6. Determinación de la presencia de metástasis en ratones C57BL/6 inoculados con células de melanoma murino B16F10	68

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Metabolismo de la glucosa	7
Figura 2. Representación esquemática de las diferencias entre fosforilación oxidativa, glicólisis anaeróbica y glicólisis aeróbica (Efecto Warburg)	8
Figura 3. Reguladores de la vía glicolítica	10
Figura 4. Regulación de la activación de HIF	11
Figura 5. Sitios de unión del factor de transcripción dentro del promotor proximal del gen que codifica a LDH-A	13
Figura 6. Activación de PKA dependiente de AMP cíclico	13
Figura 7. Diferencia entre la glicólisis y la oxidación de la glucosa	14
Figura 8. Apoptosis dependiente de la mitocondria	16
Figura 9. Estructura química del DCA-Na	18
Figura 10. Formación de Acetil CoA	22
Figura 11. Regulación de la actividad del complejo PDH mediante fosforilación	22
Figura 12. Mecanismo de acción dual del mitaplatino	27
Figura 13. Ciclos de amplificación para β -actina, GAPDH y 18s ribosomal	39
Figura 14. Efecto del DCA-Na sobre la VCR en las líneas celulares de cáncer TC-1, Hela, PC3 y DU145	45

Figura 15. Efecto del DCA-Na sobre la VCR en las líneas celulares de cáncer Huh-7, Iner-51, MDAMB-231 y MCF-7	45
Figura 16. Efecto del DCA-Na sobre la VCR en la línea celular B16F10	47
Figura 17. Efecto del DCA-Na sobre la morfología en la línea celular B16F10	48
Figura 18. Efecto del DCA-Na sobre la VCR en macrófagos peritoneales murinos	49
Figura 19. Efecto del DCA-Na sobre la senescencia en la línea celular B16F10	51
Figura 20. Efecto del DCA-Na sobre la fragmentación nucleosomal en la línea celular B16F10	53
Figura 21. Efecto apoptótico del DCA-Na en la línea celular B16F10	54
Figura 22. Actividad de LDH en la línea celular B16F10 tratada con DCA-Na	56
Figura 23. Actividad de PKA dependiente de AMP cíclico en la línea celular B16F10 tratada con DCA-Na	58
Figura 24. Expresión del RNAm de GAPDH en la línea celular B16F10 tratada con DCA-Na	59
Figura 25. Actividad de unión del HIF-1 α al DNA en la línea celular B16F10 tratada con DCA-Na	61
Figura 26. Efecto del DCA-Na sobre la invasión en la línea celular B16F10	62
Figura 27. Efecto del DCA-Na sobre la angiogénesis en la línea celular B16F10	64

Figura 28. Efecto del DCA-Na sobre el índice de peso corporal en ratones C57BL/6 inoculados con células de melanoma murino B16F10	67
Figura 29. Efecto del DCA-Na sobre el peso tumoral de ratones C57BL/6 inoculados con células de melanoma murino B16F10	68
Figura 30. Efecto del DCA-Na sobre el volumen tumoral en ratones C57BL/6 inoculados con células de melanoma murino B16F10	69
Figura 31. Efecto del DCA-Na sobre el desarrollo tumoral en ratones C57BL/6 inoculados con células de melanoma murino B16F10	71

NOMENCLATURA

Acetil CoA	Acetil coenzima A
AIF	Factor inductor de apoptosis
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ATP	Adenosin trifosfato
BrPA	Bromopiruvato
Ca ²⁺	Calcio
CO ₂	Dióxido de carbono
COPD	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
DCA	Dicloroacetato
DCA-Na	Dicloroacetato de sodio
DEPC	Dietilpirocarbonato
DL ₂₀	Dosis letal 20 porciento
DL ₅₀	Dosis letal 50 porciento
DL ₉₀	Dosis letal 90 porciento
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
EPA	Agencia de protección ambiental
FAD	Flavin adenina mononucleotido reducido
FH	Fumarato hidrolasa

g	Gramos
GAPDH	Gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa
GSSG	Glutación oxidasa
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HIF-1 α	Factor inductor de hipoxia 1- alfa
<i>i.p.</i>	Intraperitoneal
IIA	Iodoacetato
IL-6	Interleucina-6
KDa	Kilodaltones
Kg	Kilogramos
LDH	Lactato deshidrogenasa
MAAI	Isomerasa maleilacetoacetato
MCT's	Transportadores de monocarboxilato
MELAS	Síndrome de miopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios parecidos a epilepsia
mg	Miligramos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
mL	Mililitros

mM	Milimolar
MPO	Mieloperoxidasa
MTP's	Poros de transición mitocondrial
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NaCl	Cloruro de sodio
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida adenina
NADH	Dinucleótido de nicotinamida adenina
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NSCLC	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
O ₂	Oxígeno
OLT	Transplante ortópico de hígado
OMS	Organización mundial de la salud
pVHL	Proteína von hippel-lindau
pb	Pares de bases
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PDK	Piruvato kinasa
PET	Tomografía por emisión de positrones
PKA	Proteína kinasa A
PKA-AMPC	Proteína kinasa A dependiente de AMP cíclico
PLC's	Células de lavado peritoneal

RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SA	Anión superóxido
SFB	Suero fetal bovino
siRNA	RNA de interferencia pequeño
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
VCR	Viabilidad celular relativa
VHL	Gen supresor tumoral von hippel-lindau
μ g	Microgramo
μ L	Microlitro

RESUMEN

Las células normalmente utilizan la fosforilación oxidativa para metabolizar la glucosa, cambiando al fenotipo glicolítico solo en condiciones hipóxicas o anóxicas. Sin embargo, las células de cáncer metabolizan la glucosa a través de la sobrerregulación de la glicólisis para sobrevivir en los ambientes hipóxicos de las lesiones malignas, fenómeno conocido como efecto Warburg, el cual ofrece ventajas al crecimiento tumoral mediante la resistencia a la apoptosis. Esta característica única en el metabolismo tumoral ha identificado a la mitocondria como un organelo blanco en la terapia tumoral. Por otro lado, el dicloroacetato (DCA) es un metabolito empleado desde 1969, en el tratamiento de la acidosis láctica y enfermedades mitocondriales congénitas, revirtiendo el fenotipo glicolítico restaurando la fosforilación oxidativa e induciendo la muerte de las células tumorales. *In vitro*, diferentes líneas celulares de cáncer fueron tratadas con DCA-Na (0-750mM/mL). La viabilidad celular, inducción de senescencia y apoptosis fue evaluada por MTT, detección de β -galactosidasa, naranja de acridina-bromuro de etidio y TUNEL, respectivamente. La actividad glicolítica fue medida por la determinación de LDH, PKA-AMPC, GAPDH usando ensayos colorimétricos y RT-PCR, la capacidad angiogénica fue determinada por la unión de HIF-1 α al DNA (ELISA), invasión (Cámara de Matrigel) y formación de estructuras pro-angiogénicas (solución de calceína). *In vivo*, ratones C57BL/6 fueron inoculados con 5×10^5 células B16F10, tratados con DCA-Na (500 mg/kg), dos veces/día vía intraperitoneal. Determinando la sobrevivencia, mortalidad, peso corporal, peso-volumen tumoral y metástasis. A pesar de que todas las líneas celulares de cáncer fueron afectadas por el tratamiento con DCA-Na, la línea celular B16F10 fue la más sensible al tratamiento, disminuyendo la viabilidad celular, induciendo muerte celular por apoptosis, afectando diferentes vías metabólicas (LDH, PKA-AMPC, HIF y GAPDH), capacidad de invasión y angiogénesis. *In vivo*, el tratamiento con DCA-Na indujo un 20% de sobrevivencia, disminuyendo el peso-volumen tumoral, sin afectar el peso corporal y evito la metástasis en los ratones C57BL/6 inoculados con células de melanoma murino B16F10. Los hallazgos patológicos mostraron una disminución de las mitosis atípicas en los tumores

provenientes de ratones tratados con DCA-Na en comparación con el control. Los resultados indican que el DCA-Na es un buen candidato como nuevo agente en el tratamiento del cáncer debido a sus propiedades antitumorales *in vitro* e *in vivo*, sin embargo más estudios deben realizarse para determinar su empleo en este campo.

ABSTRACT

Normal cells typically use mitochondrial oxidative phosphorylation to metabolize glucose and switch over to glycolysis only in hypoxic or anoxic environment. However, cancer cells avidly consume glucose for energy by glycolysis to survive in the hypoxic environment of malignant lesions, a phenomenon known as the Warburg effect, the glycolytic phenotype offers growth advantages to cancer cells by resisting apoptosis. This unique metabolic characteristic of cancer cells has identified the mitochondrion as a target for cancer therapy. Dichloroacetate (DCA) is a metabolite used since 1969, in the treatment of lactic acidosis and inherited mitochondrial diseases, reversing the glycolytic phenotype restoring oxidative phosphorylation, inducing death tumor cells. *In vitro*, different cancer cells were treated with DCA-Na (0-750mM/mL). Cell viability, induction of senescence and apoptosis were evaluated by MTT, detection of β -galactosidase, acridine orange-ethidium bromide and TUNEL assays. The glycolytic activity was measured by determination of LDH, cAMP-PKA, GAPDH using colorimetric assays and RT-PCR, the angiogenic capacity was determined by DNA binding-activity of HIF-1 α (ELISA), invasion (Matrigel Chamber) and angiogenic structure formation (Calcein AM Solution). *In vivo*, C57BL/6 mice were inoculated with 5×10^5 B16F10 cells, treated intraperitoneally daily with DCA-Na twice at day (500 mg/kg). Death and survival percent, body weight, tumoral weight-volume and metastasis were determined. Despite that all cancer cell lines were affected for the treatment with DCA-Na, the B16F10 cell line was the most sensitive to the treatment, decreased the cellular viability, induced cellular death by apoptosis, affecting different metabolic pathways (LDH, PKA/AMPc, HIF, and GAPDH), decreased the capacity of cellular invasion and angiogenesis. *In vivo* the DCA-Na treatment induced 20% survival and decreased the tumoral volume and weight, without affect the body weight and avoid metastasis in C57BL/6 mice inoculated with B16F10 cells. Pathologic findings showed a decreased of atypical mitosis in tumors compared with controls. DCA-Na is a good candidate as a new agent in the treatment of cancer due to its antitumoral properties *in vitro* and *in vivo*, but more studies should be conducted to determine its use in this field.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente, el cáncer es causante de 7,9 millones de defunciones, equivalente a el 13.1% de muertes en el mundo (OMS, 2008). Según la OMS, se prevé que la tasa de morbilidad continúe aumentando en los próximos años alcanzando en el año 2015, alrededor de 15 millones de nuevos casos, estimándose alcanzar una cifra de 9 millones de defunciones. En la actualidad existen en el mundo más de 24,6 millones de personas con este padecimiento.

Su etiología es multifactorial, resultado de alteraciones en la regulación del ciclo celular, pérdida del control de los mecanismos de replicación y reparación del DNA provocada por la exposición prolongada a agentes químicos, físicos y biológicos, dando origen a la transformación maligna, esto conduce a la generación de alteraciones metabólicas como el incremento en la captación de glucosa y reducción de la fosforilación oxidativa, hecho que dirige a las células de cáncer a la generación de ATP a través de la sobrerregulación y dependencia de la glicólisis aún en presencia de oxígeno (efecto Warburg), propiedad única de muchos tipos de cánceres dando lugar a la activación de múltiples vías de señalización oncogénica, respuestas adaptativas hacia el microambiente hipóxico y disfunciones mitocondriales (Gatenby y Gilles, 2004). La glicólisis aeróbica confiere ventajas al crecimiento tumoral mediante la resistencia apoptótica. Por lo que en la actualidad, el conocimiento del metabolismo tumoral esta retomando auge en la generación de estrategias terapéuticas contra el cáncer. Una molécula de interés es el dicloroacetato de sodio (DCA-Na), es un metabolito pequeño, que tiene la capacidad de restaurar la actividad mitocondrial, por lo que ha sido empleado en enfermedades mitocondriales congénitas y acidosis láctica. A la fecha existen estudios *in vitro* que demuestran la actividad citotóxica de este compuesto, sin embargo el panel de líneas celulares utilizadas en los ensayos han sido limitadas y principalmente incluyen: cáncer de pulmón, endometrial y colorectal, además de encontrarse protocolos experimentales en desarrollo. Por lo que el objetivo de este estudio es contribuir en el conocimiento del efecto del DCA-Na sobre líneas celulares de cáncer *in vitro* diferentes a las previamente reportadas, enfocándonos sobre la línea celular B16F10 debido a que es apta para el

establecimiento del modelo tumoral murino en la cepa C57BL/6, permitiendo la evaluación del efecto sobre el crecimiento tumoral *in vivo*.

2. HIPÓTESIS

El DCA-Na tiene efecto sobre algunos intermediarios de la vía glicolítica afectando la viabilidad de las líneas celulares de cáncer *in vitro* y presenta un efecto antitumoral en un modelo de melanoma murino.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general:

Evaluar el efecto del dicloroacetato de sodio (DCA-Na) sobre líneas celulares de cáncer *in vitro* y en un modelo de melanoma murino.

3.2 Objetivos específicos *in vitro*:

1. Determinar la viabilidad celular relativa (VCR) en líneas celulares de cáncer y macrófagos peritoneales murinos tratadas con DCA-Na.
2. Determinar si el tratamiento con DCA-Na en la línea celular B16F10 conduce a la senescencia celular.
3. Evaluar si el tratamiento con DCA-Na en la línea celular B16F10 induce apoptosis o necrosis.
4. Determinar la actividad de LDH, PKA dependiente de AMP cíclico y la expresión del gen GAPDH en la línea celular B16F10 tratada con DCA-Na.
5. Determinar la actividad de unión de HIF-1 α al DNA, invasión y angiogénesis en la línea celular B16F10 tratada con DCA-Na.

3.3 Objetivos específicos *in vivo*:

1. Establecer un modelo de melanoma murino en la cepa C57BL/6, inducido por inoculación subcutánea de células B16F10.
2. Determinar el efecto de diferentes dosis de DCA-Na en un modelo de melanoma murino, evaluando los siguientes parámetros: supervivencia, mortalidad, peso corporal, peso-volumen tumoral y metástasis.

4. ANTECEDENTES

El metabolismo energético celular se encuentra regulado a través de la glicólisis y la respiración celular (formación de acetil coenzima A, ciclo de krebs y la cadena de transporte de electrones), en condiciones normales, las reacciones catabólicas y anabólicas de estos procesos generan una ganancia neta de 36 moléculas de adenosin trifosfato (ATP) por molécula de glucosa que ingresa a la célula, necesarias para la regulación de procesos de proliferación y muerte celular (Robbins y Cotran, 2006).

4.1 Glicólisis

La primera etapa metabólica; es decir la glicólisis, consta de diez reacciones químicas que degradan una molécula de glucosa en 2 moléculas de piruvato, produciendo 2 moléculas de NADH y 2 moléculas de ATP, esta vía metabólica es independiente de oxígeno, sin embargo el destino del producto final depende de la disponibilidad de oxígeno que exista en el microambiente celular. En condiciones normóxicas, el piruvato es convertido en acetil coenzima A (Acetil CoA), vinculando la glicólisis que ocurre en el citosol con el ciclo de krebs, que se lleva a cabo en la matriz mitocondrial (Audesirk y Byers 2003), por el contrario, en condiciones hipóxicas, el piruvato se reduce mediante la adición de dos átomos de hidrógeno para formar lactato, el cual es liberado hacia el espacio extracelular, esta conversión mantiene el balance redox dentro de la célula regenerando el NAD^+ (Figura 1), produciéndose altas concentraciones de lactato, patrón metabólico asociado a la transformación y proliferación maligna celular, este proceso es de baja eficiencia energética, en condiciones normales, las células normalmente usan ambas vías para el consumo de la glucosa pero dependen de la fosforilación oxidativa, cambiando a glicólisis en el momento de la privación de oxígeno (atletas de alto rendimiento utilizan esta vía para la generación de ATP) (Figura 2), fenómeno primeramente observado por Louis Pasteur en 1857, conocido como efecto Pasteur (Xu *et al.*, 2005).

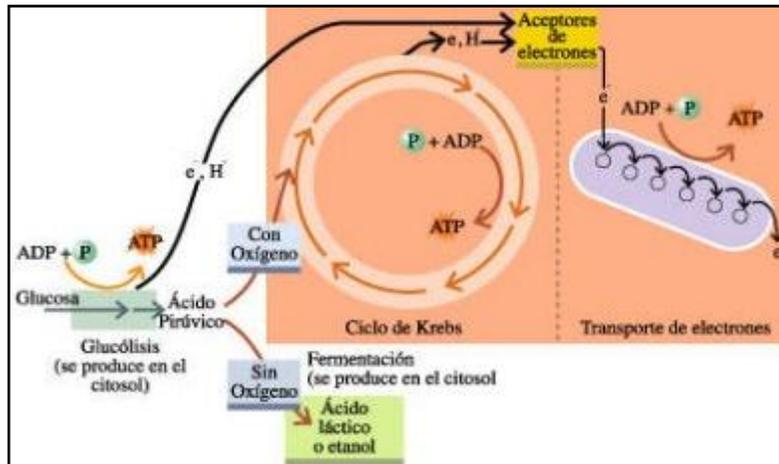


Figura 1. Metabolismo de la glucosa. La degradación de la glucosa es llevada por etapas, que incluyen la glicólisis, formación de Acetil CoA, ciclo de krebs y la cadena de transporte de electrones (Robins y Cotran, 2006).

4.2 Metabolismo tumoral: Glicólisis aeróbica

(Efecto Warburg)

En 1929, Otto Warburg observó diferencias metabólicas entre las células tumorales y las normales, encontrando que en tejido no tumoral, el 90% del ATP es generado a partir de la fosforilación oxidativa produciendo 36 moléculas de ATP/molécula de glucosa, y solo utiliza un 10% generado por la glicólisis. Sin embargo, el medio hipóxico dentro de la masa tumoral limita la disponibilidad de oxígeno para uso en la respiración mitocondrial, obligando a las células tumorales a sobrerregular la vía glicolítica como principal ruta de producción energética, Warburg encontró que los tumores producían solo el 50% de ATP a partir de la fosforilación oxidativa y un 50% mediante la glicólisis, generando una ganancia neta de ~4 moléculas de ATP/molécula de glucosa, esto denominado glicólisis aeróbica o efecto Warburg, comparado con las 2 moléculas de ATP/molécula de glucosa que se producen en la glicólisis anaeróbica (Figura 2). Esta investigación le otorgó el premio Nobel en medicina en 1931, donde concluyó que las

células tumorales a diferencia de las normales, mostraban un incremento en la captación de glucosa y una dependencia de la glicólisis a pesar de una fuente disponible de oxígeno (aeróbica), asegurando los niveles necesarios de ATP, disponibles para la demanda de las células tumorales en rápida proliferación (Zhou *et al.*, 2010).

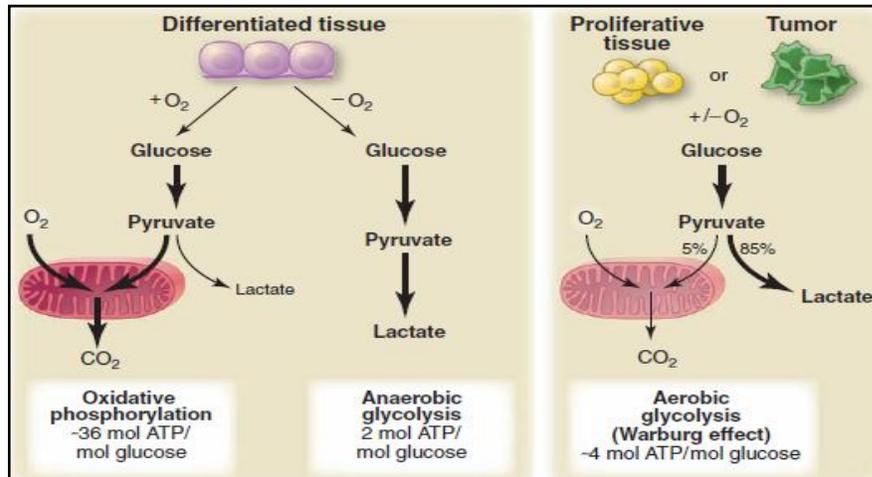


Figura 2. Representación esquemática de las diferencias entre fosforilación oxidativa, glicólisis anaeróbica y glicólisis aeróbica (efecto Warburg). La glicólisis aeróbica es menos eficiente que la fosforilación oxidativa para generar ATP (Vander *et al.*, 2009).

Daños en el funcionamiento mitocondrial e hipoxia en el microambiente tumoral son considerados los dos principales factores que contribuyen al efecto Warburg (Chen *et al.*, 2009). Si el incremento de la actividad glicolítica en las células tumorales es debido a alteraciones metabólicas o al medio hipóxico en los tejidos tumorales aún permanece controversial (Xu *et al.*, 2005). No está claro como el aumento de un proceso menos eficiente proporciona ventajas al crecimiento tumoral, sin embargo; se han hipotetizado algunas razones por las cuales las células tumorales prefieren la glicólisis como su principal vía productora energética, entre las que destacan: 1) la disminución de la

generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) derivadas de la fosforilación oxidativa, lo cual induce senescencia celular y/o apoptosis, 2) provee un rápido suplemento de NADH, esencial para la biosíntesis de *novo* de macromoléculas necesarias para la proliferación e invasión celular (Williams *et al.*, 1988; Gatenby *et al.*, 2004; Nature Reviews Cancer, 2004), 3) la sobre regulación de la glicólisis resulta en un incremento de lactato, lo cual se pensaría que podría causar una toxicidad significativa en los tejidos, sin embargo esta acumulación facilita el crecimiento tumoral mediante la rotura de la matriz extracelular, debido a la disminución en el pH, permitiendo la expansión e incremento en la movilidad celular y potencial metastático (Gatenby y Gillies, 2004).

4.2.1 Glicólisis aeróbica asociada a la resistencia tumoral

Numerosos estudios han demostrado que alteraciones tanto en el metabolismo de la glucosa y la proliferación celular están frecuentemente asociadas a mutaciones específicas en oncogenes, genes supresores de tumores y enzimas involucradas en la glicólisis, lo que sugiere vínculos entre los sensores metabólicos, muerte celular y transcripción genética. Por ejemplo, la activación de hexoquinasa conduce a una significativa supresión de la apoptosis; la hexoquinasa activada transloca desde el citoplasma hacia la membrana mitocondrial donde interactúa y suprime varios componentes clave de la apoptosis dependiente de la mitocondria. Lo que no es de extrañar que la hexoquinasa esta sobrerregulada y activada en muchos canceres. Esto debido a que el promotor de hexoquinasa contiene elementos de respuesta para p53 y HIF ambos mutados y esto incrementa su expresión. Además la proteína oncogénica Akt esta sobrerregulada en muchos canceres, e incrementa la expresión y la actividad de la hexoquinasa (Figura 3). El gen que normalmente antagoniza a Akt, PTEN, se encuentra mutado en un gran número de canceres (Michelakis *et al.*, 2008).

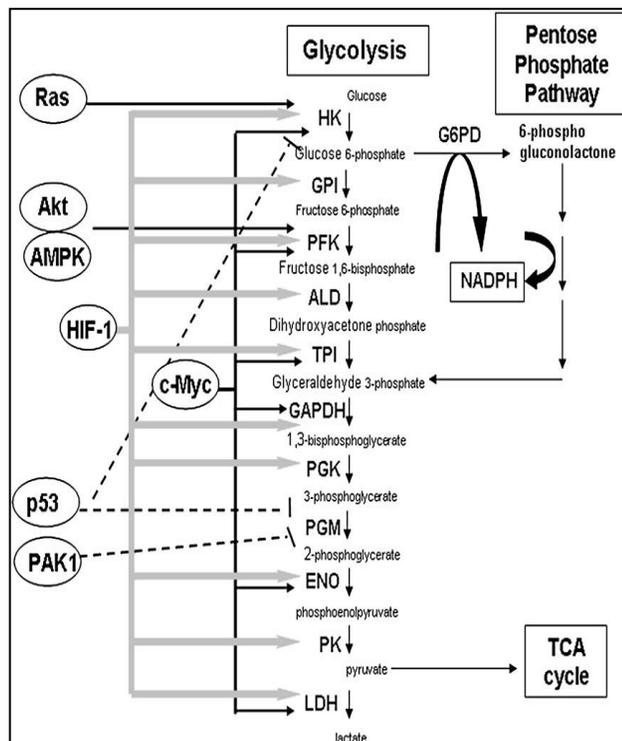


Figura 3. Reguladores de la vía glicolítica. Enzimas glicolíticas son activadas por factores transcripcionales tales como c-Myc y HIF-1. Ras, Akt, AMPK se activan por enzimas glicolíticas. P53 interfiere la actividad de HK y PGM, mientras PAK1 inactiva a PGM (Gonzales *et al.*, 2007).

La activación de los oncogenes c-Myc y Ras, o la pérdida de supresores tumorales como p53, fumarato hidrolasa (FH) y VHL (Von Hippel Lindau) pueden cambiar la producción de energía por la mitocondria hacia un equilibrio más glicolítico (Figura 3). pVHL regula proteolíticamente a HIF-1 α , dependiendo de las concentraciones de oxígeno disponibles en el microambiente celular, en presencia de oxígeno, dos sitios de prolina dentro del dominio central son hidroxilados por enzimas prolina-oxidasas, conduciendo a la degradación de HIF-1 α a través del complejo ubiquitina-proteasoma (Sun *et al.*, 2009). Gatenby y Gilles (2004) propusieron que la carcinogénesis prematura frecuentemente produce un microambiente hipóxico, en estas condiciones, HIF es activado y es translocado al núcleo (Figura 4).

