



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

EFFECTOS DE LA COMBINACION DE DICLOROACETATO Y 2-METOXIESTRADIOL EN CELULAS A-549 Y MRC5 EN CONDICIONES DE NORMOXIA E HIPOXIA.

Informe del Servicio Social

Prestador del Servicio Social

Jesús Eduardo Sánchez Calleja
Matrícula: 2103622286

Lugar y Periodo de Realización del Servicio Social

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas
Laboratorio de Oncología Biomédica
1-Junio-2015 al 8-Febrero-2016

Asesor Externo

Dr. Arnoldo Aquino Gálvez.
Investigador en Ciencias Médicas "C"

Asesor Interno

Q.F.B Mario González Torres
No. Económico. 19547

ÍNDICE

Antecedentes	3
Justificación	16
Hipótesis	17
Objetivos	18
Metodología	19
Línea celular A-549 y MRC5	19
Cultivo celular	19
Tripsinación	19
Conteo de células en cámara de Neubauer	20
Preparación de soluciones de Dicloroacetato	21
Preparación de solución de 2-Metoxiestradiol	22