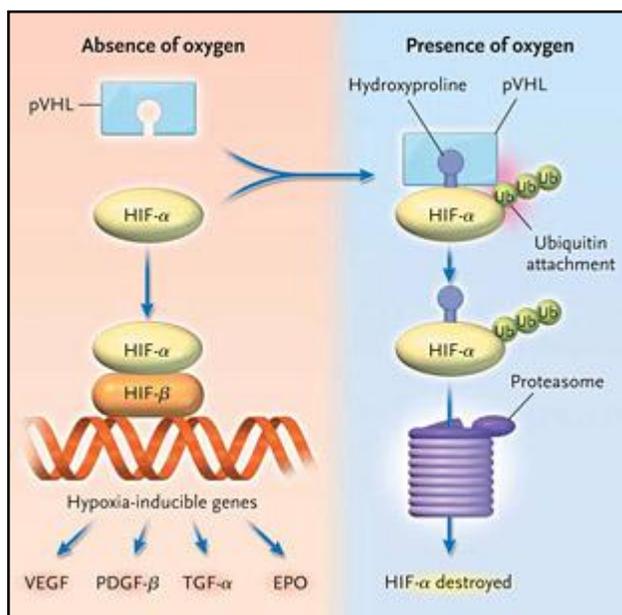


Figura 4. Regulación de la activación de HIF. En microambientes hipóxicos se activa el factor transcripcional HIF, lo que conduce a la activación de genes involucrados en la angiogénesis (Kaelin *et al.*, 2003).

La translocación de HIF activa la transcripción de genes transportadores de glucosa y enzimas requeridas por la glicólisis, tal es el caso de la enzima multifuncional gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH) considerada un gen constitutivo, sin embargo en diferentes líneas celulares de cáncer se ha encontrado una sobreexpresión (Said *et al.*, 2009). Por lo que en la actualidad se han investigado algunos inhibidores enzimáticos de la glicólisis como el iodoacetato (IIA) y el ácido pirúvico análogo a 3 bromopiruvato (BrPA), el cual conduce a la piruvilación de GAPDH y apoptosis por activación de caspasa 3, en líneas celulares de cáncer pancreático (Bhardawaj *et al.*, 2010; Ganapathy-Kanniappan, *et al.*; 2009). GAPDH es regulado por diversos factores como el Ca^{2+} , insulina y principalmente por microambientes hipóxicos conduciendo a la activación de HIF-1 el cual regula la expresión de genes asociados al metabolismo energético, proliferación, sobrevivencia, invasión, angiogénesis (Figura 4) (Xu *et al.*, 2005), conduciendo a un aumento de la vascularización tumoral y disminuyendo momentáneamente la hipoxia, sin embargo los nuevos vasos sanguíneos forman un

cuello de botella que limitan el suministro de oxígeno al tumor en crecimiento, causando desequilibrio y produciendo hipoxia, persistiendo el perfil de la glicólisis aeróbica, principalmente en el centro tumoral porque la calidad de la formación de neovasos es pobre, confiriendo ventajas al crecimiento tumoral.

Trabajos recientes han demostrado que no solo HIF-1 α incrementa la glicólisis, sino que disminuye las funciones mitocondriales a fin de reducir la demanda metabólica de oxígeno en los tejidos (Chen *et al.*, 2009).

A su vez, HIF-1 α regula la interconversión de piruvato a lactato a través del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) y mediante la sobreexpresión de LDH (Figura 3). Primeramente, HIF-1 α induce la expresión de piruvato deshidrogenasa kinasa (PDK), una puerta de mantenimiento que regula el flujo del piruvato en la mitocondria. En presencia de PDK activada, PDH es inhibida, limitando la entrada de piruvato hacia la mitocondria, donde tiene lugar la fosforilación oxidativa. En otras palabras, la PDK activa promueve la glicólisis y la producción de lactato (Figura 7) (Chen *et al.*, 2009).

LDH esta constituido por 2 subunidades codificados por 2 genes separados, LDH-A y LDH-B, estas dos subunidades se asocian a cinco diferentes isoformas de LDH tetramérica: LDH1 (LDH-B4), LDH2 (LDH-B3A1), LDH3 (LDH-B2A2), LDH4 (LDH-B1A3), y LDH5 (LDH-A4). LDH1 es efectiva en la conversión de lactato hacia piruvato, mientras que LDH5 es efectiva en la conversión de piruvato hacia lactato. La observación de que HIF-1 α incrementa la fermentación es probablemente mediada por la inducción de LDH-A. LDH-A es sobrerregulada no solo por HIF y c-Myc a nivel transcripcional (Figura 5) sino también por la proteína kinasa A (PKA), cuya activación depende del incremento en la concentración de AMP cíclico (Figura 6), este activa la transcripción de genes diana específicos que contienen una secuencia reguladora denominada elemento de respuesta a AMPc o CRE, en este caso la señal desde el citoplasma al núcleo lleva la subunidad catalítica de la PKA, que es capaz de entrar al núcleo tras su desacoplamiento de la subunidad reguladora. En el núcleo, PKA fosforila a CREB (proteína de unión a CRE), desempeñando un papel importante en el control de la proliferación, la supervivencia y la diferenciación, algunos de sus genes blanco, son P21, P29, ciclina D3 que están involucrados en esta regulación.

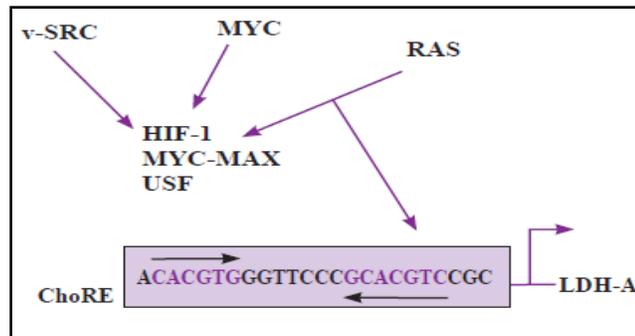


Figura 5. Sitios de unión del factor de transcripción dentro del promotor proximal del gen que codifica a LDH-A (Gonzales *et al.*, 2007).

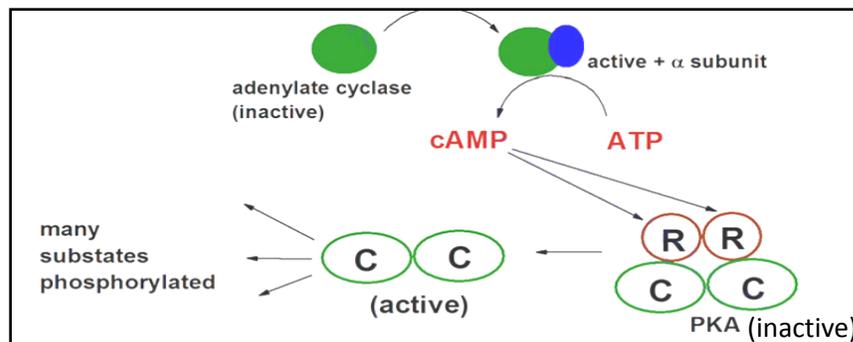


Figura 6. Activación de PKA dependiente de AMP cíclico. PKA consta de dos subunidades: reguladora (R) y catalítica (C), el AMP cíclico se une a las subunidades reguladoras provocando la disociación de las subunidades catalíticas (Tsang *et al.*, 2010).

La noción de que LDH-A puede regular el crecimiento tumoral es sugerida por estudios en donde LDH-A se encuentra sobreexpresada en cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y en cáncer colorectal vinculado con la hipoxia tumoral y producción de factores angiogénicos. El incremento de la expresión de LDH-A también resulta en un incremento extracelular en la acidez porque la expulsión de lactato es acompañada por el transporte de protones por los transportadores de monocarboxilato (MCTs). En un estudio por Seth (2011), mediante RNA de interferencia se establecieron líneas celulares con baja expresión de LDH-A, en comparación a las líneas celulares

control, las líneas celulares deficientes de LDH-A se mantuvieron proliferando lentamente bajo condiciones normóxicas, esto sin encontrar diferencias significativas en la generación de ATP entre las líneas deficientes y en el control, sugiriendo que ambas tienen la capacidad funcional para generar ATP en condiciones normóxicas o que otra isoforma de LDH es suficiente para compensar la deficiencia de LDH-A. Las células deficientes de LDH-A incrementaron el consumo de oxígeno, resultando en un incremento de la generación de ROS, ocasionando un incremento en el flujo de la cadena de transporte de electrones e incapacidad de transportar eficientemente electrones de un complejo a otro (Figura 7). Sin embargo, el patrón de crecimiento fue severamente limitado en condiciones de hipoxia con apreciable disminución de ATP en las células deficientes de LDH-A comparadas con el control. Esta es una observación clave puesto que indica que la inhibición de LDH-A es más eficiente bajo condiciones hipóxicas porque las células están bajo glicólisis aeróbica. Por lo tanto, existe la hipótesis de que las células madre de cáncer que suelen segregarse en nichos hipóxicos, no son afectadas por la quimioterapia, pudiendo ser sensibles a la terapia de inhibición de LDH-A (Seth *et al.*, 2011).

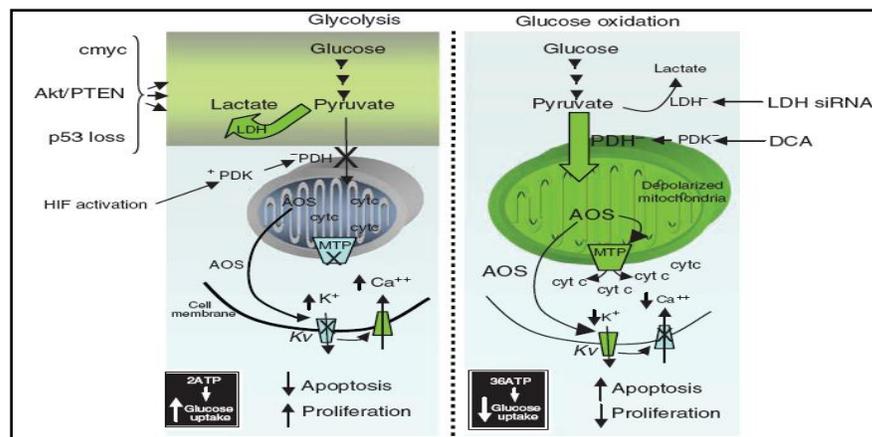


Figura 7. Diferencia entre la glicólisis y la oxidación de la glucosa. En la glicólisis, la activación de HIF activa a PDK inhibiendo a PDH, resultando en una resistencia apoptótica. Por el contrario, en la oxidación de la glucosa, al inhibir LDH mediante siRNA conduce a la apertura de MTP's y liberación de proteínas pro-apoptóticas (Xie *et al.*, 2011).

Se ha documentado mediante pruebas *in sílico*, que el bloqueo de LDH-A resulta en la disminución de enzimas glicolíticas, causando una reducción del crecimiento tumoral, comparado con el incremento de la actividad de LDH que conduce al incremento de la actividad de la glicólisis, por lo que se ha propuesto que la producción de lactato es una condición necesaria para la transformación de las células tumorales a través del efecto Warburg (Resendis *et al.*, 2010; Seth *et al.*, 2011). Muchas de las drogas en el tratamiento del cáncer causan toxicidad en tejidos no malignos, en parte porque sus blancos son expresados también en esos tejidos. La inhibición de LDH-A es un atractivo blanco en la terapia contra el cáncer, porque su expresión se encuentra en gran parte limitada hacia el músculo esquelético. Además, humanos con deficiencia en LDH-A muestran un fenotipo normal y exhiben mioglobinuria bajo intenso ejercicio anaeróbico. La inhibición de LDH-A puede ser más adecuada en combinación con otros regímenes quimioterapéuticos porque la actual terapia es insuficiente en regiones hipóxicas que pueden esconder a las células madre tumorales. De este modo, el desarrollo de inhibidores de LDH-A hace eminente el sentido de tratamientos potenciales operando mediante el efecto Warburg, ya que este efecto opera en un 60-80% de los tipos tumorales (Seth *et al.*, 2011).

Todo lo anterior sugiere que la remodelación metabólica (inicialmente adaptativa) confiere ventajas de supervivencia en las células cancerosas (Michelakis *et al.*, 2008). Una teoría de la evolución sobre la carcinogénesis identifica a la glicólisis como un mecanismo adaptativo crítico y principio de las células cancerosas contra la hipoxia, que persiste porque esto ofrece resistencia hacia la apoptosis. Por lo tanto, es posible que este fenotipo metabólico juegue un papel central en la patogénesis del cáncer y no es solamente un subproducto de la carcinogénesis.

4.2.2 Mitocondria y apoptosis

La mitocondria juega un papel central en la homeostasis celular, cuyas funciones principales son la ejecución de la muerte celular, señalamiento intracelular por Ca^{2+} y

generación de especies de oxígeno reactivas (ROS). En respuesta a diferentes tipos de estímulos (señalización de muerte, privación de factores tróficos, daño al DNA, isquemia, químicos o estrés metabólico), la mitocondria libera mediadores proapoptóticos, como el citocromo c y el factor inductor de apoptosis (AIF), que se encuentran protegidos en el interior de la mitocondria. Cuando los poros de transición mitocondriales (MTP) se abren, estas proteínas son liberadas hacia el citoplasma e inducen apoptosis, la despolarización mitocondrial y el incremento de ROS están asociados con la abertura de los MTP's. El potencial de membrana mitocondrial y la producción de ROS dependen del flujo de electrones en la cadena de transporte de electrones, que a su vez dependen de la producción de donadores de electrones (NADH, FADH₂) provenientes del ciclo de Krebs.

Las mitocondrias también pueden afectar de manera intermedia la proliferación y apoptosis, mediante la regulación del Ca²⁺ intracelular, su incremento está asociado al incremento de la proliferación y activación de factores de transcripción. También, la mitocondria produce superóxido que puede ser dismutado a H₂O₂, a través de superóxido dismutasa de manganeso y difundirse libremente, activando los canales de la membrana plasmática de K⁺, regulando así el flujo de Ca²⁺ y la actividad de caspasas (Figura 8) (Michelakis *et al.*, 2008).

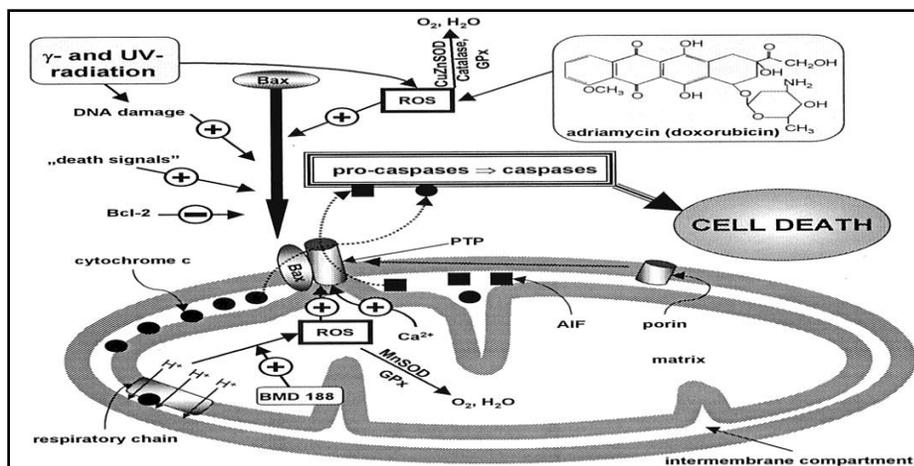


Figura 8. Apoptosis dependiente de la mitocondria. La abertura de MTP's generados por químicos, radiación, ROS conducen a la activación de caspasas causando la muerte celular por apoptosis (Szewczyk *et al.*, 2002).

Recientes descubrimientos, han demostrado que el cáncer genera diferencias tejido-específico en los marcadores del metabolismo energético, además la limitación de la actividad bioenergética de la mitocondria es un evento requerido para la progresión tumoral (Sánchez-Aragó *et al.*, 2010).

Por lo que las diferencias en la bioenergética entre las células tumorales y las normales, pueden ofrecer blancos terapéuticos (Xie J *et al.*, 2011). En primera instancia, parecería que una posibilidad de generar muerte selectiva de las células de cáncer es inhibir la glicólisis, es importante aclarar, que simplemente inhibir la glicólisis, puede no fomentar la entrada de piruvato hacia la mitocondria, además de generar toxicidad en varios tejidos no cancerosos que dependen de la glicólisis, por ejemplo en el músculo esquelético, durante el ejercicio extenuante, se ha demostrado que al inhibir la glicólisis se disminuye la producción de ATP (Xu *et al.*, 2005).

La estrategia sería acoplar la glicólisis hacia la fosforilación oxidativa, una de las formas propuestas, es mediante la activación de PDH, o inhibición de LDH, dirigiendo el piruvato hacia la mitocondria potenciando la fosforilación oxidativa. Esta hipótesis también es apoyada por la reciente publicación en donde la inhibición de LDH (por siRNA), promueve la transferencia de piruvato hacia la mitocondria, promoviendo apoptosis y disminución en los tumores *in vitro* y en xenotransplantes de ratones (Fantin *et al.*, 2006). Por lo que el desarrollo de fármacos en oncología se ha centrado en blancos esenciales para la supervivencia de todas las células en división, puesto que los blancos no esenciales ofrecen más selectividad pero poca eficacia, debido a que es muy raro encontrar un blanco único en las células tumorales. La razón más importante para el pobre desempeño de los medicamentos contra el cáncer es la heterogeneidad molecular e histológica en un mismo tumor y la capacidad de adaptación de las células cancerosas. Esto tiene implicaciones importantes, como la constatación de que los fármacos específicos tienen que ser desarrollados y probados molecularmente en tumores definidos y no necesariamente tienen que ser relevantes para otro tipo de cáncer (Michelakis *et al.*, 2008).

4.3 Dicloroacetato de sodio (DCA-Na)

Actualmente, existe evidencia de que la restauración de la función mitocondrial podría ser un objetivo primario en la terapéutica contra el cáncer, una terapia ideal contra el cáncer sería la administración oral de una molécula pequeña (Michelakis *et al.*, 2008). Una droga que se ha demostrado que aumenta la actividad mitocondrial es el ácido dicloroacético o dicloroacetato (DCA), la cual es una molécula pequeña de 150 Da, su fórmula molecular es $C_2HCl_2NaO_2$ (Figura 9) generalmente sus sales pueden incluir los iones del metal alcalino tales como sodio, potasio, calcio y magnesio (Figura 9). Sin embargo, farmacéuticamente, las sales aceptables con citotoxicidad celular mínima son las formulaciones de sodio (Michelakis *et al.*, 2009).

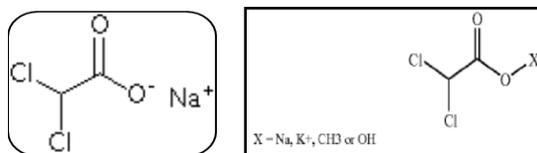


Figura 9. Estructura química del DCA-Na (Stacpoole *et al.*, 1989).

4.3.1 Farmacología clínica

El DCA es un metabolito de varios solventes orgánicos clorinados (Boorman *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1998; Uden *et al.*, 1983) a los que el humano se encuentra crónicamente expuesto, las fuentes en el medio ambiente del DCA incluyen el consumo de agua clorinada, contaminación de mantos acuíferos por ciertos solventes industriales y otros precursores clorinados.

El DCA es un metabolito de la biotransformación de varios productos farmacéuticos utilizado en la medicina por más de 30 años, administrado oral e intravenosamente en rangos de 25 a 100 mg/kg diariamente, en procesos clínicos como acidosis láctica congénita, sepsis, quemaduras, diabetes, hipercolesterolemia, desórdenes cardiovasculares y metabólicos (Stacpoole *et al.*, 1998).

4.3.2 Cinética, absorción y eliminación

El DCA es rápidamente absorbido por el tracto gastrointestinal. Después de la administración oral del DCA radiomarcado en ratas y ratones; se determinó alrededor de un 10-15% del DCA marcado en los tejidos evaluados (riñón, tejido adiposo, estómago, testículo, pulmón, bazo, corazón, cerebro y vejiga), mientras que a las 48 horas se encontró solo alrededor del 1-2% de la dosis original administrada, indicando una completa absorción (Environmental Protection Agency (EPA), 2003).

Las tasas de eliminación del plasma para el DCA pueden variar sustancialmente entre especies. Después de una dosis oral de aproximadamente 50 mg/kg en humanos, la vida media en plasma del DCA fue de 0.5 a 2 h, con menos del 1% de los compuestos relacionados excretados en la orina. En un estudio realizado en ratas y humanos se determinó que la edad es un factor determinante en la eliminación del DCA a través del plasma después de una exposición crónica, encontrando que en humanos con tratamiento continuo durante 6 meses a una concentración de 25 mg/kg diariamente, la vida media del DCA fue de 6.4 (± 2.4) h en el grupo pediátrico y 21 (± 5.8) h en los individuos adultos. La eliminación total del DCA fue 4 veces más bajo en los adultos que en los niños (37 ± 14 vs 8.3 ± 4.6 mL/h). Resultados similares fueron encontrados en ratas en donde las ratas jóvenes eliminaban más rápidamente el DCA que las ratas adultas (Shroads *et al.*, 2008).

Aunque Lukas (1980), encontró que en ratas la eliminación del DCA en sangre tiene una vida media de 2.0-4.4 h después de la inyección intravenosa de 100 mg/kg; la eliminación de la forma radiomarcada de los metabolitos ingeridos del DCA toman mucho más tiempo (21-36 h). En perros la eliminación del DCA en sangre tiene una tasa mucho más lenta. Después de la inyección de 100 mg/kg del DCA, Lukas (1980) encontró que los niveles iniciales del DCA en sangre en dos perros fueron de aproximadamente el doble de los obtenidos en ratas. Las concentraciones del DCA caen de sus niveles, a la mitad de la concentración entre las 6 y 24 h, con una vida media estimada entre 17.1 a 24.6 h. En humanos, aproximadamente el 20% del DCA se une a

las proteínas plasmáticas dentro de los primeros 15 a 30 minutos después de la administración oral. La primera dosis se elimina del plasma con mayor rapidez que las dosis posteriores, aunque el mecanismo de este efecto es desconocido.

La vida media del DCA en el plasma humano, se ha encontrado que incrementa de 63.3 minutos a un promedio de 374 minutos, después de una quinta serie de dosis de 50 mg/kg administrada intravenosamente, mientras que en otro estudio en adultos sanos a los cuales se les administraron diariamente 25 mg/kg durante cinco días, la vida media incremento alrededor de ocho veces en el quinto día comparado con la primera dosis (1.09 h vs 8.03 h). No esta claro la importancia cuantitativa de las rutas metabólicas que influyen en la repetición de la administración del DCA. Es posible que otros intermediarios reactivos del DCA se activen tras su administración prolongada (Stacpoole *et al.*, 1998).

4.3.3 Efectos sobre el metabolismo

A partir de los primeros estudios desarrollados por Stacpoole en 1969, se han realizado ensayos aleatorios en pacientes con acidosis láctica principalmente por causa hemodinámica generando hipoxia hística, como ocurre en la insuficiencia cardiaca, shock cardiogénico y séptico, así como en enfermedades congénitas mitocondriales han sido tratados con el DCA en dosis de 12.5 a 100 mg/kg⁻¹día⁻¹ vía oral o intravenosa (Stacpoole *et al.*, 2003), obteniendo cambios metabólicos favoreciendo la disminución de los niveles de lactato sin alterar la enfermedad primaria.

Kaufmann (2006), realizo un estudio administrando oralmente el DCA en concentración de 25 mg/kg día en 30 pacientes con el síndrome de MELAS. Los resultados demostraron que cada 4 de 15 pacientes desarrollaron síntomas de neuropatía periférica, sin embargo; la mayoría de los pacientes mostraban una resolución parcial de los síntomas después de 9 meses de la suspensión del tratamiento con DCA. La

neurotoxicidad presentaba polineuropatía axonal sensitivo-motora sin desmielinización y no se reportaron otras toxicidades (Kaufmann *et al.*, 2006).

Un estudio desarrollado por Kaufmann et al (2006), reveló que solo 1 de 21 niños con acidosis láctica tratados con DCA vía oral a una concentración de 25 mg/kg diariamente por 6 meses, desarrolló neuropatía periférica, demostrando que la administración de DCA es bien tolerada en niños con enfermedades mitocondriales.

Recientemente un ensayo aleatorio, evaluó el efecto de la administración del DCA vía oral en una dosis de 12.5 mg/kg dos veces al día en adolescentes y adultos que presentaban la mutación puntual A3243G en el DNA mitocondrial que da lugar al síndrome MELAS. Sin embargo, este estudio fue interrumpido prematuramente debido a una alta incidencia de neuropatía periférica con el DCA en comparación con la administración de placebo.

La alta incidencia de neuropatía en adultos con MELAS puede representar una complicación intrínseca dependiente de la edad. La neuropatía periférica es una complicación frecuente de las terapias con taxanos, platino y alcaloides, y su aparición puede depender si los pacientes con cáncer tienen precedentes de terapia neurotóxica (Stacpoole *et al.*, 2008).

Estos estudios han contribuido en el conocimiento acerca del mecanismo de acción celular del DCA, siendo el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (PDH) el sitio de regulación principal, localizado en la membrana interna mitocondrial. La PDH cataliza la descarboxilación reversible del piruvato producido en la glicólisis, hacia acetil coenzima A (Acetil CoA) paso limitante en la oxidación aeróbica de la glucosa, piruvato y lactato (Figura 10).

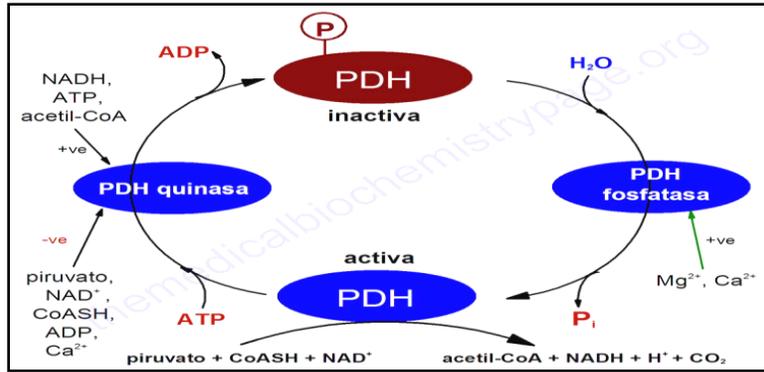


Figura 10. Formación de Acetil CoA. El piruvato es descarboxilado mediante PDH formando Acetil CoA, la cual entra al ciclo de krebs, prosiguiendo con las reacciones mitocondriales para la ganancia neta de 36-38 moléculas de ATP (King W. 1996).

La PDH se encuentra bajo una modulación transcripcional debido a la fosforilación reversible, mediada por las enzimas piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK) y piruvato deshidrogenasa fosfatasa (PDP). La PDK fosforila sobre la subunidad E1 α de PDH (PDHE1 α) en tres sitios: Ser232, Ser293 y Ser300 (Rardin *et al.*, 2009), inactivando a PDH, mientras que la PDP desfosforila el complejo restaurando la actividad catalítica, esta regulación genera una desviación celular hacia la vía anabólica favoreciendo la oxidación de otras fuentes energéticas (Figura 11) (Stacpoole *et al.*, 1989).

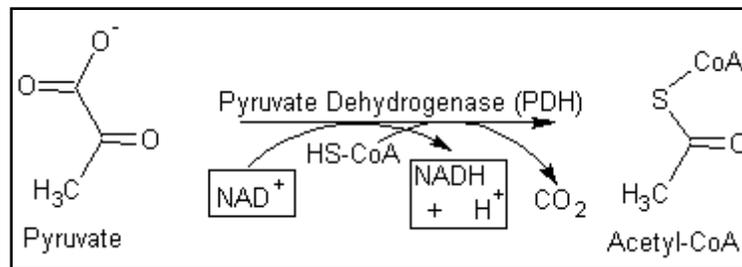


Figura 11. Regulación de la actividad del complejo PDH mediante fosforilación (King W. *et al.*, 1996).

El DCA en concentraciones de 10 a 250 μM ó 0.15-3,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ es un inhibidor de las cuatro isoenzimas de PDK (1-4) (Stacpoole et al., 1989), esta inhibición de PDK cambia el metabolismo a la oxidación aeróbica. Estudios en pacientes tratados con DCA, administrado a dosis de 35-50 mg/kg^{-1} , revelaron una disminución en los niveles de lactato en más de un 60%, incrementando la activación de PDH de 3-6 veces (Howlett *et al.*, 1999; Parolin *et al.*, 2000). Esto ocurre a los pocos minutos después de su administración oral o parenteral del DCA, el cual es rápidamente transportado a través de las membranas celulares vía transportador monocarboxilato y es concentrado en la mitocondria (Seth *et al.*, 2011). El DCA es deshalogenado a glioxilato en roedores y humanos por las isoformas ζ de la familia 1, de la glutathione S transferasa (GST ζ 1). Esta enzima es idéntica a la isomerasa maleilacetoacetato (MAAI), la cual cataliza el penúltimo paso en el catabolismo de la fenilalanina y tirosina. La administración a corto plazo de dosis en mg/kg del DCA en ratas o humanos conduce a una disminución en la actividad y expresión de GST ζ 1/MAAI, para la inhibición de su propia eliminación y tasa de biotransformación y a la acumulación de metabolitos de tirosina potencialmente neurotóxicos y hepatotóxicos, tales como la maleilacetona y succinilacetona (Stacpoole *et al.*, 1989).

4.3.4 Estudios *in vitro*

A la fecha, los efectos del DCA han sido estudiados en un número limitado de líneas celulares de cáncer y la comprensión de los mecanismos alternativos a la apoptosis regulados por el DCA son deficientes.

Las investigaciones han demostrado que el DCA en concentraciones de 10-50 mM , disminuye la viabilidad de líneas celulares de cáncer de endometrio, mama y pulmón. (Bonnet *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2009), sin afectar significativamente la viabilidad de las células normales MRC-5 (fibroblastos normales de pulmón), 293 y HB2 (células epiteliales) (Wong *et al.*, 2008; Madhok *et al.*, 2010).

En diversas investigaciones se ha encontrado que el tratamiento con DCA implica dos mecanismos sinérgicos: proximal y distal, esto observado en líneas celulares de cáncer endometrial (AN3CA, Ishikawa, SKUT1B, RL95-2, KLE, HEC1A, HEC1B) (Wong *et al.*, 2008). Las líneas celulares tumorales presentaban una hiperpolarización de la membrana mitocondrial, característica asociada a la resistencia a la apoptosis, debido a que previene la liberación de mediadores pro-apoptóticos de la mitocondria al citoplasma, sin embargo al ser tratadas con DCA, mediante la vía proximal (mitocondrial) causo la inhibición de PDK y activación de PDH, cambiando el metabolismo de la glicólisis hacia la oxidación mitocondrial, disminuyendo el potencial de membrana mitocondrial (despolarización), induciendo apoptosis por activación de caspasas (Bonnet *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2008). El efecto y los mecanismos fundamentales parecen ser dependientes del tipo celular. Una probable explicación de estas diferencias en los efectos podría ser las diferencias en la expresión de las isoenzimas de PDK en las líneas de cáncer examinadas. El DCA es un inhibidor no específico de PDK (Whitehouse y Randle, 1973). Además, las cuatro isoenzimas de PDK se sabe que son expresadas diferentemente en varios tejidos y son variables en la sensibilidad al DCA. PDK1 es encontrada en corazón, islotes de páncreas y músculo esquelético; PDK2 es expresada en todos los tejidos, PDK3 se expresa en los testículos, riñón y cerebro y PDK4 es abundante en corazón, músculo esquelético, riñón e islotes de páncreas (Subramanian *et al.*, 2010). Principalmente la isoenzima PDK2 es la más sensible al DCA (Michelakis *et al.*, 2008).

En la vía distal (NFAT-canal Kv 1.5) la translocación de ROS dilata los canales iónicos KV 1.5 de K^+ en la membrana plasmática. La expulsión de los iones potasio hiperpolariza la célula, que impide la entrada de iones Ca^{2+} . En las líneas celulares AN3CA, Ishikawa, SKUT1B y Hela (cáncer cérvico-uterino) el tratamiento con DCA disminuyo la concentración intracelular de Ca^{2+} , inhibiendo la activación de NFAT. (Wong *et al.*, 2008). En comparación, las líneas celulares RL95-2 y KLE (tuvieron una ligera respuesta a la apoptosis por DCA), no demostraron diferencia en los niveles intracelulares de Ca^{2+} en cualquier concentración del tratamiento sugiriendo que los mecanismos NFAT-Kv1.5 no están involucrados en los mecanismos apoptóticos de estas líneas, por el contrario, el tratamiento con DCA causó arresto en el ciclo celular de las

RL95-2 en fase G0/G1, induciendo una sobreexpresión de PUMA, disminuyendo la expresión de Survivina una proteína que juega un papel crítico en la regulación celular. Ya que muchos estudios han demostrado una correlación entre la expresión de Survivina y el grado del carcinoma endometrial. La transcripción de Survivina fue significativamente disminuida en todas las líneas de cáncer endometrial que tuvieron respuesta al DCA. La transcripción de PUMA fue incrementada significativamente en todas las líneas que respondieron al DCA. El resultado puede ser indicativo de la contribución de la vía p53-PUMA en la mitocondria y los canales iónicos Kv. HEC1A y HEC1B, son líneas altamente invasivas drogo-resistentes y de alto grado tumoral en comparación con las otras líneas endometriales, y fueron resistentes al DCA. Ambas líneas demostraron incremento en la expresión de Survivina, y la expresión de PUMA no se afectó por el tratamiento con DCA. Estos hallazgos sugieren que estas últimas líneas poseen una baja dependencia sobre la glicólisis aeróbica (Wong *et al.*, 2008).

Más recientemente, Madhok *et al* (2010), demostraron que el tratamiento con DCA en líneas de cáncer de colon, induce arresto celular en la fase G2 independientemente de la activación de p53. En contraste con estudios desarrollados por Cao *et al* (2008) en donde no se observaron cambios sobre el ciclo celular o generando arresto celular en la fase G1 (Cao *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2008). Sun *et al* (2009), en su estudio sobre líneas celulares de cáncer de mama encontró que el DCA inhibe la proliferación de estas células pero no induce apoptosis o muerte celular. Estos resultados fueron muy diferentes a los efectos del DCA sobre lo observado en pulmón (Bonnet *et al.*, 2007), endometrio (Wong *et al.*, 2008) y cáncer colorectal (BM Madhok *et al.*, 2010). En las líneas celulares de cáncer colorectal Lovo (altamente invasiva) y HT20 y SW480 (menos invasiva), el tratamiento con DCA causó mayor porcentaje de apoptosis en la línea Lovo que en las HT20 y SW480. Esto podría tener implicaciones clínicas para el tratamiento del cáncer colorectal, que es altamente invasivo, generador de metástasis y resistente a la quimioterapia. Shin *et al* (2009), reportaron que a pesar de que el tratamiento con 5-FU disminuye la viabilidad en líneas celulares de cáncer colorectal, se genera resistencia al tratamiento debido a la sobrerregulación de la glicólisis, en contraste con lo encontrado por BM Madhok *et al* (2010), en donde el tratamiento con DCA indujo apoptosis en líneas de cáncer colorectal altamente invasivas. Por lo tanto, con la

finalidad de determinar si la combinación de los quimioterapéuticos y el DCA, podría presentar efecto antitumoral sinérgico, investigaciones han documentado sus observaciones ante esta estrategia. Tong *et al* (2010), encontró que el DCA tiene efecto sinérgico con el agente quimioterapéutico 5-FU *in vitro* en líneas celulares de cáncer colorectal, disminuyendo la proliferación e induciendo arresto del ciclo celular en fase G1/S en las células de cáncer colorectal. La inducción de arresto celular podría resultar en la capacidad inhibitoria para sintetizar o reparar el DNA, conduciendo a la apoptosis (Tong *et al.*, 2010).

Dhar *et al* (2009), elaboraron una formulación mediante la reacción del cisplatino con DCA, a lo cual le dieron el nombre de mitaplatino, evaluando los efectos citotóxicos en diferentes líneas celulares de cáncer, comparándolos contra el cisplatino y/o DCA. El estudio fue realizado en las líneas celulares NTERA-2 (cáncer humano testicular), Hela (cáncer cérvico humano), U2OS (osteosarcoma humano), A549 (carcinoma de pulmón humano) y MCF-7 (adenocarcinoma mamario humano) así como células normales MRC-5 (fibroblastos normales de pulmón). Encontrando que el mitaplatino no afecto la polarización mitocondrial en MRC-5 y el cisplatino no afecto la viabilidad de la línea celular NTERA-2, sin embargo; esta misma línea celular en tratamiento con el mitaplatino por 48 h revirtió la hiperpolarización de la membrana mitocondrial, debido a el DCA liberado a partir del mitaplatino, conduciendo a la translocación de AIF de la mitocondria hacia el núcleo, estimulando la condensación de la cromatina y la fragmentación del DNA, acción asociada a la liberación del cisplatino a partir del mitaplatino. La apoptosis fue detectada en las células de cáncer U2OS, Hela y A549 con 10 μ M de mitaplatino, sin embargo a esta misma concentración el cisplatino provoca apoptosis en células normales MRC-5 mientras que el mitaplatino no produce apoptosis en estas células. Los resultados confirmaron que el mitaplatino ejerce una acción dual para disminuir la viabilidad celular de líneas de cáncer, cambiando la función mitocondrial mediante el DCA e impidiendo los procesos nucleares del DNA por el cisplatino (Figura 12).

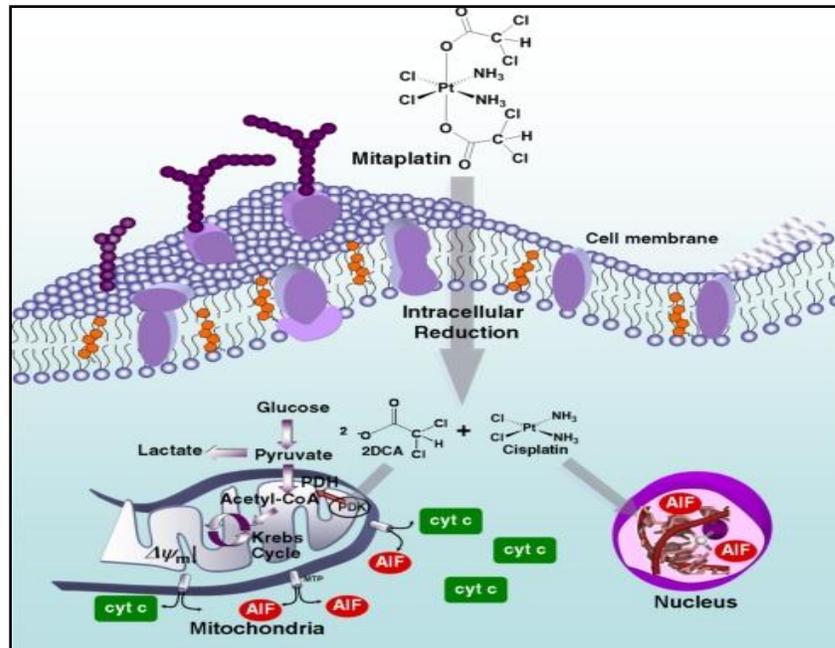


Figura 12. Mecanismo de acción dual del mitaplatino (Dhara *et al.*, 2009)

Fiebigler *et al* (2011), evaluó la actividad *in vitro* de nuevas drogas basadas en platino (satraplatino, JM118, picoplatino, oxaliplatino) en combinación con el DCA, contra líneas celulares carcinoides de pulmón UMC-11, H727 y H835. Con la excepción de la línea altamente quimiorresistente UMC-11, las líneas celulares carcinoides HT27 y H835 fueron sensibles a la mayoría de los quimioterapéuticos *in vitro*. El DCA a una concentración de 10 mM inhibió el crecimiento de UMC-11 en un 22% y sensibiliza a las células resistentes al carboplatino, satraplatino y JM118 en 1.4-2.4 veces. La actividad del carboplatino y JM118 es incrementado significativamente en combinación con el sensibilizador de apoptosis DCA, potenciando los efectos citotóxicos de los fármacos de platino seleccionados.

4.3.5 Estudios *in vivo*

Células de adenocarcinoma mamario de rata (13762 MAT), fueron inoculadas en ratas para la inducción de tumores, posteriormente se les administro el tratamiento de DCA, encontrando que el tratamiento redujo en un 58% el número de metástasis pulmonar

observada macroscópicamente después de la inyección de las células tumorales (Sun *et al.*, 2010). Esto reforzado por Fantin *et al* (2006), donde el DCA induce la inhibición de LDH en ratones con xenotrasplantes de cánceres humanos, promoviendo apoptosis e inhibición del crecimiento tumoral mejorando la supervivencia.

4.3.6 Ensayos clínicos con DCA en humanos

El trabajo en modelos pre-clínicos *in vitro* e *in vivo* han mostrado que el DCA podría ser benéfico para el tratamiento de cánceres humanos (Bonnet *et al.*, 2007; Cairns *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2008), la toxicidad es relativamente baja, su estructura (molécula muy pequeña), el bajo precio (medicamento genérico) y el hecho de que el DCA ha sido utilizado en seres humanos por más de 30 años, ofrece una sólida justificación para la aceptación clínica (Michelakis *et al.*, 2008).

Desde la observación pionera de que la glicólisis aeróbica en el cáncer es preferible, como mecanismo para generar ATP a partir de glucosa, numerosos experimentos han apoyado y ampliado el importante papel que tiene el metabolismo sobre la transformación, proliferación, angiogénesis y metástasis en el cáncer. Por lo tanto, el escaneo mediante PET ha comprobado que una tasa alta de absorción de glucosa constituye un sello distintivo en las células cancerosas, presumiblemente necesaria para conferir ventajas adaptativas cuando se enfrentan a ambientes ácidos e hipóxicos (Resendis Antonio *et al.*, 2010). En agosto del 2008, un paciente con linfoma no hodgkin's que había estado en remisión por casi un año después de la quimioterapia, presentó dolor y sensibilidad en el cuello donde eran visibles algunas salientes. Se le realizó un PET el cual mostró un incremento en la captación de glucosa, mostrando varios focos hipermetabólicos en la cabeza y el cuello en la parte derecha post-lateral midiendo 3.2 x 2.2 cm, lo cual dio el indicio de una recaída del linfoma. Cuatro meses después de la automedicación con 750 mg de DCA diariamente, mediante un PET se demostró que no había signos visibles de linfoma teniendo una completa remisión después de 4 meses de autotratamiento, que ha continuado hasta la fecha en dosis de

mantenimiento, además de tomar tiamina para protegerse del ligero hormigueo y entumecimiento en los nervios de los dedos de las manos y pies, sin comprometer su calidad de vida o que afecten a la eficacia del tratamiento (Flavin *et al.*, 2010). Sin embargo, este tipo de evidencias pre-clínicas de los efectos anti-cáncer del DCA se han publicado solo en cáncer de pulmón, glioblastoma, mama, endometrial y próstata (Michelakis *et al.*, 2008). Actualmente, existen varios protocolos clínicos en donde se ha incluido el DCA en la terapia de diversos tumores en humanos (Tabla 1) (www.clinicaltrials.gov).

<i>Nombre del estudio</i>	<i>Drogas empleadas</i>	<i>Dosis</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Estudio número</i>
Estudio fase II de DCA en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas o cáncer de mama	Herceptin + DCA Herceptin + trastuzumb en pacientes con cáncer de mama Her2+	DCA 6.25 mg/kg dos veces al día	2 años	ClinicalTrials.gov:NC T01029925. Autoridad de salud: Food and drug Administration (FDA)
Estudio fase I, abierto, de un solo brazo, dosis escala, clínico y farmacológico del DCA en pacientes con tumores sólidos metastásicos y/o recurrentes	DCA	DCA 12.5 mg/kg/ día	No se sabe	ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00566410
Estudio clínico fase II, abierto de doble brazo del DCA en pacientes con gliomas malignos y glioblastoma multiforme	DCA	No descrita	Mínimo 6 meses	ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00540176

Tabla 1. Protocolos clínicos con el DCA

A la fecha se han obtenido datos alentadores con el tratamiento de DCA de los diferentes tumores en humanos, pero se necesita de más tiempo para poder determinar su efecto real sobre el cáncer ya que estos protocolos clínicos aún se encuentran en fase de investigación.

La experiencia preclínica con el DCA en el campo del cáncer, lo ha postulado como un agente sensibilizador de la apoptosis que podría ser administrado conjuntamente con la quimioterapia o la radiación, en un intento de incrementar su eficiencia, reduciendo las dosis requeridas y limitando la toxicidad de las terapias estándar.

4.3.7 Otros usos terapéuticos del DCA en la clínica

Otro uso del DCA, es en el trasplante ortópico de hígado (OLT, tratamiento para los pacientes con enfermedad hepática en fase terminal). La acidosis metabólica intraoperatoria comienza después de la reperfusión del injerto y persiste durante varios días. El tratamiento estándar para la severa acidosis durante la OLT es NaHCO_3 . Sin embargo el uso de NaHCO_3 ha sido controversial porque compromete el rendimiento del miocardio inducido por alteraciones metabólicas, exacerba la acumulación de ácido láctico y de plasma (en grandes dosis), puede provocar hipernatremia, y el aumento de riesgo de desmielinización del sistema nervioso central. En OLT, el tratamiento de DCA disminuye las concentraciones plasmáticas de ácido láctico (Shangraw *et al.*, 2008).

Mercken *et al* (2011), evaluó si la infusión intravenosa de DCA (50 mg/kg) podría reducir la tensión inducida por el ejercicio sistémico oxidativo y la respuesta inflamatoria en los pacientes con COPD (deterioro en la función del músculo esquelético), tomaron muestras de sangre antes del ejercicio, durante y 30 minutos y 2 horas después del ejercicio, así como muestras de orina obtenidas antes y después de 2 horas del ejercicio.

El pico de carga de trabajo mejoro de forma significativa después de la administración del DCA en comparación con el placebo, los niveles de ácido úrico después del ejercicio fueron significativamente más bajos en el DCA que en condiciones del placebo, mientras que no se presentaron diferencias de los niveles de malondialdehído en orina. Los niveles de glutatión oxidasa (GSSG) incrementaron significativamente después de 2 horas de ejercicio en el placebo, pero no se altero por la infusión de DCA. No se generaron cambios en glutatión reducido (GSH), GSSG/GSH, y la actividad de

superóxido dismutasa. El tratamiento con DCA incremento significativamente los niveles de IL-6 después de 2 horas de ejercicio. El ejercicio se caracteriza por tener efectos inmediatos en los niveles circundantes de citocinas inflamatorias. Un aumento en la sangre de los niveles de IL-6 es una respuesta fisiológica normal al ejercicio. IL-6 se cree, que es originada a partir del músculo esquelético y que tiene efectos antiinflamatorios, incluyendo un efecto inhibitorio de citocinas proinflamatorias como TNF- α (Mercken *et al.*, 2011).

El tratamiento con DCA induce la activación fagocítica, de una manera dependiente de dosis-tiempo en macrófagos J744.A1, también evaluado *in vivo* en ratones B6C3F1, a los cuales se les administraron vía oral dosis de 7.7, 77, 154 y 410 mg de DCA /día, por 4-13 semanas. Células de lavado peritoneal (PLCs) fueron aisladas y ensayadas para diferentes marcadores que indican la activación fagocítica, incluyendo el anión superóxido (SA), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), y mieloperoxidasa (MPO). El DCA produjo un incremento significativo en la producción de SA, TNF- α y la actividad de MPO, pero el incremento en altas dosis (>77mg/kg/día) a las 13 semanas fue menos significativa que los producidos a las 4 semanas del tratamiento. Estos resultados mostraron una inducción significativa de los biomarcadores de activación fagocítica por el DCA sin presentar carcinogenicidad en los ratones B6C3F1. La activación fagocítica es conocida como un mecanismo de defensa contra infecciones bacterianas y esta asociada con la destrucción de células neoplásicas (Hassoun *et al.*, 2010).

4.3.8 Toxicidad o efectos secundarios

El DCA es un componente químico al que estamos expuestos diariamente en concentraciones de 5-125 $\mu\text{g/L}$, mientras que para fines terapéuticos se administran alrededor de 50 mg/kg. En pruebas experimentales para determinar la toxicidad de este compuesto en ratones B6C3F1 de ambos sexos se ha encontrado que el consumo de agua conteniendo este producto en dosis elevadas (1000 a 2000 mg/L/ un año o más) se relaciona con alta incidencia en el desarrollo de tumores hepatocelulares (IARC, 2004).

Estos resultados fueron corroborados por Pereira et al (2004), que estudio el efecto del DCA en ratones B6C3F1 a los cuales se les administro 3.2 g/L de DCA en agua de bebida. Los ratones fueron sacrificados a las 8 y 44 semanas de exposición al tratamiento. Después de 8 semanas el DCA incremento la relación del peso del hígado/corporal y causo hipometilación del DNA, acumulación de glicógeno y proliferación peroxisomal. Después de 44 semanas de exposición al DCA se observaron focos de hepatocitos alterados y adenomas hepatocelulares. Sin embargo; un estudio reciente en donde se emplearon modelos de ratones genéticamente modificados (Tg.AC y p53) considerados como un modelo potencial para la determinación de químicos carcinogénicos, no se encontró que el consumo y la aplicación dérmica del DCA a dosis de 2000 mg/L por 26 a 41 semanas se correlacionarán con la generación de tumores en hígado, en ratones machos Tg.AC a los 9 meses después de la exposición al DCA sólo se encontraron papilomas en el sitio de aplicación, pero esto no se observo a los 6 meses. Por lo cual se sugiere precaución en el uso de estos modelos de ratón para evaluar el potencial carcinogénico. El costo, tiempo y la sensibilidad son las principales limitaciones en las evaluaciones de la posible carcinogenicidad de productos químicos (Kissling *et al.*, 2009).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

In vitro

5.1 Cultivos celulares

Las líneas celulares de cáncer B16F10, MCF-7, INER-51, MDA-MB 231, Huh-7, Hela, y TC-1 se obtuvieron de American Type Culture Collection (Manassas, VA. USA). Las líneas celulares fueron cultivadas en medio Dulbecco's Eagle's modificado (DMEM-F12) o RPMI-1640 (dependiendo la línea celular) suplementados con suero fetal bovino (SFB) al 10%, inactivado a 56°C durante 30 minutos (GIBCO, Grand Island, N.Y. USA), conteniendo 3 mL de penicilina – estreptomina (Sigma, Chemical Company, ST. Louis MO, USA) y 560 µL de anfotericina B (Sigma, Chemical Company, ST. Louis MO, USA), evitando la contaminación de los cultivos y medios celulares. Las líneas celulares de cáncer fueron incubadas en una atmósfera de 37°C, 95% de aire y 5% CO₂.

5.2 Obtención y cultivo de macrófagos peritoneales murinos

Ratones de la cepa C57BL/6 (Harlan, México), fueron sacrificados mediante dislocación cervical, posteriormente mediante punción con una jeringa con aguja de medida 21 cargada con medio estéril RPMI-1640 (GIBCO, Grand Island, N.Y. USA) se realizaron lavados peritoneales para la obtención de macrófagos peritoneales, posteriormente la suspensión obtenida en la que se encuentran los macrófagos peritoneales, fue depositada en un tubo de 50 mL estéril, seguido de la centrifugación a 1200 rpm por 10 minutos, lavados 3 veces con medio de cultivo RPMI-1640 y ajustados para su cultivo en cajas de 96 pozos a una concentración celular de 5×10^3 células por pozo permitiendo su adherencia al plástico por 24 h. Los macrófagos peritoneales fueron tratados con DCA-

Na en rangos de concentraciones de 0, 75, 150, 225, 300, 375, 450, 525, 600, 675, 750 mM/mL e incubados en una atmósfera a 37°C, 95% de aire y 5% de CO₂ durante 72 h, finalizando con la determinación de la viabilidad celular, mediante la técnica de MTT, que se describe posteriormente.

5.3 Dicloroacetato de sodio (DCA-Na)

El dicloroacetato de sodio (*Hymera Lab*) es una sal cuyo peso molecular es de 150.92451, soluble en agua, su estado físico es en polvo, por lo cual fue disuelto en medio de cultivo DMEM-F12 ó RPMI-1640, y filtrado para su empleo a través de filtros de 0.2 µM de diámetro (Milipore, USA), las concentraciones utilizadas en los experimentos se realizaron a partir de una solución stock de 7.5 M, y se realizaron diluciones para obtener las siguientes concentraciones de ensayo: 0, 75, 150, 225, 300, 375, 450, 525, 600, 675, 750 mM/mL (0-750 mM/mL).

5.4 Evaluación de la viabilidad celular relativa mediante el ensayo de proliferación celular (MTT)

Las líneas celulares de cáncer B16F10, MCF-7, INER-51, MDA-MB 231, Huh-7, Hela, y TC-1 fueron sembradas a una concentración de 5×10^3 células/pozo, empleando placas de 96 pozos fondo plano y se incubaron durante una noche. El DCA-Na se añadió en rangos de concentración de 0 a 750 mM/mL, fueron incubadas durante 24, 48 y 72 horas, posteriormente se adicionó 20 µL de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)/ pozo, a una concentración final de 5 mg/mL suspendido en PBS 1X, se incubó la placa a 37°C por 2 horas, posteriormente se eliminó el medio evitando remover las sales de formazán formadas, finalmente se añadieron 200 µL/pozo del

dimetil sulfóxido (DMSO). Las absorbancias fueron determinadas en lector de placas de ELISA a 570 nm (Microplate autoreader EL311 BIOTEK, Instruments, Inc).

5.5 Determinación de senescencia asociada a β -galactosidasa

1×10^6 células B16F10 fueron cultivadas en placas de 6 pozos, posteriormente incubadas con las DL₅₀ y DL₉₀ de DCA-Na, además del grupo control (células sin tratamiento) durante 48 h, la determinación de la senescencia celular fue evaluada mediante el uso de un kit (BioVision Senescence Detection BioVision, Mountain View, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células fueron lavadas con PBS 1X y fijadas durante 5 minutos en una solución de formaldehído al 2% y glutaraldehído al 0.2%, enseguida se lavaron las células con PBS 1X, añadiendo 0.5 mL/pozo de la solución de tinción (X-gal 1mg/mL, ácido cítrico 40 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 2 mM), se incubó la placa por una noche a 37°C, y al día siguiente se realizó la observación, resultando positivas a senescencia aquellas células que mostraron la formación de un complejo azul en su interior, para la determinación en porcentaje, se contaron 100 células por campo microscópico.

5.6 Determinación de cambios morfológicos por naranja de acridina-bromuro de etidio y detección de apoptosis mediante la técnica de TUNEL

Para evaluar la citotoxicidad y cambios morfológicos inducidos por las DL₂₀, DL₅₀ y DL₉₀ de DCA-Na se cultivaron 1×10^6 células/pozo, incubadas por una noche, posteriormente se agregaron 2 μ L de una solución 1:1 de naranja de acridina: bromuro de etidio (100 μ g/mL) disueltos en PBS 1X. Las células fueron incubadas en oscuridad por 5 minutos a T.A, posteriormente, se observaron bajo microscopia de fluorescencia invertido Nikon (TE-Eclipse 300) y fueron fotografiadas. Considerando las células

viabiles aquellas que mostraron un color verde fluorescente y células muertas de color rojo-naranja fluorescente. La tinción con naranja de acridina penetra la membrana plasmática de las células en temprana apoptosis y el bromuro de etidio tiñe al DNA sólo si la integridad de la membrana se encuentra dañada. Después de teñir con naranja de acridina: bromuro de etidio las células en fase de apoptosis avanzada presentan un núcleo naranja mostrando condensación de la cromatina. Mientras que las células en necrosis muestran un núcleo naranja con su estructura intacta.

Para la detección de la fragmentación del DNA *in situ*, la transferencia del desoxinucleótido mediante la desoxiuridina trifosfato (dUTP) (TUNEL) fue realizado a través de un kit (TACS 2 TdT-DAB *In Situ* Apoptosis Detection Trevigen, Gaithersburg, Maryland, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cultivaron 5×10^3 células B16F10/pozo, seguido de la adición de los tratamientos con DCA-Na (control, DL₂₀, DL₅₀, DL₉₀) por 48 h, luego se realizó la digestión con proteinasa K (20 µg/mL) por 15 minutos, las células fueron inmersas en buffer TdT. TdT 1 mM Mn²⁺ y dNTP biotinado en buffer TdT fueron agregados e incubados en una atmósfera húmeda a 37°C por 60 minutos. Las células se lavaron con PBS 1X y fueron incubadas con streptavidina-HRP por 10 minutos, nuevamente se lavaron con PBS 1X, después fueron inmersas en la solución de DAB. Finalmente las células fueron teñidas 3 minutos en verde de metilo al 1% para permitir la visualización de las células que presentaban cromatina nuclear fragmentada característica principal de la apoptosis.

5.7 Determinación de la actividad de LDH

5×10^3 células B16F10/pozo se cultivaron en placas de 96 pozos fondo plano e incubadas en una atmósfera de 37°C, 95% de aire y 5% CO₂, posteriormente se agregaron los tratamientos del DCA-Na en rangos de concentración de (0-750 mM/mL) e incubadas por 24 y 48 h, al finalizar la incubación se obtuvo el sobrenadante celular, mediante centrifugación a 250 g por 10 minutos a 25°C, la detección de la actividad de LDH se evaluó mediante el kit comercial (Detection Lactate Dehydrogenase, Roche,

Indianapolis, USA), de acuerdo al protocolo del fabricante. En el cual primeramente se realizó la mezcla de los reactivos R1 (agente catalizador) y R2 (solución) y se añadieron 100 μL de esta mezcla reacción en una placa de 96 pozos fondo plano, seguido de 100 μL de sobrenadante celular obtenido por centrifugación, posteriormente se incubó la placa por un período de 30 minutos a 15°C - 25°C y en oscuridad. Finalmente se realizó la lectura espectrofotométrica a 490 nm (Microplate autoreader EL311 BIOTEK, Instrument, Inc).

5.8 Determinación de la actividad de PKA dependiente de AMP cíclico

Se cultivaron 5×10^6 células B16F10 en cajas de 25 cm^2 y posteriormente se adicionaron los tratamientos de DCA-Na (control, DL₂₀, DL₅₀, DL₉₀), después de 48 h de incubación, las células fueron lavadas con PBS 1X, la determinación de la actividad de PKA dependiente de AMPc se realizó mediante el uso de un kit comercial (Pep Tag for Non-Radioactive Detection of Protein Kinase C or cAMP Dependent Protein Kinase Promega, Madison, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. Las células fueron resuspendidas en 1 mL de buffer de extracción frío PKA (Tris-HCl 25mM (pH 7.4), EDTA al 0.5 mM, EGTA al 0.5 mM, B-mercaptoetanol al 10 mM, leupeptina $1 \mu\text{g}/\text{mL}$, aprotonina $1 \mu\text{g}/\text{mL}$), posteriormente mediante scrappers se obtuvieron las células y fueron sonicadas por 2 minutos, los lisados fueron centrifugados por 5 minutos a 4°C a 14000g, obteniendo los sobrenadantes. Se realizó una dilución de la subunidad catalítica del PKA/AMPc, obteniendo una concentración final de $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ en buffer de dilución PKA (K_3PO_4 350 mM (pH 6.8), DTT 0.1 mM). Para cada muestra a analizar se tomaron (5 μL) de buffer de reacción PKA 5X, (5 μL) péptido PepTag A1, (5 μL) activador de PKA, (1-10 μL) la muestra, el control negativo es requerido para determinar la absorbancia en la cuantificación de la reacción (en este caso no se adicionó muestra). Las reacciones fueron detenidas por calentamiento a 95°C por 10 minutos y las muestras fueron analizadas a través de un gel de agarosa al 0.8% a 100V por 15 minutos, donde los péptidos fosforilados migran hacia el ánodo mientras que los péptidos no

fosforilados migran hacia el cátodo. Finalmente el gel fue fotografiado en un transiluminador UV.

5.9 Extracción de RNA

RT-PCR

1×10^6 células B16F10 fueron cultivadas en cajas de 25 cm², posteriormente tratadas con DCA-Na (control, DL₂₀, DL₅₀, DL₉₀) por 48 horas. Primeramente se lisaron las células con 1 mL de trizol e incubadas por 5 minutos a T.A, posteriormente se adicionaron 200 µL de cloroformo, se agitaron por 15 segundos y fueron centrifugados a 12000g por 10 minutos a 4°C.

Posteriormente esta mezcla generó tres fases: orgánica (fenol-cloroformo), interfase y una superior acuosa. Se trabajó con la fase acuosa en donde se encuentra el RNA, el cual fue precipitado en tubos eppendorf con 0.5 mL de isopropanol/mL de trizol, incubados a T.A por 10 minutos, luego fueron centrifugados a 12000g por 10 min a 4°C, el paquete obtenido de RNA fue lavado con etanol al 70%, disolviendo la pastilla con agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato) e incubado por 10 minutos a 60°C, finalmente se tomó la lectura de la concentración de RNA cuantificado por espectrofotometría en NanoDrop. Los RNA fueron almacenados a -70°C para su conservación.

5.9.1 Síntesis de DNA complementario (DNAc)

Fue adicionado en tubos eppendorf un volumen de 10 µg de RNA, 1 µL de oligo dT 0.5 mL/µL y 1 µL de una mezcla de dNTP 10 mM (Gibco, Laboratories, Life Technologies) llevado a un volumen de 12 µL con agua DEPC, fue calentado a 65°C por 5 minutos, seguido de la adición de 4 µL de Buffer 5X, 2 µL de DTT al 0.1 M, después se

mezclaron e incubaron las muestras a 42°C por 2 minutos, se adicionaron 1 µL de Superscript RT (Gibco, Laboratories, Life Technologies) una unidad por microlitro de muestra, y finalmente se mezclaron y se incubaron a 42°C por 50 minutos, finalmente la reacción se inactiva por calentamiento a 70°C por 15 minutos.

Para la amplificación de los genes GAPDH, β-actina y 18s ribosomal, se utilizaron los siguientes primers: B-actina Forward 5' GAC TTC GAG CAA GAG AT Reverse 3' TCG TCA TAC GCC TGC TTG CT, GAPDH Forward 5' ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC Reverse 3' TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA y 18 s ribosomal Forward 5' GCC CCC TCG ATG CTC TTA G Reverse 3' AAA TGC TTT CGC TCT GGT CC.

En la siguiente tabla, se muestran las condiciones en las cuales se realizaron las reacciones de PCR, para evaluar la expresión de GAPDH y como controles internos β-actina y 18s ribosomal así como los tamaños de DNA amplificados.

Ciclos de amplificación		β-actina	GAPDH	18s ribosomal
	Desnaturalización inicial	94°C/4 min	95°C/4 min	94°C/4min
	Desnaturalización	94°C/40 seg	94°C/45 seg	94°C/40 seg
	Alineamiento	64°C/30 seg	64°C/30 seg	51.2°C/40 seg
	Elongación	72°C/40 seg	72°C/60 seg	72°C/50 seg
	N° de ciclos	35 ciclos	36 ciclos	36 ciclos
	Polimerización final	72°C/7 min	72°C/10 min	72°C/7 min
	N° pares de base del producto	430 pb	452 pb	251 pb

Figura 13. Ciclos de amplificación para β-actina, GAPDH y 18s ribosomal.

5.10 Determinación de la unión de HIF-1 α al DNA

Para la determinación de la concentración óptima para la inducción de HIF-1 α , se cultivaron 1×10^7 células B16F10 en cajas de 75 cm², y posteriormente se añadió el CoCl₂ a la concentración de 50 mM, y se incubó por 4 h, después de este período de tiempo las células fueron lavadas con PBS 1X y se añadieron los tratamientos de DCA-Na (control, DL₂₀, DL₅₀, DL₉₀) fueron incubados por 48 horas, la producción de HIF-1 fue determinada mediante el empleo de un kit comercial (HIF-1 α Transcription Factor Assay Cayman Chemical kit, USA). A través del uso de scrapers se obtienen las células, las cuales fueron centrifugadas a 300 g/ 5 minutos a 4°C, el sobrenadante obtenido fue eliminado, el pellet celular fue resuspendido en PBS 1X frío conteniendo inhibidores de fosfatasas, nuevamente los tubos fueron centrifugados a 300 g/5 minutos a 4°C, el pellet obtenido fue incubado por 15 minutos en buffer de extracción con inhibidores de proteasas, fue realizada una mezcla para obtener el buffer de unión del factor de transcripción el cual está constituido de agua ultra pura, buffer de factor de unión 4X, reactivo A y DTT al 0.3 M, y se colocaron 100 μ L a cada pozo de ensayo, que contienen elementos consenso para HIF-1 α , posteriormente la placa es incubada a 4°C por una noche, al día siguiente la placa fue lavada por 5 veces con 200 μ L de buffer de lavado 1X, seguido de este paso fue agregado el anticuerpo primario a una dilución de 1:100 en buffer ABB 1X, y 100 μ L de anticuerpo por pozo fueron agregados en la placa, excepto en los pozos blanco, posteriormente se cubrió la placa por espacio de 1 hora a T.A, terminado este tiempo los pozos fueron lavados con 200 μ L de buffer de lavado por 5 veces, para posteriormente adicionar 100 μ L de anticuerpo secundario a una dilución 1:100 en ABB 1X, a cada pozo de ensayo excepto en el blanco, se incubó la placa por 1 hora a T.A sin agitación, y finalmente se lavaron los pozos con buffer de lavado 1 X para eliminar las uniones no específicas. Para el revelado y lectura de la placa, fueron adicionados 100 μ L de la solución reveladora y se incubó la placa por intervalo de 15-45 minutos a T.A, en agitación y protegido de la luz, en este paso del protocolo es importante permitir que los pozos tomen la coloración azul, esto basado en el control positivo proporcionado por el kit, después se añadieron 100 μ L/pozo de la solución de

terminación, donde los pozos tornan un color amarillo para finalmente leer la absorbancia a 450 nm en un lector de ELISA Bio-tek Instruments, Inc.

5.11 Determinación de la invasión celular

Las placas de cámara de invasión BD BioCoat™ Matrigel™ (BD Biosciences, Bedford, MA) de 6 pozos, incluyen insertos contenedores de una matriz membranal basada en MATRIGEL con poros de 8 µM. Inicialmente los insertos fueron rehidratados por 2 horas con RPMI-1640, posteriormente se añade 2.5 mL de quimioattractante (SFB 5% con medio RPMI-1640) en los pozos, e inmediatamente en los insertos se añadió tanto la suspensión celular a una concentración de 1×10^6 células B16F10/pozo, como los tratamientos de DCA-Na (DL₅₀, DL₉₀ y control), fueron incubados por espacio de 22 y 48 horas a 37°C, 5% CO₂. Después de la incubación, las células no invasivas fueron removidas al eliminar la superficie de la membrana del inserto mediante un scraper, seguido de un lavado con medio de cultivo RPMI-1640. Por último las células fueron fijadas y teñidas con hematoxilina-eosina, y finalmente las células se observaron mediante microscopia en objetivos de 10X y 40X y fotografiadas. El porcentaje (%) de invasión fue determinado por:

$$\% \text{ de invasión} = \frac{\# \text{ células que invadieron el inserto en el grupo control}}{\# \text{ células que invadieron el inserto en el grupo tratado}} \times 100$$

5.12 Determinación de angiogénesis

La determinación de angiogénesis fue evaluado mediante el uso de un kit comercial (In vitro angiogenesis assay kit Ann Arbor, MI), siguiendo las instrucciones del fabricante. Primeramente, en una placa de 96 pozos fueron agregados 40 µL del gel (cell-based

extracelular matrix gel), la placa fue incubada durante 1 hora a 37°C, permitiendo la solidificación del gel, seguido de este paso, se preparó la suspensión celular a una concentración de 5×10^3 células B16F10/pozo en RPMI-1640 suplementado con 10% SFB, posteriormente se añadieron las DL_{50} y DL_{90} de DCA-Na, además de controles positivos (PMA 1 μ M) y negativos (JNJ 1 μ M) de la angiogénesis, incubados por 24 y 48 horas. Al finalizar este periodo de tiempo se preparó la solución de tinción calceína a una dilución de 1:100 en medio de cultivo RMPI-1640 y se añadieron 10 μ l de la solución a cada pozo. Por último se observaron los pozos mediante microscopia de fluorescencia y se fotografiaron las imágenes.

In vivo

5.13 Animales

Ratones de la cepa C57BL/6 (Harlan, Mexico) de 6-8 semanas de edad (20-25g), en la que se ha comprobado que es apta para la implantación de un tumor generado por la línea celular de melanoma murino B16F10, fueron alimentados con una dieta balanceada de ratón y agua *ad libitum*, a temperatura controlada (25°C), controlando ciclos de iluminación (12 horas/luz-oscuridad).

5.14 Establecimiento del modelo de melanoma murino

Se inocularon grupos de 5 ratones de la cepa C57BL/6, vía subcutánea en el flanco derecho a una concentración de 500,000 células B16F10/ratón resuspendidas en 0.2 mL PBS 1X, para determinar el tiempo de aparición del tumor, diariamente fueron observados los ratones inoculados con las células tumorales, y una vez que fueron visibles los tumores, se inicio la administración intraperitoneal del DCA-Na.

Para determinar la dosis óptima del tratamiento con DCA-Na, se establecieron dos grupos murinos:

- a) Control (grupo sin tratamiento)
- b) DCA-Na (500 mg/kg, 2 veces/día)
- c) DCA-Na (1000 mg/kg, 2 veces/día)

Una vez que se obtuvo la dosis ideal del tratamiento, se evaluaron los siguientes parámetros, supervivencia, mortalidad, peso corporal, media de aparición tumoral, volumen-peso tumoral y metástasis.

La determinación del índice de peso corporal C57BL/6 fueron pesados cada 7 días empleando una balanza marca AND Gx-200, los datos obtenidos fueron registrados y analizados posteriormente. El volumen tumoral fue registrado cada 7 días mediante un calibrador de medición (Vernier, USA), utilizando la fórmula: volumen = longitud X ancho², los datos obtenidos fueron analizados.

Para evaluar el peso tumoral, los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical a los 28 días posterior a la inoculación de las células B16F10, los tumores fueron obtenidos mediante proceso quirúrgico, los cuales fueron pesados y los datos obtenidos se registraron.

5.15 Análisis histológicos

Los tumores de ratones C57BL/6 tratados y no tratados con DCA-Na fueron fijados en formol al 10% y embebidas en parafina realizando cortes de 4 µm, posteriormente teñidos con hematoxilina y eosina (HE) para la determinación de células infiltrantes inflamatorias.

5.16 Análisis estadístico

Los experimentos *in vitro* e *in vivo* se realizaron por triplicado. Los resultados *in vitro* se analizaron por ANOVA y mediante el uso del programa computacional SPSS 12.0 con una significancia de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

In vitro

6.1 El DCA-Na disminuye la VCR de líneas celulares de cáncer sin afectar la viabilidad celular de macrófagos peritoneales murinos.

La viabilidad celular relativa (VCR) fue evaluada en las líneas celulares de cáncer TC-1, Hela, PC3, DU145, Huh-7, Iner 51, MDAMB-231, MCF-7, B16F10 y en macrófagos peritoneales murinos tratados con DCA-Na en rangos de concentración de 0 a 750 mM/mL, mediante la técnica de MTT. Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento con DCA-Na disminuye la VCR en todas las líneas celulares de cáncer analizadas, (Figura 14, 15, 16, 17 y Tabla 2 y 3) sin afectar significativamente la VCR de los macrófagos peritoneales murinos en un período de 72 horas ($p < 0.05$) (Figura 18).

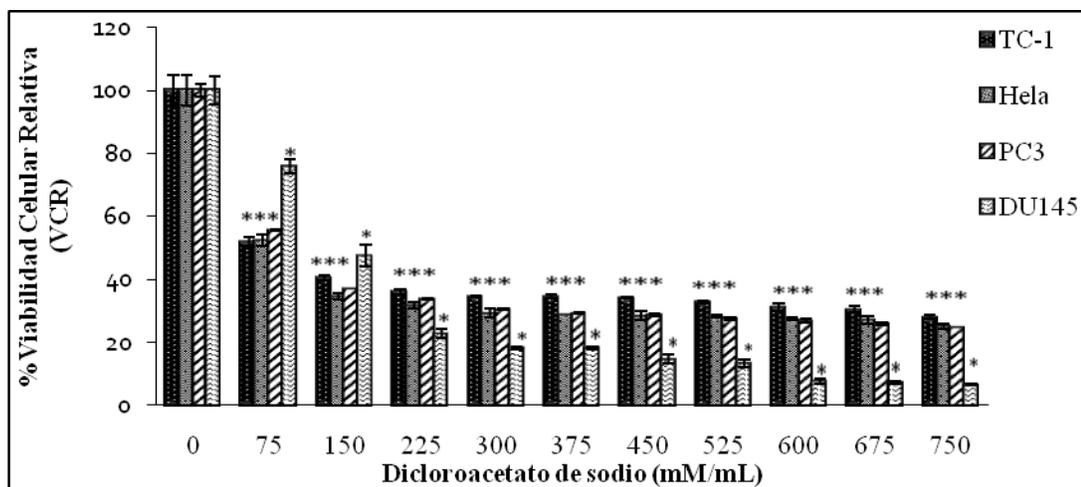


Figura 14. Efecto del DCA-Na sobre la VCR en las líneas celulares de cáncer TC-1, Hela, PC3 y DU145. Las líneas celulares de cáncer fueron cultivadas a una concentración de 5×10^3 células/pozo, posteriormente tratadas con DCA-Na (0-750mM/mL) e incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% de aire y 5% CO₂ durante 72 horas. Finalmente el porcentaje de viabilidad celular relativa (%VCR) fue determinado mediante la técnica de MTT, evaluando la D.O a 540 nm. Los experimentos se realizaron por triplicado, los datos representan la media con su respectiva DS. * $p < 0.05$ comparado con el control.

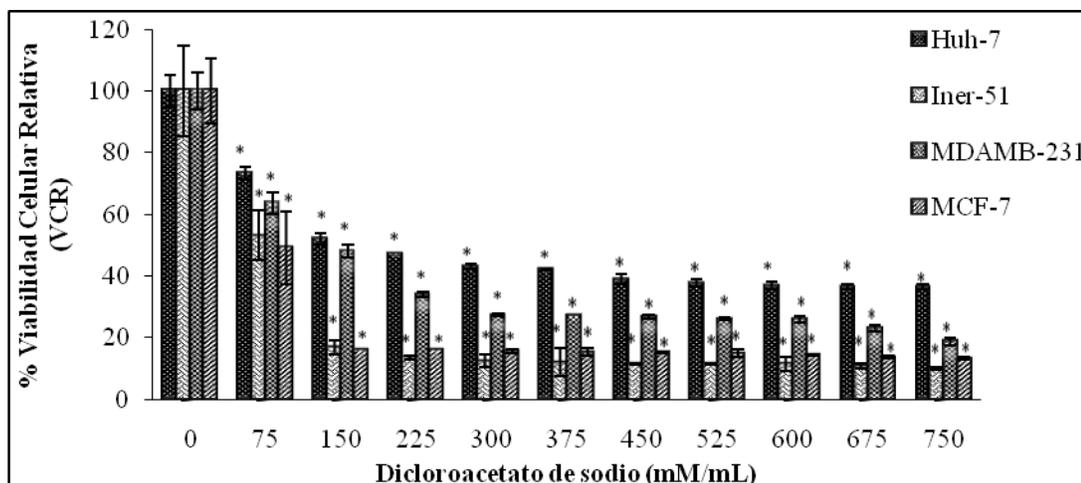


Figura 15. Efecto del DCA-Na sobre la VCR en las líneas celulares de cáncer Huh-7, Iner-51, MDAMB-231 y MCF-7. Las líneas celulares de cáncer fueron cultivadas a una concentración de 5×10^3 células/pozo, posteriormente tratadas con DCA-Na (0-750mM/mL) e incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% de aire y 5% CO_2 durante 72 horas. Finalmente, el porcentaje de viabilidad celular relativa (% VCR) fue determinado mediante la técnica de MTT, evaluando la D.O. a 540 nm. Los experimentos se realizaron por triplicado, los datos representan la media con su respectiva $\pm\text{DS}$ (* $p < 0.05$ comparado con el control).

A continuación, se muestra la Tabla 2, la cual se deriva de la Figura 14 y 15, mostrando los datos en porcentajes de VCR.

		<u>Línea celular</u>								
		[DCA-Na]mM/mL	TC-1	Hela	PC3	DU145	Huh-7	Iner 51	MDAMB231	MCF-7
% Viabilidad celular relativa (VCR)	0	100±4.79	100±5.02	100±2.12	100±4.57	100±5.19	100±5.06	100±5.84	100±5.06	
	75	51.92±1.48	52.51±1.69	55.74±0.070	75.96±2.31	73.42±1.97	53.15±4.2	63.68±3.39	49.19±4.3	
	150	40.55±0.84	34.6±1.13	36.78±0.1	47.59±3.28	52.02±1.83	16.83±2.47	48.06±2.19	16.07±0.1	
	225	36.01±0.84	31.79±0.84	33.9±0.21	22.89±1.25	47.29±0.14	13.49±0.49	33.93±0.70	16.07±0.1	
	300	34.61±0.14	29.27±1.34	30.45±0.21	18.22±0.23	43.18±0.91	12.4±1.97	27.41±0.49	15.51±0.70	
	375	34.61±0.70	28.77±0.1	29.31±0.21	18.22±0.23	42.06±0.28	12.08±4.66	27.41±0.070	15.44±1.20	
	450	34.09±0.21	28.47±1.48	28.73±0.28	14.88±1.34	39.07±1.55	11.62±0.21	26.8±0.070	15.16±0.35	
	525	32.86±0.28	28.26±0.35	27.58±0.56	13.37±1.34	37.58±1.27	11.62±0.21	26.18±0.49	14.81±1.27	
	600	31.29±1.20	27.36±0.42	27.01±0.49	7.69±0.72	36.96±1.34	11.46±2.26	26.06±0.98	14.32±0.070	
	750	30.59±1.06	27.06±1.20	25.86±0.35	7.34±0.26	36.46±0.77	10.73±0.84	22.98±0.91	13.69±0.28	
	750	28.14±0.49	25.25±0.77	24.71±0.070	6.67±0.26	36.46±0.91	10.1±0.42	18.85±1.20	13.34±0.35	

Tabla 2. Efecto del DCA-Na sobre la VCR en líneas celulares de cáncer. Los datos representan la media $\pm\text{DS}$ de experimentos realizados por triplicado.

Debido a que la línea celular B16F10 fue la más sensible al tratamiento con DCA-Na y a conveniencia para nuestro estudio en el empleo de esta línea de la cual deriva el modelo de melanoma murino, se realizaron estudios sobre la viabilidad celular relativa a las 24, 48 y 72 horas para determinar las dosis letales del 20% (DL₂₀), 50% (DL₅₀) y 90% (DL₉₀), encontrando que el tratamiento con DCA-Na a las 24 horas de incubación disminuye significativamente la VCR de las B16F10 hasta un 66.66% con la dosis mayor (750 mM/mL), a las 48 y 72 horas el tratamiento con DCA-Na disminuyó la VCR hasta un 9.96% y 8.7 % con la dosis mayor (750 mM/mL), respectivamente.

Con estos experimentos determinamos las dosis letales DL₂₀ (75 mM/mL), DL₅₀ (300 mM/mL) y DL₉₀ (750 mM/mL) y el tiempo óptimo (48 horas) para dar paso a los posteriores experimentos, descritos en este trabajo (Tabla 3, Figura 16 y 17).

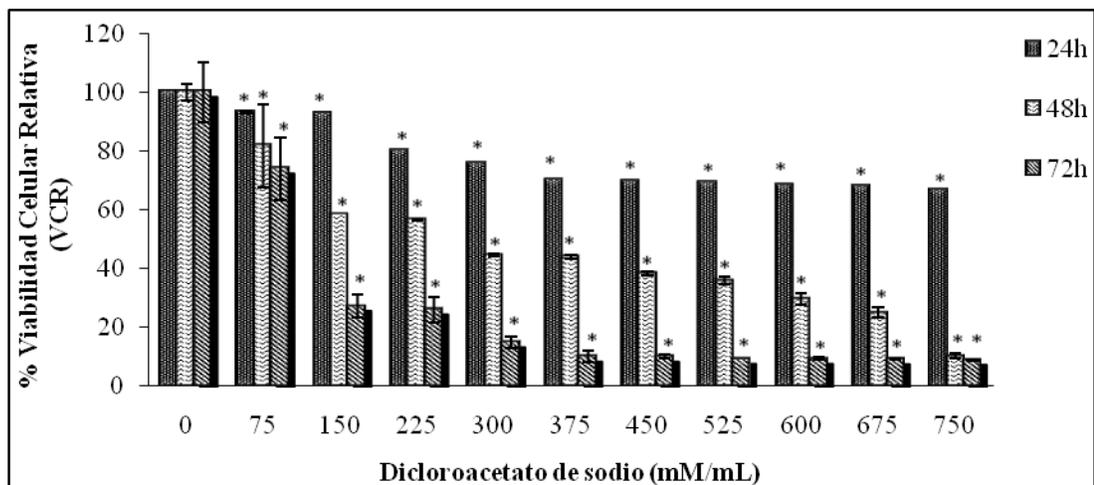


Figura 16. Efecto del DCA-Na sobre la VCR en la línea celular B16F10. 5×10^3 células/pozo, fueron cultivadas y posteriormente tratadas con DCA-Na (0-750mM/mL) e incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% de aire y 5% CO₂ durante 24, 48 y 72 horas. El porcentaje de viabilidad celular relativa (% VCR) fue determinado mediante la técnica de MTT, mediante la D.O. a 540 nm. Los experimentos se realizaron por triplicado, los datos representan la media con su respectiva \pm DS (*p<0.05 comparado con el control).

Se muestra la Tabla 2, la cual representa los datos en porcentajes de VCR, derivados de la Figura 16.

	<u>Línea celular B16F10</u>			
	[DCA-Na]mM/mL	24 h	48 h	72 h
% Viabilidad celular relativa (VCR)	0	100±0.007	100±2.89	100±3.9
	75	93.1±0.48	81.61±4.89	73.88±4.02
	150	92.54±0.007	58.34±0.07	27.08±0.99
	225	79.87±0.007	56.51±0.14	25.87±1.01
	300	75.73±0.014	44.47±0.42	14.71±2.05
	375	70.01±0.035	43.77±0.49	9.83±1.83
	450	69.61±0.042	38.08±0.70	9.79±0.77
	525	69.15±0.063	35.73±1.13	9.09±0.070
	600	68.21±0.035	29.43±1.83	9.05±0.42
	675	67.78±0.021	24.72±1.69	8.93±0.35
	750	66.66±0.084	9.96±0.98	8.7±0.21

Tabla 3. Efecto del DCA-Na sobre la VCR en la línea celular B16F10. Los datos representan la media ±DS de experimentos realizados por triplicado.

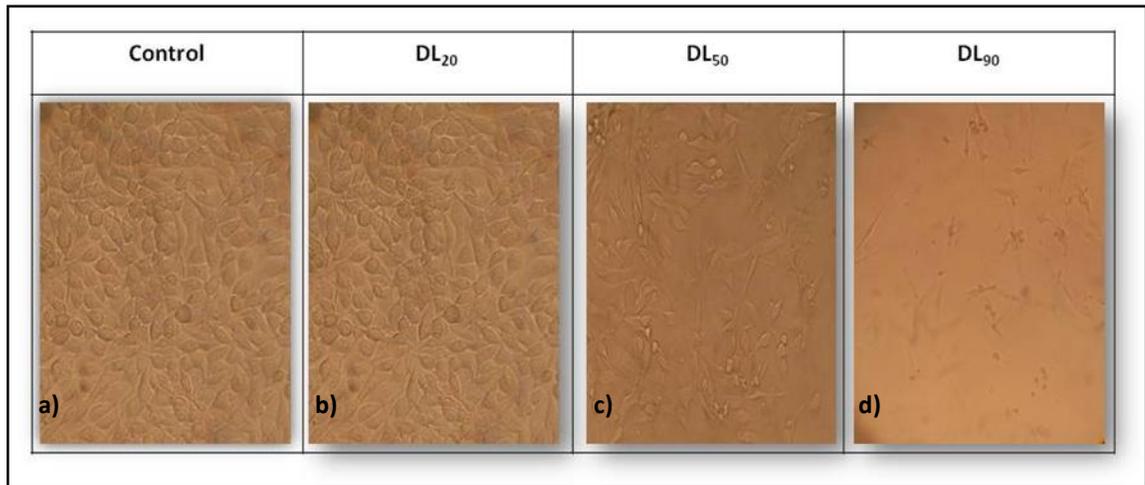


Figura 17. Efecto del DCA-Na sobre la morfología en la línea celular B16F10. 5×10^3 células/pozo, fueron cultivadas y tratadas con DCA-Na: a) control, b) DL_{20} , c) DL_{50} y d) DL_{90} , incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% de aire y 5% CO_2 durante 48 horas. Los cambios morfológicos y disminución de la proliferación celular fueron observados mediante microscopía invertida (TE-Eclipse 300).

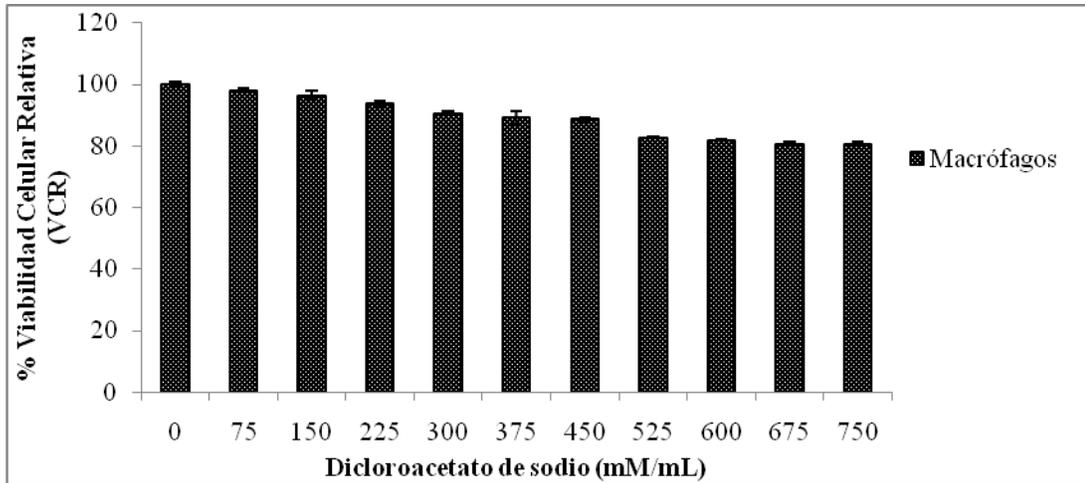


Figura 18. Efecto del DCA-Na sobre la VCR en macrófagos peritoneales murinos. Ratones de la cepa C57BL6, fueron sacrificados, y mediante lavados peritoneales con RPMI 1640 se obtuvieron macrófagos peritoneales, posteriormente se centrifugaron a 1200 rpm/10 minutos. Los macrófagos fueron cultivados a una concentración 5×10^3 células/pozo, e incubados por 24 horas para su adherencia y tratadas con DCA-Na (0-750mM/mL) incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% de aire y CO_2 durante 72 horas. El porcentaje de viabilidad celular relativa (%VCR) fue determinada mediante la técnica de MTT, mediante la D.O. a 540 nm. Los experimentos se realizaron por triplicado, los datos representan la media con su respectiva $\pm\text{DS}$ (* $p < 0.05$ comparado con el control).

6.2 El DCA-Na no induce senescencia en la línea celular B16F10

A diferencia de otros tipos de respuestas celulares, tales como la necrosis o apoptosis, el papel de la senescencia celular es un campo poco conocido, causada por daño celular oxidativo, acortamiento de los telómeros, daños en el DNA entre otros factores, sin embargo diversas investigaciones han vinculado la inducción o activación de este mecanismo en los procesos de supresión tumoral, limitando la transformación maligna, y controlando la proliferación excesiva impulsada por mutaciones oncogénicas (Tianwei Li *et al.*, 2006), algunos quimioterapéuticos que utilizan este mecanismo para causar la disminución del crecimiento tumoral son la doxorubicina y cisplatino que afectan la estructura del DNA, o el taxol y vincristina los cuales tienen como diana los microtúbulos (Trapero *et al.*, 2008).

Uno de los ensayos más utilizados para determinar la senescencia celular es mediante la evaluación SA- β -gal (β -galactosidasa asociada a senescencia), su actividad es evaluada por el aumento del contenido de B-galactosidasa lisosomal de las células senescentes, dentro de un pH entre 4.0 – 6.0, rango óptimo de detección, nuestros resultados indican que tanto la línea celular B16F10 sin tratamiento (Figura 19, inciso b) y con el tratamiento de DCA-Na en DL₅₀ y DL₉₀ (Figura 19, inciso c y d) no conduce a la inducción de senescencia, a diferencia de la línea celular B16F10 tratada con doxorubicina (Figura 19, inciso a) en donde el interior de las células se observa teñido de un complejo azul mediante microscopia, debido a la actividad de β -Galactosidasa, este último agente empleado como un control positivo.

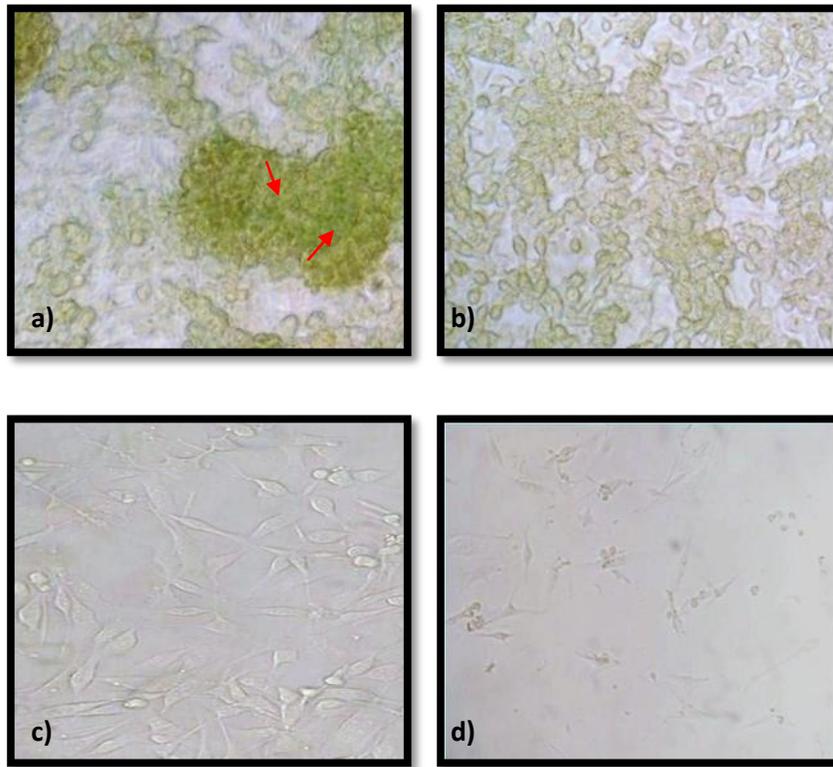


Figura 19. Efecto del DCA-Na sobre la senescencia en la línea celular B16F10. 1×10^6 células B16F10 fueron cultivadas en placas de 6 pozos, posteriormente se trataron con **a)** Control positivo: doxorubicina $0.005 \mu\text{g/mL}$, **b)** B16F10 (control) **c)** DL_{50} y **d)** DL_{90} de DCA-Na, incubadas a 37°C en una atmósfera a $95\% \text{ O}_2$ y CO_2 durante 48 horas, la senescencia celular fue evaluada mediante el kit “BioVision Senescence Detection Kit” (BioVision, Mountain View, USA). Las células son fijadas en 2% de formaldehído y 0.2% de glutaraldehído, posteriormente se añade el mix de (SA- β -gal) y se incuba la placa una noche a 37°C , finalmente las células son examinadas por microscopía, (TE-ECLIPSE 300) determinando los porcentajes de células teñidas por SA- β -gal, positivo para senescencia.

6.3 El DCA-Na induce cambios morfológicos y muerte celular por apoptosis en la línea celular B16F10

El potencial de un fármaco para inducir la apoptosis ha sido ampliamente investigado como una estrategia para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer, se sabe que la apoptosis puede ser desencadenada por una variedad de señales internas o externas, caracterizada principalmente por cambios en la composición de la membrana celular, alteración en la conformación del citoesqueleto, aumento y activación de síntesis de algunas proteínas necesarias en las rutas metabólicas de los procesos de muerte celular, condensación y fragmentación de la cromatina, por acción de endonucleasas, principales indicadores de la muerte celular por apoptosis.

Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento con DCA-Na en las DL₂₀, DL₅₀ y DL₉₀ en la línea celular B16F10, afectan la integridad de la membrana plasmática, esto determinado mediante la tinción de naranja de acridina y bromuro de etidio los cuales penetran la membrana plasmática de las células en temprana apoptosis tiñendo las células muertas de color rojo-naranja fluorescente (Figura 20 incisos b, c y d), esto en comparación del control que muestran un color verde fluorescente consideradas células viables (Figura 20, inciso a).

Para verificar estos resultados, se realizó la evaluación de muerte celular mediante la técnica de TUNEL, encontrando que el tratamiento con DCA-Na en las DL₅₀ y DL₉₀ en la línea celular B16F10 (Figura 21, incisos c y d) ocasiona la fragmentación del DNA nucleosomal característica principal de la apoptosis, esto representado por la formación de complejos de color café en el interior de la célula apoptótica, en un período de 48 horas de incubación, en contra parte la línea celular B16F10 sin tratamiento (Figura 21 inciso a) no presentó la formación de estos complejos, manteniendo a las células de color verde indicador de viabilidad celular (Figura 21).

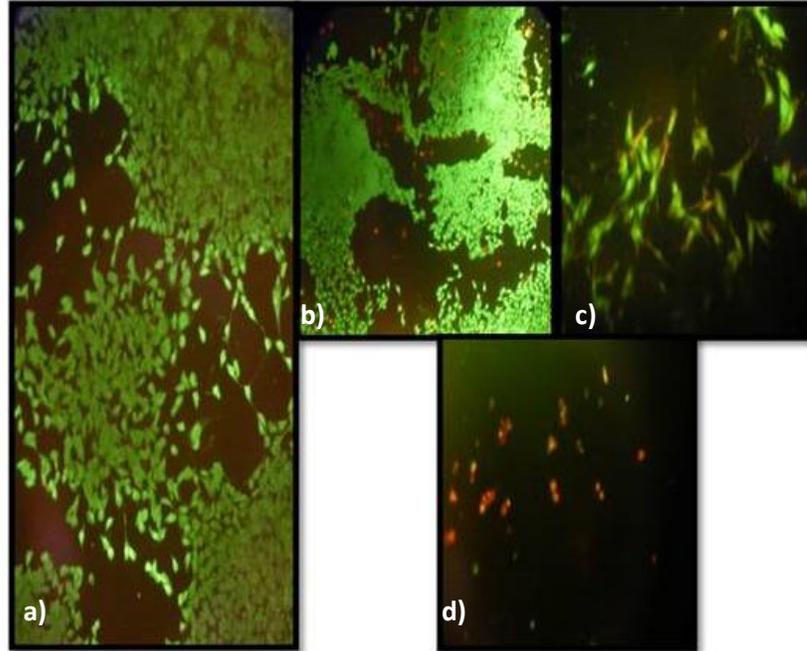


Figura 20. Efecto del DCA-Na sobre la fragmentación nucleosomal en la línea celular B16F10. 1×10^6 células B16F10 fueron cultivadas en placas de 6 pozos, posteriormente se trataron con **b)** DL₂₀, **c)** DL₅₀, **d)** DL₉₀ de DCA-Na y **a)** B16F10 (control) e incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% O₂ y CO₂ durante 48 horas, posteriormente se realizó la tinción de naranja de acridina:bromuro de etido (1:1), se incubó la placa por 5 minutos y finalmente se observó por microscopia de fluorescencia invertido, determinando las células viables (verde fluorescente) y células en porceso apoptótico (naranja-rojo fluorescente).

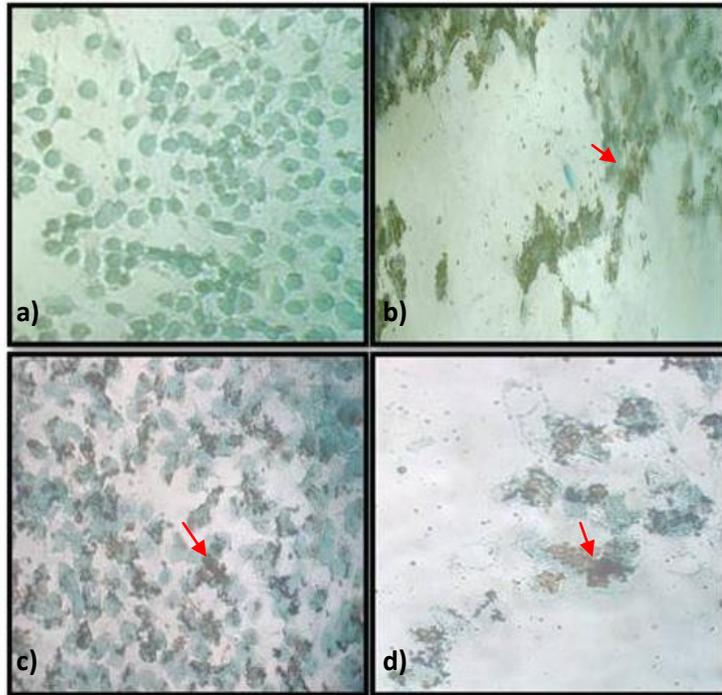


Figura 21. Efecto apoptótico del DCA-Na sobre la línea celular B16F10. 5×10^3 células fueron cultivadas en placas de 96 pozos, e incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% O_2 y CO_2 durante 48 horas, posteriormente se trataron con **b)** DL_{50} , y **d)** DL_{90} de DCA-Na, **a)** B16F10 (control) y **b)** mostrando un control positivo proporcionado por “TACS 2 TdT-DAB In situ Apoptosis Detection Kit”, posteriormente se fijan las células por 10 minutos a T.A. con formaldehído al 3.7%, y se siguen las instrucciones del fabricante. Finalmente los cuerpos apoptóticos son observados por la formación de complejos color café en el interior celular, observado mediante microscopia (TE-ECLIPSE 300).

6.4 El DCA-Na disminuye la actividad de LDH en la línea celular B16F10

La actividad de LDH fue evaluada debido a que en las células tumorales en condiciones de aerobiosis tienen una tasa de glicólisis anormalmente alta, lo cual es conocido como glicólisis aeróbica o efecto Warburg, en donde la enzima lactato deshidrogenasa es la encargada de catalizar la conversión de piruvato hacia lactato, reciclando NAD^+ , la cual es una molécula requerida por la maquinaria celular para la producción energética (Lea et al., 2009). Por esta razón, la actividad de LDH fue evaluada en la línea celular B16F10 tratada con dicloroacetato de sodio (DCA-Na) en rangos de concentración de 0 a 750 mM/mL, enfocándonos principalmente en los resultados obtenidos en las concentraciones de 0, 75, 300 y 750 mM/mL de DCA-Na, que corresponden a las dosis letales determinadas previamente (Tabla 3 y Figura 16). Encontrando que a las 24 horas, hubo una actividad en la DL_{20} 0.505 U/mL, DL_{50} 0.095 U/mL y DL_{90} 0.023 U/mL de LDH respectivamente, comparado con el control (0.627 U/mL), y a las 48 horas se obtuvo una actividad en la DL_{20} 0.500 U/mL, DL_{50} 0.106 U/mL y DL_{90} 0.008 U/mL, en comparación con el control (0.655 U/mL), determinando que el tratamiento con DCA-Na en la línea celular B16F10 disminuye la actividad de LDH de una manera dependiente de dosis (* $p < 0.05$). (Figura 22), con estos resultados podemos asumir que el tratamiento con DCA-Na en la línea celular B16F10, favorece la entrada de piruvato hacia la mitocondria fomentando la fosforilación oxidativa pudiendo afectar la regulación de diversos procesos celulares incluyendo ciclo y muerte celular.

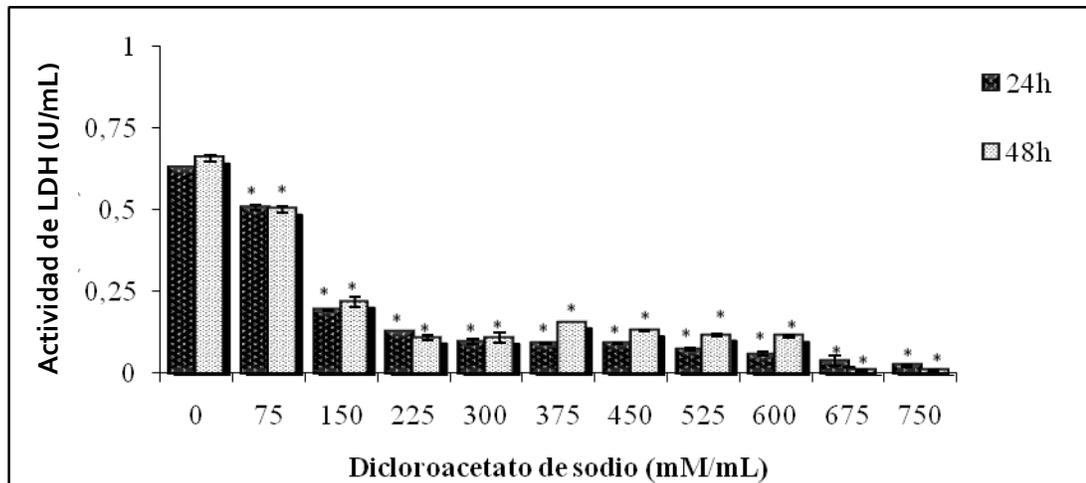


Figura 22. Actividad de LDH en la línea celular B16F10 tratada con DCA-Na. 5×10^3 células/pozo fueron cultivadas y posteriormente tratadas con DCA-Na (0-750mM/mL) e incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% de aire y 5% CO₂ durante 24 y 48 horas. La actividad de LDH fue evaluada mediante el cambio en la absorbancia (Δ abs) debido a la reducción de NAD⁺, monitoreado por la absorbancia a 490 nm, se utilizó el kit comercial “Cytotoxicity Detection Lactate Dehydrogenase” (Roche, Indianapolis, USA) (*p<0.05 en comparación con el control).

6.5 El DCA-Na inhibe la actividad de PKA dependiente de AMP cíclico en la línea celular B16F10

En este estudio consideramos de vital importancia si el tratamiento con DCA-Na afecta la actividad de PKA dependiente de AMP cíclico en la línea celular B16F10, debido a que la modulación de los sistemas de los segundos mensajeros como lo es el AMPc, pueden modificar el funcionamiento celular y causar inestabilidad de muchos procesos incluyendo mitosis celular. El AMPc actúa principalmente a través de la unión al complejo PKA, que participa en la iniciación y progresión de tumores, resultando este complejo molecular en un potencial blanco de tratamiento farmacológico en tumores (Cooper y Hausman, 2006; Caretta y Mucignant, 2011).

La actividad de PKA/AMPc en la línea celular B16F10 tratada con DCA-Na se determino mediante la secuencia del aminoácido del péptido sustrato específico de PKA (L-R-R-A-S-L-G) usando el PepTag®, el cual proporciona controles positivos y negativos, con la finalidad de corroborar los resultados obtenidos (materiales y métodos), evaluando la migración tanto de las especies fosforiladas hacia el electrodo positivo (forma activa) como las no fosforiladas hacia el electrodo negativo (forma inactiva). Encontrando que la línea celular B16F10 (control) posee formas fosforiladas y no fosforiladas manteniendo una regulación de la actividad de PKA/AMPC, por el contrario, el tratamiento con DCA-Na en la DL₂₀, DL₅₀ y DL₉₀ en B16F10 a las 48 horas inhibe la activación de PKA/AMPc, generando formas no fosforiladas o inactivas de PKA/AMPc (Figura 23).

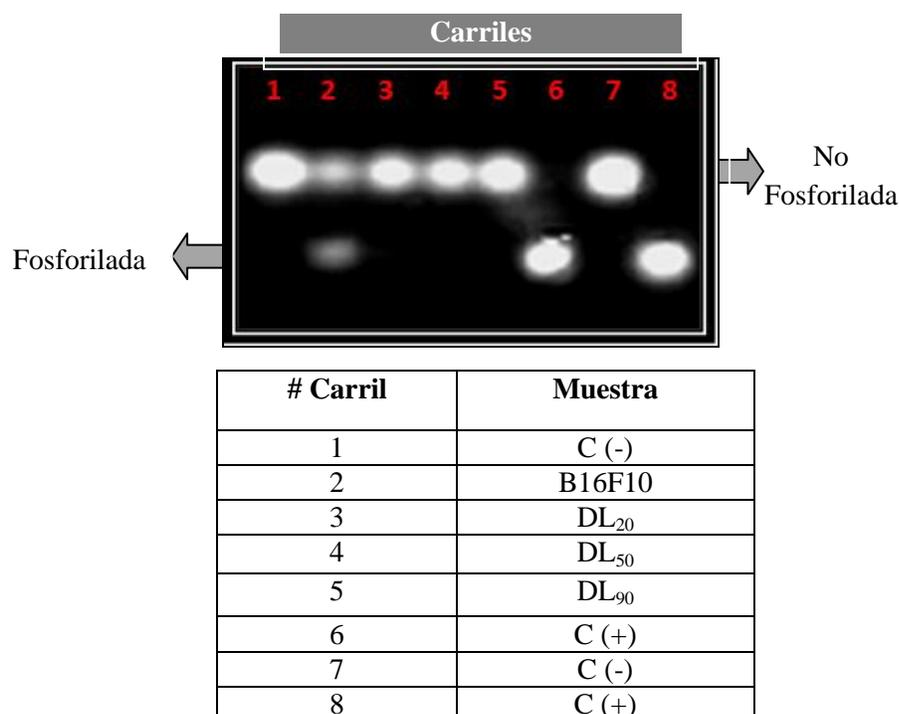


Figura 23. Actividad de PKA dependiente de AMP cíclico en la línea celular B16F10. 5×10^6 células fueron cultivadas en cajas de 25 cm^2 , posteriormente se trataron con las DL₂₀, DL₅₀ y DL₉₀ de DCA-Na e incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% O₂ y CO₂ durante 48 horas. La evaluación se llevó a cabo mediante el uso de un kit comercial “Pep Tag for Non-Radioactive Detection of Protein Kinase C or cAMP Dependent Protein Kinase” (Promega, Madison, USA), primeramente se resuspendieron las células en buffer de extracción de PKA, seguido de la sonicación por 1 minuto, colectando los lisados celulares, posteriormente $2 \mu\text{g}$ del péptido sustrato PepTag A1 fue incubado con lisados celulares por 10 minutos a T.A. La reacción fue finalizada por calentamiento a 95°C por 10 minutos y las muestras fueron analizadas en un gel de agarosa al 0.8% en buffer Tris- HCl pH 8.0 a 100V por 15 minutos. El péptido fosforilado migra hacia el ánodo, mientras el péptido no fosforilado migra hacia el cátodo. Los carriles 1 y 7 representan el control negativo, 6 y 8: control positivo, carril 2: lisado de células B16F10, 3: lisado de células B16F10 tratadas con la DL₂₀ de DCA-Na, 4: lisado de células B16F10 tratadas con DL₅₀ de DCA-Na, 5: lisado de células tratadas con DL₉₀ de DCA-Na.

6.6 El DCA-Na disminuye la expresión de GAPDH en la línea celular B16F10

La razón de evaluar la expresión de GAPDH, es debido a que esta es una enzima de gran importancia en la glicólisis, y que se encuentra sobreexpresada en diversos tumores y líneas celulares de cáncer (Said et al., 2009).

Los efectos sobre la expresión del RNAm de GAPDH en la línea celular B16F10 tratada con las DL₂₀, DL₅₀ y DL₉₀ de DCA-Na fueron determinados mediante RT-PCR. Las DL₂₀ y DL₅₀ de DCA-Na a las 48 horas no afectaron la expresión de GAPDH, en comparación con el control, a diferencia de la DL₉₀ del DCA-Na la cual disminuye considerablemente el nivel de expresión de GAPDH en la línea B16F10 (Figura 24). Se emplearon como genes constitutivos β -actina y 18s ribosomal, los cuales no se pudieron normalizar debido a que el tratamiento con DCA-Na a la DL₉₀ afectó la expresión de estos genes al igual que en GAPDH.

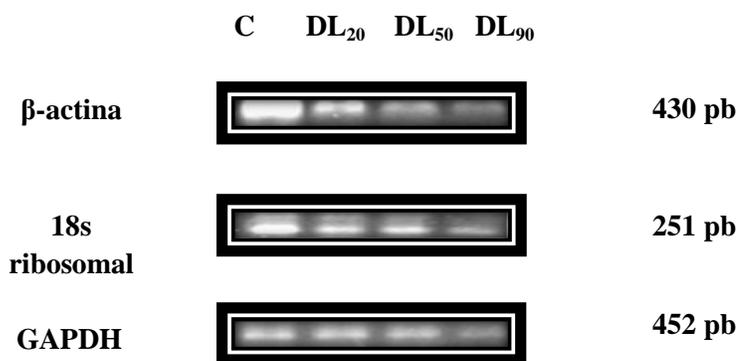


Figura 24. Expresión del RNAm de GAPDH en la línea celular B16F10 tratada DCA-Na. 1×10^6 células/pozo fueron cultivadas en cajas de 25cm^2 , posteriormente se trataron con las DL₂₀, DL₅₀ y DL₉₀ de DCA-Na e incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% de aire y 5% CO_2 durante 48 horas, el RNA total fue extraído para determinar la expresión de RNAm de GAPDH, mediante RT-PCR, los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.2% y visualizados empleando bromuro de etidio con luz ultravioleta y finalmente fotografiados. Normalizado mediante la expresión de β -actina. C = Línea celular B16F10 (control) sin tratamiento.

6.7 El DCA-Na afecta la capacidad angiogénica, disminuyendo la actividad de unión del HIF-1 α al DNA, la invasión y la formación de estructuras pro-angiogénicas en la línea celular B16F10

Se determinó si el tratamiento con DCA-Na en la línea celular B16F10 afecta la actividad de HIF-1 α , debido a que este factor de transcripción juega un papel regulador de los niveles de oxígeno en el microambiente celular manteniendo la homeostasis, sin embargo en las células tumorales existen microambientes hipóxicos lo que conduce a la activación de HIF-1 afectando la expresión de genes asociados a invasión, angiogénesis, metabolismo energético, proliferación y sobrevivencia confiriendo ventajas al crecimiento tumoral, por lo cual su regulación es un blanco terapéutico contra diversos tipos de cáncer (Wang *et al.*, 2003).

Se analizó la unión entre la secuencia consenso 5'-ACGTG-3' del dsDNA y del factor de transcripción HIF-1 α de los extractos nucleares obtenidos de la línea celular B16F10 sin tratamiento y tratadas previamente con CoCl₂ (50 mM) incubadas por 4 horas, posteriormente tratadas con DCA-Na en las DL₅₀ (300 mM/mL) y DL₉₀ (750 mM/mL). Encontrando que la línea celular B16F10 sin previo tratamiento con CoCl₂, presenta una activación basal de HIF-1 α (0.311), disminuyendo significativamente con las DL₅₀ (0.201) y con DL₉₀ (0.128) de DCA-Na. El tratamiento de CoCl₂ en la línea celular B16F10 incremento la actividad de HIF-1 α (0.333), la cual disminuyó significativamente al ser tratadas con las DL₅₀ (0.200) y DL₉₀ (0.133) del DCA-Na (Figura 25). La línea celular B16F10 es altamente invasiva y metastática, el tratamiento con DCA-Na disminuyó significativamente de manera dependiente de dosis la capacidad de invasión, obteniendo porcentajes de 40 y 12.5 en las DL_(50 y 90), respectivamente a las 22 horas, mientras que a las 48 horas, encontramos porcentajes de 25 y 7.5 en las DL_(50 y 90), respectivamente, estos datos comparados con los controles donde se observo un 100% de invasión celular (Figura 26 y Tabla 4). Para evaluar el efecto del DCA-Na sobre la angiogénesis, en este ensayo se utilizó un control inductor de la angiogénesis (PMA 1mM) y un control inhibidor (JNJ 3mM), incluidos en el kit. Nuestros resultados demuestran que el DCA-Na evita la formación de estructuras pro-angiogénicas a las 24 y

48 h, datos similares al tratamiento con el inhibidor (JNJ 3 mM), a diferencia del control donde se observa angiogénesis (Figura 27).

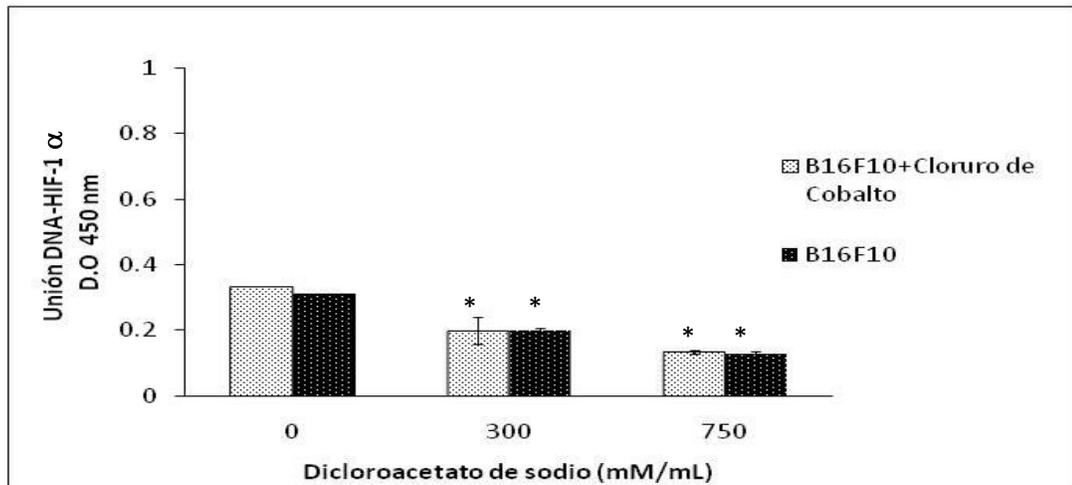


Figura 25. Actividad de unión del HIF-1 α al DNA en la línea celular B16F10 tratada con DCA-Na. 1×10^7 células fueron cultivadas en cajas de 75cm^2 , tratadas con CoCl_2 (50mM) e incubadas por 4 h. Al finalizar este periodo de tiempo, las células fueron lavadas con PBS 1X, y posteriormente se trataron con las DL_{50} (300mM/mL) y DL_{90} (750mM/mL) de DCA-Na e incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% de aire y 5% CO_2 durante 48 horas. La actividad de HIF-1 α fue determinada mediante el uso de un kit comercial “HIF-1 α Transcription Factor Assay” (Cayman Chemical kit, USA) * $p < 0.05$ en comparación con el control.

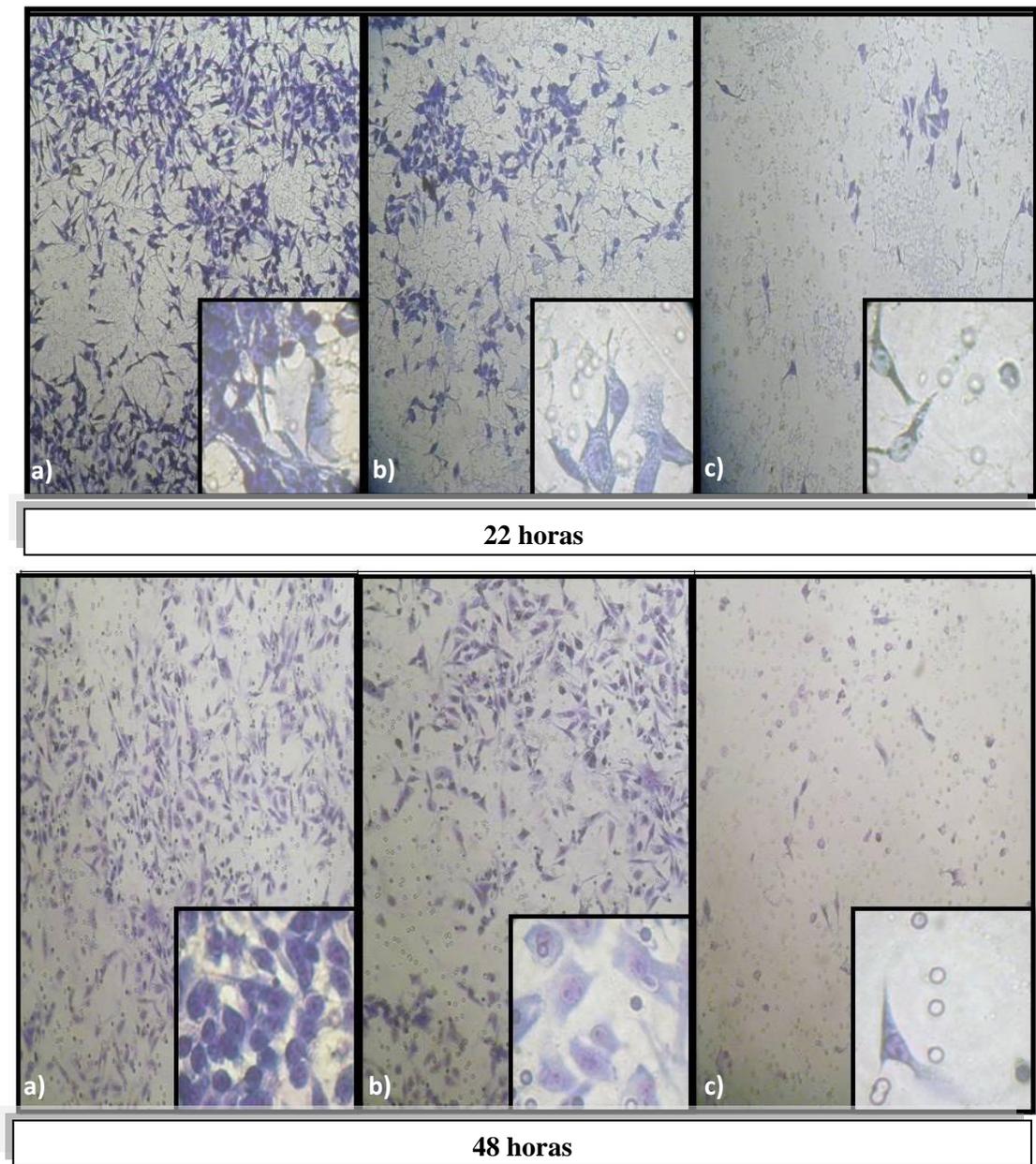


Figura 26. Efecto del DCA-Na sobre la invasión en la línea celular B16F10. 1×10^6 células/ pozo fueron cultivadas en placas de cámara de invasión “BioCoat™ Matrigel™” (BD Biosciences, Bedford, MA) de 6 pozos, la cual incluye insertos contenedores de una matriz membranal basada en MATRIGEL con poros de $8 \mu\text{M}$. Inicialmente los insertos son rehidratados por 2 horas con RPMI-1640, posteriormente se añaden 2.5 mL de quimioattractante (SFB 5% con medio RPMI-1640), e inmediatamente se añade la suspensión celular, representando los resultados obtenidos en los siguientes incisos: **a)** B16F10 (control), **b)** DL_{50} y **c)** DL_{90} , por 22 y 48 horas e incubados a 37°C , 5% CO_2 . Finalmente se fotografiaron las imágenes observadas.

% Invasión en la línea celular B16F10			
Tiempo	Control	DL₅₀	DL₉₀
22 h	100	40	12.5
48 h	100	25	7.5

Tabla 4. Efecto del DCA-Na sobre el porcentaje de invasión en la línea celular B16F10. Al observar las células mediante microscopía, se determinó el porcentaje de invasión, a través del conteo del número de células que invadieron el inserto en el grupo control sobre el número de células que invadieron el inserto en el grupo tratado, se obtienen los porcentajes de invasión evaluado mediante el uso de “BioCoat™ Matrigel™” (BD Biosciences, Bedford, MA), en periodos de incubación de 22 y 48 horas.

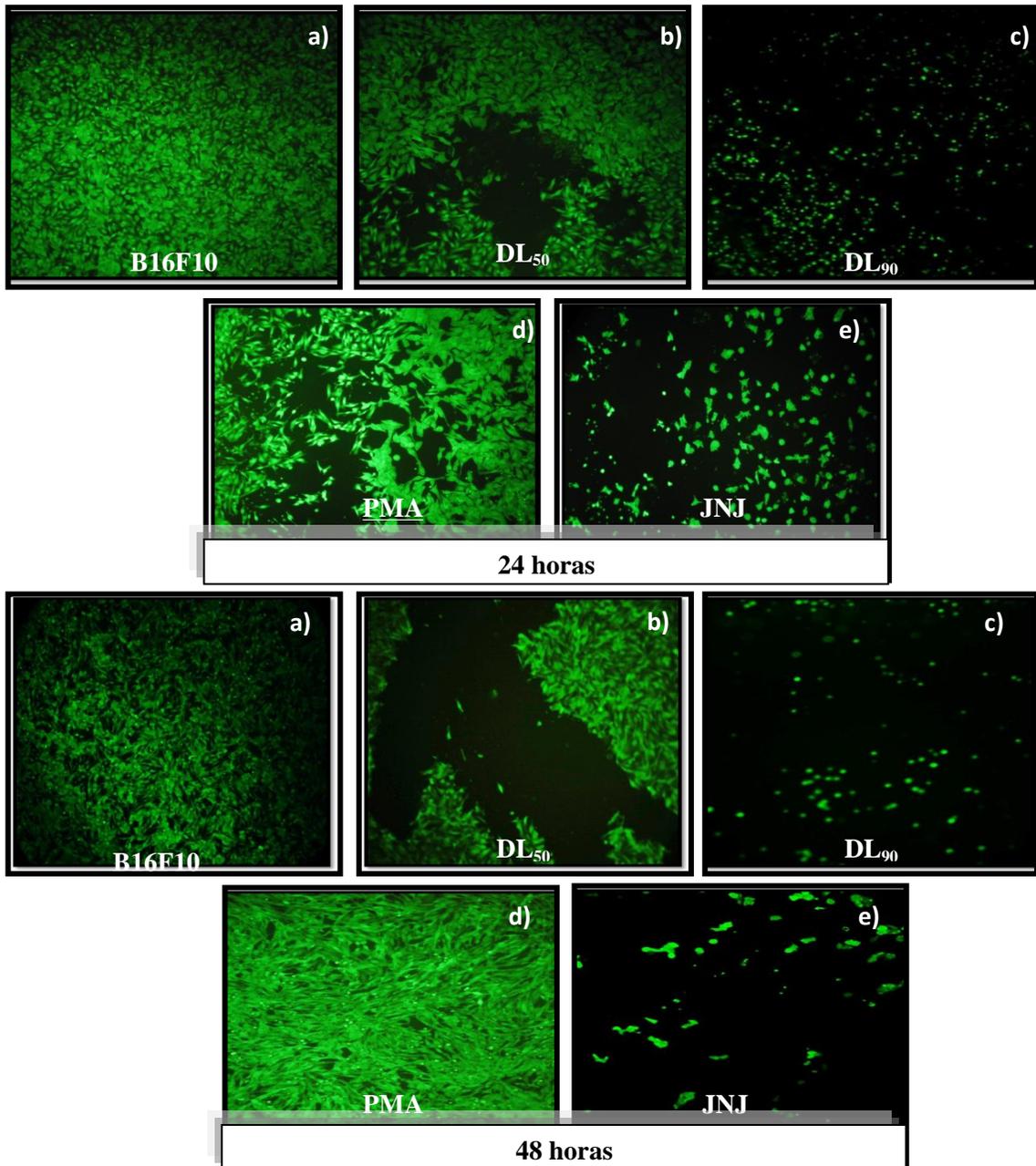


Figura 27. Efecto del DCA-Na sobre la angiogénesis en la línea celular B16F10. 5×10^3 células B16F10/pozo fueron cultivadas y posteriormente tratadas con **b)** DL₅₀, **c)** DL₉₀ de DCA-Na y **a)** células B16F10 (control) sin tratamiento e incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% de aire y 5% CO₂ durante 24 y 48 horas. La determinación de angiogénesis fue evaluada mediante el kit comercial “*In vitro* Angiogenesis Assay” (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) el cual proporciona como controles **d)** PMA (1mM) y **e)** JNJ (3mM) activadores e inhibidores de angiogénesis, respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante para su uso. Finalmente, las células son teñidas mediante una solución basada en calceína 1:100 usado para visualizar la organización celular, por último las células son examinadas bajo microscopía invertida de fluorescencia con filtros y emisión a 535 nm.

In vivo

6.8 Efecto del DCA-Na sobre la sobrevivencia y mortalidad en ratones C57BL/6 inoculados con células de melanoma murino B16F10.

Para la evaluación del efecto del DCA-Na *in vivo* se estableció un modelo de melanoma murino, empleando ratones de la cepa C57BL/6 los cuales fueron inoculados vía subcutánea con células de melanoma B16F10 en una concentración de 500,000 células/ratón. En los ratones del grupo control (inoculados con células B16F10) desarrollaron un tumor visible a los 11.5 ± 2.88 días, presentando una mortalidad a los 30.2 ± 1.92 días después de la inoculación. El 100% de los ratones tratados intraperitonealmente con 1000 mg/kg de DCA-Na 2 veces al día, murieron a los 24.33 ± 3.51 días. Esta mortalidad prematura suponemos que se encuentra asociada a la dosis empleada en este tratamiento, ya que cuando se redujo la concentración de DCA-Na a 500 mg/kg 2 veces al día empleando la misma vía de administración, no se observó la mortalidad asociada al tratamiento obteniendo un 20% de sobrevivencia y un retardo en el crecimiento tumoral y una media del tiempo de muerte de 31.66 ± 0.47 días, comparado con el grupo control (Tabla 5). Los siguientes experimentos *in vivo* fueron realizados empleando la dosis de 500 mg/kg 2 veces al día vía intraperitoneal, sin presentar efectos secundarios en los ratones tratados.

Tratamiento	Media del tiempo de aparición del tumor (días±DS)	% Supervivencia	Media de mortalidad (días±DS)	% Mortalidad
RNI	0	100	0	0
Control	11.5±2.88	0	30.2±1.92	100
DCA-Na 500 mg/kg	11.5±2.88	20	31.66±0.47	80
DCA-Na 1000mg/kg	11.5±2.88	0	24.33±3.51	100

Tabla 5. Media del tiempo de aparición del tumor, porcentaje de supervivencia, media y porcentaje de mortalidad en ratones C57BL/6 inoculados con células de melanoma B16F10. Ratones C57BL/6 fueron inoculados vía subcutánea en el flanco derecho a una concentración de 500,000 células B16F10, determinando el tiempo de aparición de los tumores, posterior a esta observación, fueron administrados vía *i.p* los tratamientos de DCA-Na en dosis de 500 y 1000mg/kg 2 veces al día. Los datos representan la media con su respectiva ±DS.

* RNI: Ratones no inoculados con células B16F10

* Control: Ratones inoculados con 500,000 células B16F10 sin tratamiento posterior al desarrollo tumoral.

6.9 Efecto del DCA-Na sobre el peso corporal, peso-volumen tumoral y metástasis en ratones C57BL/6 inoculados con células de melanoma B16F10

Para este objetivo se decidió sacrificar a los ratones mediante dislocación cervical a los 28 días después de la inoculación de las células B16F10. En cuanto al peso corporal no se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo control (inoculados con células B16F10) y el grupo tratado con DCA-Na (500 mg/kg); obteniendo una media de peso corporal de 21.15 ± 1.84 g en el grupo control y 22.53 ± 2.6 g para el grupo tratado con DCA-Na (Figura 28). Al evaluar el peso y volumen tumoral observamos una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo control y el grupo tratado con DCA-Na, mostrando que el tratamiento con DCA-Na disminuyó el peso y el volumen tumoral (1.74 g y 2.35 mm^3 , respectivamente) comparado con el grupo control (8.16 g y 21.09 mm^3 , respectivamente) (Figura 29 y 30). Al realizar la necropsia de los ratones se encontró que el tratamiento con DCA-Na evitó la metástasis hacia cavidad peritoneal, intestino e hígado comparado con los ratones control los cuales presentaban estas metástasis (Tabla 6).

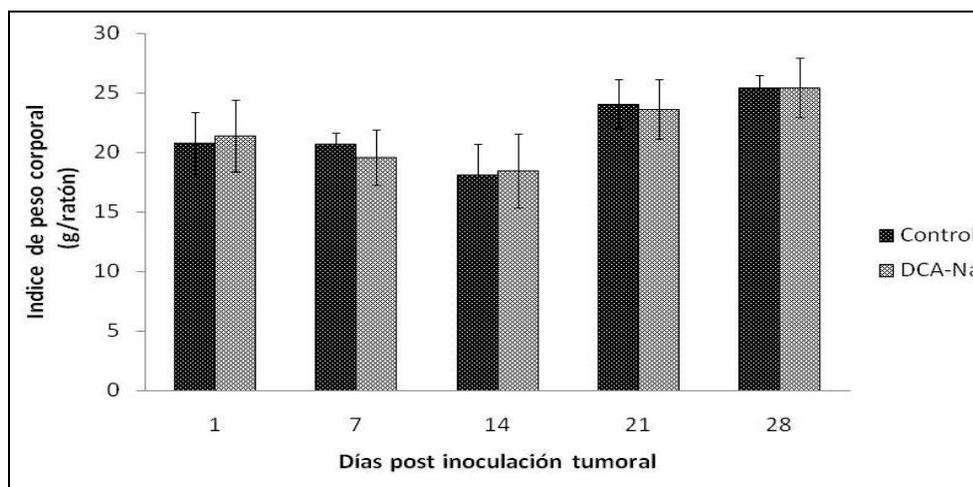


Figura 28. Efecto del DCA-Na sobre el índice de peso corporal en ratones C57BL/6 inoculados con células de melanoma murino B16F10. Ratones C57BL/6 fueron inoculados vía subcutánea en el flanco derecho a una concentración de 500,000 células B16F10, posteriormente el DCA-Na se administró vía *i.p* en dosis de 500 mg/kg 2 veces al día, el índice tumoral fue obtenido cada 7 días, mediante la substracción del peso tumoral sobre el peso corporal, por 28 días después de la inoculación de células B16F10, los datos fueron registrados y analizados.

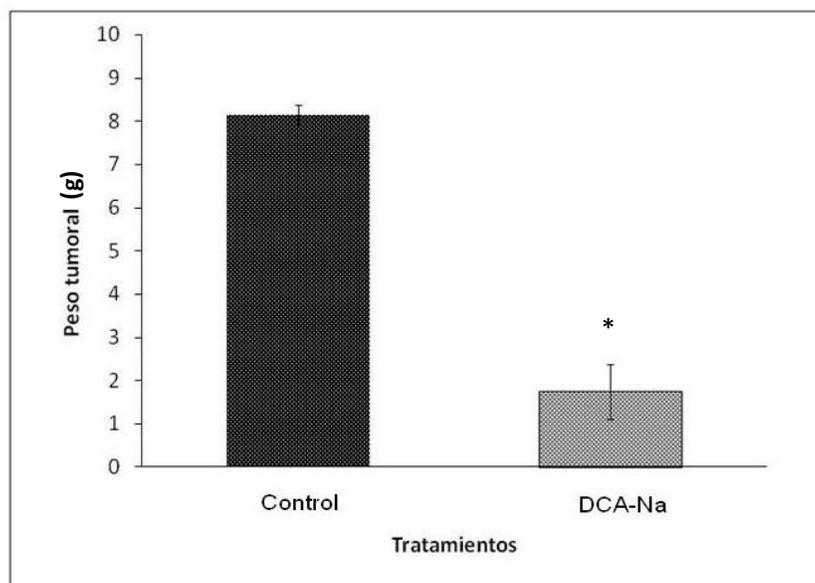


Figura 29. Efecto del DCA-Na sobre el peso tumoral de ratones C57BL/6 inoculados con células de melanoma murino B16F10. Ratones C57BL/6 fueron inoculados vía subcutánea en el flanco derecho a una concentración de 500,000 células B16F10, posteriormente se administró vía *i.p* el tratamiento de DCA-Na (500 mg/kg), los ratones del grupo control y tratados con DCA-Na fueron sacrificados a los 28 días después de la inoculación de las células B16F10, los tumores fueron extirpados quirúrgicamente y finalmente se tomó el peso de cada uno. Los datos representan la media con su respectiva \pm DS.

Tratamientos	Músculo	Cavidad peritoneal	Intestino	Hígado
Control	✓	✓	✓	✓
DCA-Na	✓			

Tabla 6. Determinación de la presencia de metástasis en ratones C57BL/6 inoculados con células de melanoma murino B16F10. Ratones C57BL/6 fueron inoculados vía subcutánea en el flanco derecho a una concentración de 500,000 células B16F10, posteriormente fueron administrados vía *i.p* los tratamientos de DCA-Na en dosis de 500 mg/kg 2 veces al día, sacrificados a los 28 días de inoculación de células B16F10 para la evaluación de la presencia de metástasis.

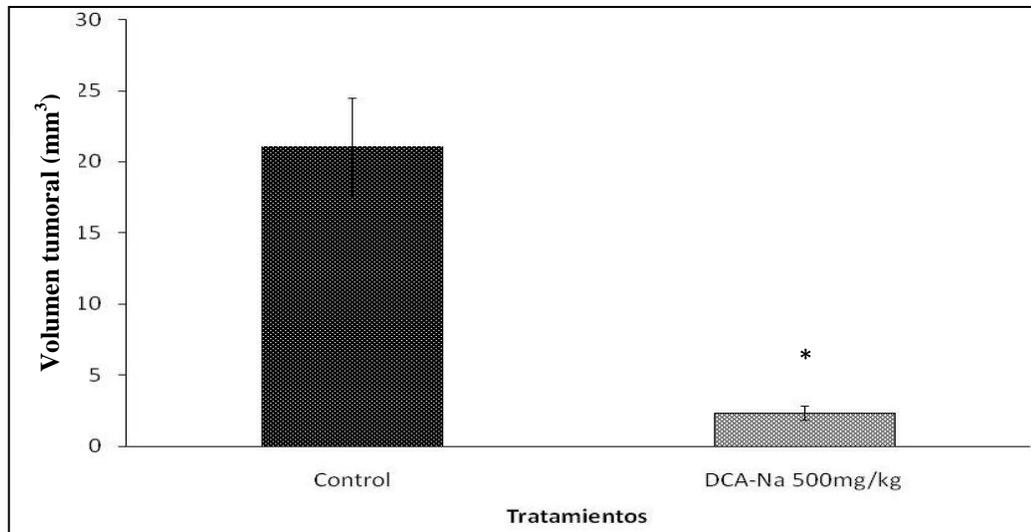


Figura 30. Efecto del DCA-Na sobre el volumen tumoral en ratones C57BL/6 inoculados con células de melanoma murino B16F10. Ratones C57BL/6 fueron inoculados vía subcutánea en el flanco derecho a una concentración de 500,000 células B16F10, posteriormente fueron administrados vía *i.p* los tratamientos de DCA-Na en dosis de 500 mg/kg 2 veces al día, el volumen tumoral fue registrado cada 7 días, mediante la fórmula volumen = (longitud) (ancho)², 28 días después de la inoculación de células B16F10, los datos fueron registrados y analizados.

6.10 Hallazgos patológicos en ratones C57BL/6 inoculados con células de melanoma B16F10 tratados con DCA-Na

A los 7.5 ± 1.84 días de la administración del tratamiento con DCA-Na provocó la aparición de un foco de muerte celular en el centro tumoral, el cual empieza en algunos ratones a expandirse hasta erradicar el tumor y en otros se mantiene. (Figura 31). Consideramos de importancia realizar un estudio histopatológico en los tumores de ratones tratados y sin tratamiento a los 28 días después de la inoculación de células B16F10, en el grupo control los hallazgos patológicos reportados fueron la presencia de numerosas mitosis atípicas, las cuales forman estructuras rosetoides con vasos sanguíneos en su interior, además de apreciarse amplias áreas de necrosis, con hemorragias, microtrombosis, así como numerosas células inflamatorias (linfocitos y neutrófilos), el tejido presentó un intenso pigmento oscuro correspondiente a la melanina, contrario al grupo tratado con DCA-Na, donde los tumores presentaron escasas mitosis atípicas, las cuales formaron conglomerados celulares, presentando anisocitosis y anisonucleosis, con marcada picnosis, cariorexis y cariólisis, por otro lado, las áreas de necrosis no se encontraron muy extendidas por el tejido, sin embargo se encontraron una gran cantidad de células inflamatorias, principalmente linfocitos, neutrófilos y células plasmáticas, la presencia del pigmento de melanina fue escaso en estos tumores, datos reportados por el departamento de patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL.

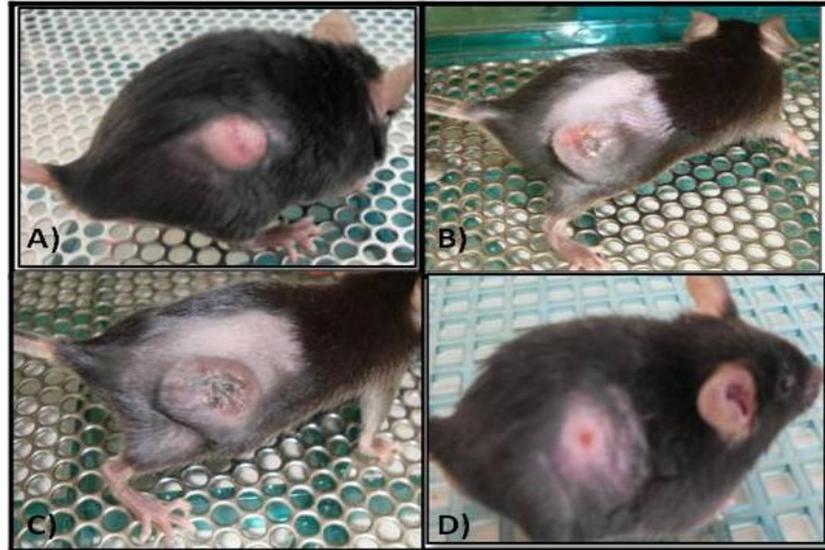


Figura 31. Efecto del DCA-Na sobre el desarrollo tumoral en ratones C57BL/6 inoculados con células de melanoma murino B16F10. Ratones C57BL/6 fueron inoculados vía subcutánea en el flanco derecho a una concentración de 500,000 células B16F10, posteriormente fueron administrados vía *i.p* el tratamiento de DCA-Na en dosis de 500 mg/kg 2 veces al día, sacrificados a los 28 días de inoculación de células B16F10 para la evaluación patológica. **A)** desarrollo tumoral, **B y C)** muestran la aparición del foco de muerte celular en el centro tumoral y **D)** representa la regresión tumoral por el tratamiento con DCA-Na.

7. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos sobre la disminución de la viabilidad por el tratamiento con DCA-Na sobre las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino (TC-1, Hela) cáncer de próstata (PC3, DU145) cáncer de hígado (Huh-7), cáncer de pulmón (Iner 51), cáncer de mama (MDAMB-231, MCF-7), melanoma (B16F10), sin afectar la viabilidad de líneas celulares normales o no tumorales *in vitro* son similares a los obtenidos por Jason Y.Y. Wong et al, (2008) sobre las líneas celulares de cáncer endometrial AN3CA, SKUT1B, RL95-2, KLE y de mama MCF-7, por BM Madhok et al, (2010) sobre líneas de cáncer colorectal SW480, HT29 y por Ramon C Sun et al, (2010) en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, T-47D, 13762MAT y V14.

La muerte inducida por apoptosis y el no generar senescencia celular parece ser el mayor determinante de mortalidad en la línea celular de melanoma B16F10 tratadas con el DCA-Na. Siranoush Shahrzad *et al*, (2010), encontraron datos similares en un estudio sobre líneas celulares de cáncer colorectal humano en donde el tratamiento con DCA en condiciones normóxicas indujo apoptosis sobre las líneas celulares SW480 y Caco-2 pero la apoptosis disminuyó cuando estas células fueron tratadas en condiciones de hipoxia. La apoptosis es una de los tipos de muerte celular que se prefiere sea inducida por un agente antitumoral debido a que este tipo de muerte no genera inflamación como la necrosis, un ejemplo clásico de droga antitumoral que induce apoptosis es la doxorubicina, pero recientemente se ha encontrado que esta droga tiene la capacidad de inducir catástrofe mitótica acompañada por un fenotipo parecido a senescencia en ciertas líneas celulares a diferentes dosis empleadas (Eom *et al.*, 2005), en nuestro estudio esto no ocurrió. Aunque la senescencia y muerte celular son mecanismos seguros a prueba de fallos de protección en contra de la tumorigénesis, ambas de estas formas de respuesta celular pueden ser inducidas en las células de cáncer, suprimiendo la progresión tumoral (Litwiniec *et al.*, 2009).

El crecimiento de varios tumores se encuentra relacionado a la vía PKA-AMPC debido a que este complejo puede activar diferentes proteínas involucradas en la transducción de

señales y crecimiento celular (Caretta y Mucignat-Caretta, 2011) y el hecho de que el DCA-Na en nuestro estudio, disminuya la actividad de este complejo PKA-AMPC e inhiba la actividad de LDH en la línea B16F10 indica que este compuesto tiene la propiedad de promover la regresión de estas células hacia el fenotipo glicolítico induciendo de esta manera la muerte celular. Estos datos se relacionan en parte con los encontrados por Ramon C Sun *et al*, (2010), en donde el tratamiento con DCA en la línea celular de cáncer de mama MAT disminuye la concentración de lactato extracelular. Esto es importante debido a que LDH se expresa y participa en el crecimiento y mantenimiento tumoral, controlando la conversión de piruvato hacia lactato en el proceso glicolítico celular (Fantin *et al*, 2006). A su vez, la expresión de LDH es regulada por HIF-1 α que al activarse conduce a la transcripción de genes asociados a la invasión y metástasis (Xu *et al*, 2005). Aunado a esto, bajo condiciones de hipoxia la subunidad HIF- α es estabilizada y translocada al núcleo donde este dimeriza con HIF-1 β y por unión a elementos de respuesta a hipoxia activa la transcripción de cientos de genes blanco que participan en pasos claves de la tumorigénesis, incluyendo angiogénesis, metabolismo, proliferación, metástasis y diferenciación (Semenza *et al.*, 2008). Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con DCA-Na en la línea celular B16F10, tiene el potencial de disminuir la unión del DNA hacia HIF-1 α , lo que pudiese conducir a una disminución del porcentaje de invasión celular, evitando la formación de angiogénesis. (Duyndam *et al.*, 2001); siendo estos resultados parecidos a los que nosotros encontramos cuando se hicieron pruebas de invasión celular y angiogénesis en las células B16F10 tratadas con DCA-Na. Hipoxia, es una disminución en los niveles de oxígeno en los tejidos, es una característica del microambiente del tumor que ha sido de considerable interés por su contribución en incrementar la tumorigenicidad de las células de cáncer por seleccionar los clones más metastáticos y agresivos y por activar vías que contribuyen a la sobrevivencia de las células del cáncer las cuales pueden tener implicaciones terapéuticas importantes con estos antecedentes se ha hipotetizado que la inhibición concurrente de HIF y VEGF los cuales se encuentran relacionados a la hipoxia intratumoral representaría una combinación terapéutica lógica que pudiera tener aplicaciones en un número de tumores sólidos independientes de su alteración genética (Rapisarda *et al.*, 2009).

La intención de evaluar si la expresión de gen GAPDH es afectado por el tratamiento con DCA-Na es debido a que este compuesto ejerce su efecto a nivel energético de la célula, pero al emplear β -actina y 18s como normalizadores de la expresión observamos que estos genes también se vieron afectados con el tratamiento en dosis altas. El GAPDH es bien conocido por su función catalítica de convertir gliceraldehído 3 fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato y se ha considerado como un gen constitutivo y se emplea para normalizar cambios en la expresión específica del gen en análisis de Northern Blotting RT-PCR y RT-PCR tiempo real. Sin embargo se ha demostrado que su empleo como un gen constitutivo es inapropiado ya que se ha observado que su expresión no es normal en algunas muestras de tumores y su distribución muestra un amplio rango de valores tal es el caso de un estudio realizado en células tumorales de cáncer de mama (MCF-7 y T47D), cáncer de próstata (PC3 y DU-145) las cuales fueron tratadas con amino y no amino bifosfonatos, encontrando que el tratamiento con aminobifosfonatos disminuyó significativamente de una manera dependiente de dosis la expresión del gen GAPDH, datos similares fueron encontrados en este estudio en donde el tratamiento con el DCA-Na en la línea celular de melanoma B16F10 disminuyó la expresión de gen GAPDH, pero solo cuando se emplearon dosis altas. Con estos resultados podemos especular que la viabilidad celular de estas células pudo verse afectada mediante la disminución de la expresión del GAPDH (Valenti1 *et al.*, 2006).

Por otra parte la actina y sus proteínas asociadas juegan un importante papel en componentes estructurales y funcionales tales como el mantenimiento de la morfología celular, adhesión celular, motilidad celular exocitosis, endocitosis y división celular. Cuando las células de mamíferos son transformadas o progresan para adquirir potencial metastático la expresión de la actina y/o proteínas relacionadas a actina tienden a ser modificadas. La β -actina es presente en células no musculares especialmente en la submembrana y participa en el movimiento celular activo (Lee *et al.*, 2011).

Estudios recientes de validación del empleo de genes para control interno fueron examinados en fibroblastos estimulados con suero como tratamiento en donde los fibroblastos NIH-3T3 transfectados con un gen quimérico inducible fueron privados de suero durante 24 h y después tratados con suero al 15% por 8 h, encontrando que los

genes β -2 microglobulina y 18s RNAr son considerados estables en estudios de estimulación de suero, mientras la β -actina y GAPDH no lo son. Datos similares fueron encontrados en nuestro estudio al encontrar una disminución de la expresión causada por el tratamiento con DCA-Na en la expresión de los genes de β -actina y GAPDH (Schmittgen *et al.*, 2000).

El RNA 18s codifica el RNA ribosomal, aunque los RNAs son abundantes, en la célula el RNA 18s ha sido descrito que mantiene la estabilidad bajo algunas condiciones que pudiesen resultar en niveles de RNA mensajero alterados. El RNA 18s ha sido empleado como un control endógeno apropiado en experimentos en cultivo celular y biopsias. En células metabólicamente activas los genes de RNA son eficientemente transcritos para mantener una alta demanda en la maquinaria de síntesis de proteínas. La disponibilidad de factores estimulatorios extracelulares (tales como nutrición o factores de crecimiento), condiciones extracelulares (tales como mutaciones) y drogas pueden alterar la producción de los RNAr y RNAm en distintas maneras o en direcciones opuestas. Es un hecho que en todas las redes de cáncer la transcripción de RNA ribosomal se encuentra aumentada (White *et al.*, 2008).

Nuestros resultados demuestran que la expresión de RNA 18s se disminuyó con el tratamiento del DCA-Na solo en dosis mayores de 750 mM/mL, con esto podemos sugerir que la disminución de los niveles del transcrito 18s refleja una disminución de la maquinaria de translación en las células de cáncer B16F10. En general aunque numerosas referencias de genes empleados normalmente para propósitos de normalización sugieren emplear al RNA ribosomal 18s, β -actina, y GAPDH, nosotros no recomendamos su empleo en experimentos en donde se trate con DCA-Na debido a que esta droga afecta sus niveles de expresión, por lo que deberá de buscarse otro gen constitutivo que sea estable al tratamiento con DCA-Na, pero en este caso nos sirve para demostrar el efecto que el DCA-Na tiene en afectar vías energéticas (GAPDH), componentes estructurales y funcionales de las células (β -actina) y la maquinaria de translación de proteínas (18s).

En nuestros resultados *in vivo*, cuando administramos 1000 mg/kg vía *i.p* dos veces al día a los ratones con tumor tratados con DCA-Na, se presentó una mortalidad asociada

al tratamiento debido a que todos los ratones morían a los 24.33 ± 3.51 días de tratamiento, ya que normalmente mueren a partir del día 30.2 ± 1.92 días después de la inoculación del tumor en los ratones sin tratamiento; además esta mortalidad prematura se eliminó cuando se disminuyó la dosis del DCA-Na a 500 mg/kg dos veces al día. Ramón C. Sun et al, (2009); en un estudio en donde administraron el DCA a dosis oral de 86 mg/kg/día durante 7 días o 200 mg/kg/día vía intraperitoneal durante 14 días en ratas como tratamiento para eliminar el cáncer de pulmón inducido por la inoculación intravenosa de células de la línea celular de adenocarcinoma mamario de rata 13762 MAT, no encontró toxicidad relacionada al tratamiento, observándose una disminución en el número de focos tumorales pulmonares comparadas con el control (Sun *et al.*, 2009). Por otra parte observamos que el tratamiento con el DCA a dosis de 500 mg/kg 2 veces al día, logro alargar el tiempo de muerte en un 20% de los ratones. En nuestro estudio, se decidió sacrificar a los ratones a los 28 días después de la inoculación, una vez recibido el tratamiento con DCA-Na, para evaluar distintos parámetros encontrando que el tratamiento con DCA-Na no afecto el peso de los ratones, pero si disminuyó el volumen y el peso de los tumores además de evitar la metástasis hacia otros órganos, datos similares fueron encontrados por Bonet *et al*, (2009) donde el tratamiento con DCA disminuye el crecimiento del tumor. Otro dato importante es el que el tratamiento con el DCA induce en el día 7 la aparición de un foco de muerte celular en el centro tumoral, el cual empieza en algunos ratones a expandirse hasta erradicar el tumor y en otros se mantiene presente aunque no se elimine el tumor. A nivel histopatológico se pudo observar que el tratamiento con DCA-Na disminuyó el área de necrosis pero indujo una gran cantidad de anisocitosis y anisonucleosis, con marcada picnosis, cariorexis y cariólisis y se incrementó la cantidad de células inflamatorias, principalmente linfocitos, neutrófilos y células plasmáticas en el tumor comparadas con el control.

Con nuestros resultados y con otros a nivel mundial que demuestran su efecto como una terapia adyuvante para el tratamiento del cáncer, nosotros sugerimos que más investigaciones sobre esta sustancia deben de realizarse antes de ser introducida como un tratamiento seguro y efectivo en el tratamiento de pacientes con cáncer a pesar de que encontramos datos importantes que posee este fármaco en disminuir la viabilidad celular de varias líneas celulares de cáncer, induciendo muerte celular por apoptosis, afectando

diferentes vías metabólicas (LDH, PKA-AMPC, HIF, GAPDH), capacidad de invasión celular, angiogénesis así como lograr un 20% de sobrevivencia, la disminución del peso-volumen tumoral, sin afectar el peso corporal y evitar metástasis a otros órganos.

8. CONCLUSIONES

In vitro

- El DCA-Na disminuye significativamente la viabilidad de las líneas celulares de cáncer (TC-1, Hela, PC3, DU145, Huh-7, Iner-51, MDAMB-231, MCF-7 y B16F10) sin afectar la viabilidad celular de macrófagos peritoneales murinos en un período de 72 h.
- La línea celular B16F10 fue la más sensible al tratamiento con DCA-Na, disminuyendo en un 90% la viabilidad celular relativa en un período de 48 h.
- El DCA-Na en rangos de concentración de 75-750 mM/mL no induce senescencia en la línea celular B16F10.
- Cambios morfológicos fueron observados en la línea celular B16F10 al ser tratada con DCA-Na, induciendo muerte celular por apoptosis.
- El DCA-Na afecta la actividad glicolítica, disminuyendo la actividad de LDH, la actividad de PKA-AMPC, la expresión de GAPDH, β -actina y 18s en la línea celular B16F10.
- El DCA-Na afecta la capacidad angiogénica, disminuyendo la unión de HIF-1 α al DNA, la invasión y la formación de estructuras pro-angiogénicas en la línea celular B16F10.

In vivo

- La inoculación subcutánea con 500,000 células B16F10 en ratones C57BL/6 generó la aparición tumoral a los 11.5 ± 2.88 días post-inoculación.
- La concentración óptima en el tratamiento con DCA-Na en ratones C57BL/6 fue 500mg/kg, vía *i.p.* con una frecuencia de 2 veces/día.
- El DCA-Na logra un 20% de supervivencia y disminuye el volumen-peso tumoral (sin afectar el peso corporal) y evita la metástasis hacia la cavidad peritoneal, intestino e hígado en ratones C57BL/6 inoculados con las células B16F10.
- Los resultados patológicos indicaron una disminución de mitosis atípicas, presentando picnosis, cariorraxis y cariólisis tras el tratamiento con DCA-Na en el modelo murino.

LITERATURA CITADA

Andersen Melvin E, Meek M. Elizabeth, Boorman Gary A, Brusick David J, Cohen Samuel M, Dragan Yvonne P, Frederick Clay B, Goodman Jay I, Hard Gordon C, and Robinson Denise E. 2000. Lessons Learned in Applying the U.S. EPA Proposed Cancer Guidelines to Specific Compounds. *Toxicological Sciences* 53: 159–172.

Anderson KM, Jajeh J, Guinan P, Rubenstein M. 2009. In vitro effects of dichloroacetate and CO₂ on hypoxic HeLa cells. *Anticancer Research* 29:4579-88.

Archer Stephen L, Gomberg-Maitland Mardi, Maitland Michael L, Rich Stuart, Weir Kenneth. 2008. Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1-Kv1.5 O₂-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 294:570–578.

Audesirk, Byers. 2003. *Biología Unidad en la diversidad*. Prentice Hall: México, pp. 132-145.

Bersin RM, Stacpoole PW. 1997. Dichloroacetate as metabolic therapy for myocardial ischemia and failure. *American Heart Journal* 134:841-855.

Bhardwaj V, Rizvi N, Lai MB, Lai JC, Bhushan A. 2010. Glycolytic enzyme inhibitors affect pancreatic cancer survival by modulating its signaling and energetics. *Anticancer Research* 30:743-749.

Bonnet S, Archer S, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, Lee C.T, Lopaschuk G.D, Puttagunta L, Harry G, Hashimoto K, Porter C.J, Andrade M.A, Thebaud B., Michelakis E.D. 2007. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell* 11:37–51.

Boorman, G. A. 1999. Drinking water disinfection by-products: Review and approach to toxicity evaluation. *Environmental Health Perspectives* 107: 207–217.

Cairns RA, Bennewith KL, Graves EE, Giaccia AJ, Chang DT, Denko NC. 2009. Pharmacologically increased tumor hypoxia can be measured by ¹⁸F-Fluoroazomycin arabinoside positron emission tomography and enhances tumor response to hypoxic cytotoxin PR-104. *Clinical Cancer Research* 15:7170-7174.

Cairns RA, Papandreou I, Sutphin PD, Denko NC. 2007. Metabolic targeting of hypoxia and HIF1 in solid tumors can enhance cytotoxic chemotherapy. *Proceedings of National Academy of Sciences* 104: 9445–9450.

Campo-Trapero J, Cano-Sánchez J, López-Durán M, Palacios-Sánchez B, Sánchez-Gutierrez JJ, Bascones-Martínez A. 2008. Marcadores de senescencia celular en cáncer y precáncer oral. *Avances en Odontoestomatología* 24:69-80.

Cao W, Yacoub S, Shiverick KT, Namiki K, Sakai Y, Porvasnik S, Urbanek C, Rosser CJ. 2008 Dichloroacetate (DCA) sensitizes both wild-type and over expressing Bcl-2 prostate cancer cells in vitro to radiation. *Prostate* 68:1223-1231.

Caretta Antonio and Mucignat-Caretta Carla. 2011. Protein Kinase A in Cancer. *Cancers* 3: 913-926.

Chen Yijun, Cairns Rob, Papandreou Loanna, Koong Albert and. Denko Nicholas. 2009. Oxygen Consumption can regulate the growth of tumors, a new perspective on the Warburg effect. *Public Library of Science* 4:10-37.

Chen, W.J. and Weisel, C.P. 1998 Halogenated DBP concentrations in a distribution system. *Journal of American Water Works Association*. 90:151–163.

Chi V. Dang. 2010. Is the Warburg Effect a Lot of Hot Air? *Molecular and cellular biology* 30:1300–1302.

ClinicalTrials.gov. 2010. Estudio clínico fase II, abierto de doble brazo del DCA en pacientes con gliomas malignos y glioblastoma multiforma. Identifier: NCT00540176.

ClinicalTrials.gov. 2010. Estudio fase I, abierto, de un solo brazo, dosis escala, clínico y farmacológico del DCA en pacientes con tumores sólidos metastáticos y/o recurrentes. Identifier: NCT00566410.

Company Identification: Acros Organics BVBA Janssen Pharmaceuticaaan 3a. 2440 Geel, Belgium. Company Identification (USA): One Reagent Lane. Fairlawn, NJ 07410.

Cornett R, James MO, Henderson GN, Cheung J, Shroads AL, and Stacpoole PW. 1999. Inhibition of glutathione S-transferase zeta and tyrosine metabolism by dichloroacetate: a potential unifying mechanism for its altered biotransformation and toxicity. *Biochemical Biophysical Research Communications* 262:752–756.

Delgado Andre Nayara, Barbosa Sabbatini Décio, Munhoz Egberto, Estevão Dirceu, Cecchini Rubens, Ehara Watanabe Maria Angelica. 2004. Measurement of cytotoxic activity in experimental cancer. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 18:27–30.

Dhara Shanta and Lippard Stephen J. 2009. Mitaplatin, a potent fusion of cisplatin and the orphan drug dichloroacetate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 52: 22199–22204.

DJ George, W. G Kaelin. 2003. How do cancer cells grow and spread (metastasize)?. *The New England Journal of medicine* 349:419-421.

Dou Ai-xia, Wang Xin. 2010 Cyclic adenosine monophosphate signal pathway in targeted therapy of lymphoma. *Chinese Medical Journal* 123:95-99.

Duyndam, M. C., Hulscher, T. M., Fontijn, D., Pinedo, H. M., and Boven, E. 2001. Induction of vascular endothelial growth factor expression and hypoxia-inducible factor 1-alpha protein by the oxidative stressor arsenite. *The Journal of Biological Chemistry* 276:48066–48076.

Environmental Protection Agency (EPA) Washington, DC. 2003 In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). U.S. Toxicological Review of dichloroacetic acid 79:43-46.

Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. 2006. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 9:425-434.

Felitsyn Natalia, Stacpoole Peter W, Notterpek Lucia. 2007 Dichloroacetate causes reversible demyelization *in vitro*: potential mechanism for its neuropathic effect. *Journal of Neurochemistry* 100: 429–436.

Fiebiger W, Olszewski U, Ulsperger E, Geissler K, Hamilton G. 2011 In vitro cytotoxicity of novel platinum-based drugs and dichloroacetate against lung carcinoid cell lines. *Clinical Translational Oncology* 13:43-49.

Flavin Dana F. 2010 No-Hodgkin's Lymphoma Reversal with Dichloroacetate. Case Report. Dichloroacetate. *Journal of Oncology* 10:1155-1159.

Food and drug Administration (FDA). 2009. Estudio fase II de DCA en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas o cáncer de mama. Identifier: NCT01029925.

Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Zapata-Benavides P, Castillo-Tello P, Isaza-Brando CE, Zamora-Ávila D, Rivera-Morales LG, Miranda-Hernández DF, Sierra-Rivera CA, Vera-García ME, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. 2010. Antiangiogenic and antitumor effects of IMMUNEPOTENT CRP in murine melanoma. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 32:637-646.

Ganapathy-Kanniappan S, Geschwind JF, Kunjithapatham R, Buijs M, Vossen JA, Tchernyshyov I, Cole RN, Syed LH, Rao PP, Ota S, Vali M. 2009 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is pyruvylated during 3-bromopyruvate mediated cancer cell death. *Anticancer Research* 29:4909-4918.

Garber Ken. 2004. The Warburg Effect Returns in a New Theory of Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 96:1805-1806.

Gatenby RA, Gillies RJ. 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer* 4: 891– 899.

Geoffrey M. Cooper and Hausman Robert. 2006. *La Célula*. Marban: Washington, D.C pp. 558-560.

Gómez FR, Rodríguez PC, Metha RT, Wong LG, Mendoza GE, Tamez GR: 1997. Nitric oxide and TNF- α production by murine peritoneal macrophages

activated with a novel 20-KDa protein isolated from *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* parasporal bodies. *The Journal Immunology* 158: 3796-3799.

Hassoun Ezdihar A, 2010. The Induction of Tumor Necrosis Factor alpha, Superoxide Anion, Myeloperoxidase, and Superoxide Dismutase in the Peritoneal Lavage Cells of Mice after Prolonged Exposure to Dichloroacetate and Trichloroacetate. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 24:136-144.

Higgins LH, Withers HG, Garbens A, Love HD, Magnoni L, Hayward SW, Moyes CD. 2009 Hypoxia and the metabolic phenotype of prostate cancer cells. *Biochimica Biophysica Acta* 1787:1433-43.

Hiroshi Kondoh. 2008 Cellular life span and the Warburg effect. *Experimental Cell Research* 314:1923-1928.

Howlett RA, Heigenhauser GJ, Hultman E, Hollidge-Horvat MG, Spriet LL. 1999. Effects of dichloroacetate infusion on human skeletal muscle metabolism at the onset of exercise. *American Journal of Physiology* 277: 18–25.

World Health Organization (IARC). 2004. International Agency for Research on Cancer. Disponible en: <http://www.iarc.fr>

Iervolino Angela, Trisciuglio Daniela, Ribatti Domenico, Candiloro Antonio, Biroccio Annamaria, Zupi Gabriela, Del Bufalo Donatella. 2002. Bcl-2 overexpression in human melanoma cells increases angiogenesis through VEGF mRNA stabilization and HIF-1-mediated transcriptional activity. *Journal of the Federation of American Societies* 10:96-100.

Jia Minghong, Coats Bonnie, Chadha Monisha, Frentzen Barbara, Rodriguez Javier Perez, Chadik Paul A, Yost Richard A, Henderson George N and Stacpoole Peter W. 2006. Human Kinetics of Orally and Intravenously Administered Low-Dose Dichloroacetate. *The Journal of Clinical Pharmacology* 46:1449-1459.

Kaufmann P, Engelstad K, Wei Y, Jhung S, Sano MC, Shungu DC, Millar WS, Hong Shroads. 2008. Age Dependent Kinetics and Metabolism of Dichloroacetate: Possible Relevance to Toxicity. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 324:1160-1163.

Kaufmann P, Engelstad K, Wei Y, Jhung S, Stacpoole P.W. 2006. Dichloroacetate causes toxic. Neuropathy in MELAS. A randomized, controlled clinical trial. *Neurology* 66:324–330.

Kissling Grace E, Malarkey David E, Vallant Molly K, Johnson Jerry D, Hejtmancik Milton R, Herbert Ronald A. and Boorman Gary A. 2009. Evaluation of Dichloroacetic Acid for Carcinogenicity in Genetically Modified Tg.AC Hemizygous and p53 Haploinsufficient Mice. *Toxicological Sciences* 107: 19-26.

Lea Anne, R. Coopera Charles, M. Gouw Arvin, Dinavahia Ramani, Maitrab, Anirban, M. Deckd Lorraine, Royere Robert E, L. Vander Jagte David, Semenzac Gregg and V. Danga Chi. 2009. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression 107:2037-2042.

Lee Seakwoo, Terry Doris, Hurst Douglas R., Welch Danny R., Qing-Xiang and Amy Sang. 2011. Protein Signatures in Human MDA-MB-231 Breast Cancer Cells Indicating a More Invasive Phenotype Following Knockdown of Human Endometase/Matrilysin-2 by siRNA. *Journal of Cancer* 2:165-176.

Li Tianwei, Santockyte Rasa, Shen Rong-Fong, Tekle Ephrem, Wang Guanghui, Yang David C, and Chock P. Boon. 2006. Expression of SUMO-2/3 Induced Senescence through p53- and pRB-mediated Pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 10:1074-1078.

Litwiniec Anna, Grzanka Alina, Helmin-Basa Anna, Gackowska Lidia and Grzanka Dariusz. 2010. Features of senescence and cell death induced by doxorubicin in A549 cells: organization and level of selected cytoskeletal proteins. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 136:717-736.

Louis Jeune M.A, Kumi-Diaka J, Brown J. 2005. Anticancer Activities of Pomegranate Extracts and Genistein in Human Breast Cancer Cells. *Journal of Medicinal Food* 8:469–475.

Lukas. 1980. Biological disposition of sodium dichloroacetate in animals and humans after intravenous administration. *Journal of Pharmaceutical Science* 69:419–421.

Madhok BM, Yeluri S, Perry SL, Hughes TA and Jayne DG. 2010. Dichloroacetate induces apoptosis and cell cycle arrest in colorectal cancer cells. *British Journal of Cancer* 102:1746-1752.

Mercken Evi M. 2011. Dichloroacetate modulates the oxidative stress and inflammatory response to exercise in COPD. *Chest* 136: 744-751.

Michelakis Evangelos, Archer Stephen. 2009. Method of treating cancer using dichloroacetate. No. US 2009/0118370A1.

Michelakis, L Webster and JR Mackey. 2008 Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *British Journal of Cancer* 99: 989-994.

Ochoa Carrillo F. J. 2008. 2008. Día mundial del cáncer. *Gamo* 7:1-2.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2008. Incidencia mundial del cáncer. Datos y Estadísticas. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>

Osbaldo Resendis Antonio, Checa Alberto, Encarnación Sergio. 2010. Modeling core metabolism in cancer cells: surveying the topology underlying the warburg effect. *Public library of science* 5:1371-1383.

Parolin ML, Spriet LL, Hultman E, Matsos MP, Hollidge-Horvat MG, Jones NL, Heigenhauser GJ. 2000. Effects of PDH activation by dichloroacetate in human skeletal muscle during exercise in hypoxia. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 279: 752–761.

Plas, D.R., and Thompson, C.B. 2002. Cell metabolism in the regulation of programmed cell death. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 13:75–78.

Rapisarda Annamaria, Shoemaker Robert H. and Melillo Giovanni. 2009. Antiangiogenic agents and HIF-1 inhibitors meet at the crossroads. *Cell Cycle* 8:4004-4040.

Rardin MJ, Wiley SE, Naviaux RK, Murphy AN, Dixon JE. 2009. Monitoring phosphorylation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Analytical Biochemistry* 15:157-164.

Ria R, Reale A, Castrovilli A, Mangialardi G, Dammacco F, Ribatti D, Vacca A. 2010. Angiogenesis and Progression in Human Melanoma. Review Article 10:1150-1155.

Robbins & Cotran. 2006. Patología Estructural y Funcional SAUNDERS: España. pp 4-25.

Safran, M. and Kaelin. 2003. HIF hydroxylation and the mammalian oxygen sensing pathway. The Journal of Clinical Investigation 111:779-783.

Said Harun M, Polat Buelent, Hagemann Carsten, Anacker Jelena, Flentj Michael, Vordermark Dirk. 2009 Absence of GAPDH regulation in tumor-cells of different origin under hypoxic conditions *in vitro*. BioMed Research 2:1-9.

Sánchez-Arago M, Chamorro M, Cuezva JM. 2010 Selection of cancer cells with repressed mitochondria triggers colon cancer progression. Carcinogenesis 31:567-576.

Schmittgen D and Zakrajsek Brian A. 2000. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 46:69-81.

Semenza Gregg L. 2008. Hypoxia-Inducible Factor 1 and Cancer Pathogenesis. International Union of Biochemistry and Molecular Biology 60: 591–597.

Seth Pankaj, Grant Aaron, Tang Jian, Vinogradov Elena, Wang Xioaen, Lenkinski Robert and Sukhatme Vikas P. 2011. On target inhibition of tumor fermentative glycolysis as visualized by hyperpolarized pyruvate. Neoplasia 13:60-71.

Shahrzad Siranoush, Lacombe Kristen, Adamcic Una, Minhas Kanwal, Coomber Brenda L. 2010. Sodium dichloroacetate (DCA) reduces apoptosis in colorectal tumor hypoxia. Cancer Letters 297:75–83.

Shangraw Robert, Lohan Mannion Deidre, Hayes Agnes, Moriarty Rose and Robinson Stephen. 2008. Dichloroacetate Stabilizes the Intraoperative Acid-Base During Liver Transplantation. Liver Transplantation 14:989-998.

Shanta Dhara and Stephen J. Lipparda. 2009. Mitaplatin, a potent fusion of cisplatin and the orphan drug dichloroacetate. Proceedings of the National Academy of Sciences 52:22199–22204.

Shin YK, Yoo BC, Hong YS, Chang HJ, Jung KH, Jeong SY, Park JG. 2009. Upregulation of glycolytic enzymes in proteins secreted from human colon cancer cells with 5-fluorouracil resistance. *Electrophoresis* 30:2182-2192.

Shroads Albert L, Guo Xu, Dixit Vaishali, Ping Liu Hui-, James Margaret O and Stacpoole Peter W. 2008 Age-Dependent Kinetics and Metabolism of Dichloroacetate. Possible Relevance to Toxicity 324:1163–1171.

Stacpoole Peter W, Gilbert Lesa R, Neiberger Richard E, Carney Paul R, Valenstein Edward, Theriaque Douglas and Shuster Jonathan. 2008. Evaluation of Long-term Treatment of Children with Congenital Lactic Acidosis With Dichloroacetate. *Pediatrics* 121:1223-1228.

Stacpoole Peter W, Henderson George N, Yan Zimeng, James Maraaret O. 1998. Clinical Pharmacology and Toxicology of Dichloroacetate. *Environmental Health Perspectives* 106:989-994.

Stacpoole PW, Nagaraja NV, Hutson AD. 2003. Efficacy of dichloroacetate as a lactate-lowering drug. *The Journal of Clinical Pharmacology* 43: 683–691.

Stacpoole PW. 1969. Review of the pharmacologic and therapeutic effects of diisopropylammonium dichloroacetate (DIPA). *The Journal of Clinical Pharmacology and the Journal of New Drugs* 9:282– 291.

Stacpoole PW. 1989 The pharmacology of dichloroacetate. *Metabolism* 38:1124-1144.

Subramanian Kannan, Ramaian Anand S. 2010. Development of less toxic dichloroacetate analogue by docking and descriptor analysis. *Bioinformatics* 5:73-76.

Sun Ramon C, Fadia Mitali, Dahlstrom Jane E., Parish Christopher R., Board Philip G and Blackburn Anneke C. 2010. Reversal of the glycolytic phenotype by dichloroacetate inhibits metastatic breast cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Breast Cancer Research and Treatment* 120:253–260.

Sun Wenyue, Zhou Shaoyu, Chang Steven S, McFate Thomas, Verma Ajay and Califano Joseph. 2009. Mitochondrial mutations contribute to HIF1 α accumulation via increased reactive oxygen species and upregulated PDK2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research* 15:476-484.

Szewczyk Adam and Wojtczak. 2002. Trends in Mitochondrial Pharmacology and Genetics. *Pharmacological Reviews* 54:101-127

Tao Lianhui, Wang Wei, Li Long, Kramer Paula M and Pereira Michael A. 2004. Effect of Dibromoacetic Acid on DNA Methylation, Glycogen Accumulation, and Peroxisome Proliferation in Mouse and Rat Liver *Toxicological sciences* 82:62–69.

Tong Jingtao, Xie Ganfeng, Li Jianjun, Pan Feng, and Liang Houjie. 2010. Synergistic antitumor effect of dichloroacetate in combination with 5-Fluorouracil in colorectal cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 10:64-74.

Tsang et al. 2010. A tool for chemical screens. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:185-192.

Uden, P.C. and Miller. J.W. 1983. Chlorinated acids and chloral in drinking water. *American Water Works Association* 46:39-45.

Valenti Maria Teresa, Bertoldo Francesco, Carbonare Luca Dalle, Azzarello Giuseppe, Zenari1 Sonia, Zanatta1 Mirko, Balducci Elena, Vinante Orazio and Lo Cascio Vincenzo. 2006. The effect of bisphosphonates on gene expression: GAPDH as a housekeeping or a new target gene? *BioMed Central Cancer* 3:46-49.

Vander Heiden, MG. Cantley, LC, Thompson, CB. 2009. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation *Science* 324:1029-1033.

Wang, G.L, Jiang Rue. 1995. Hypoxia- inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:5510-5514.

White RJ .2008. RNA polymerases I and III, non-coding RNAs and cancer. *Trends in Genetics* 24:622-629.

Whitehouse Sue, Randle Philip J. 1973. Activation of pyruvate dehydrogenase in perfused rat heart by dichloroacetate. *Biochemical Journal* 134:651–653.

Williams AC. 1988. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase and tumor cell glycolysis. *Clinical Nutrition & Metabolic Care* 18: 3199-3204.

Wong Jason Y.Y, Huggins Gordon S, Debidda Marcella, Munshi Nikhil C, and Immaculata De Vivo. 2008. Dichloroacetate Induces Apoptosis in Endometrial Cancer Cells. *Gynecologic Oncology* 109:394–402.

Xie J, Wang BS, Yu DH, Lu Q, Ma J, Qi H, Fang C, Chen HZ. 2011. Dichloroacetate shifts the metabolism from glycolysis to glucose oxidation and exhibits synergistic growth inhibition with cisplatin in Hela cells. *International Journal of Oncology* 38:409-417.

Xu Rui-hua, Pelicano Helene, Zhou Yan, Carew Jennifer S., Feng Li, Bhalla Kapil N, Keating Michael J, Huang Peng. 2005. Inhibition of Glycolysis in Cancer Cells: A Novel Strategy to Overcome Drug Resistance Associated with Mitochondrial Respiratory Defect and Hypoxia. *Cancer Research* 65:613-21.

Yan Z, Henderson GN, James MO, Stacpoole PW. 1997. Determination of dichloroacetate and its metabolites in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 703:75-84.

Young-Woo Eom, Mi Ae Kim, Seok Soon Park, Mi Jin Goo, Hyuk Jae Kwon, Seonghyang Sohn, Wook-Hwan Kim, Gyesoon Yoon and Kyeong Sook Choi. 2005. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogene* 24:4765–4777.

Zhou Ming, Zhao Yuhua, Ding Yan, Liu Hao, Liu Zixing, Fodstad Oystein, Riker Adam I, Kamarajugadda Sushama, Lu Jianrong, Owen Laurie B, Ledoux Susan P, Tan Ming. 2010. Warburg effect in chemosensitivity: Targeting lactate dehydrogenase-A re-sensitizes Taxol-resistant cancer cells to Taxol. *Molecular Cancer* 9:10-33.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Crystel Aleyvick Sierra Rivera

Candidato para el Grado de

M.C. con Especialidad en Inmunobiología

Tesis: Efecto del dicloroacetato de sodio (DCA-Na) sobre líneas celulares de cáncer in vitro y sobre un modelo de melanoma murino

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 16 de agosto de 1987, hija de Alejandro Sierra Gutiérrez y Virginia Rivera Guzmán.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Q.B.P. en 2009 con la tesis titulada “Efecto de la plata coloidal en líneas celulares de cáncer y evaluación de la toxicidad inducida relacionada a su consumo prolongado in vivo”

Artículos publicados: 2010. Antitumor activity of colloidal silver on MCF-7 human breast cancer cells. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 29:148.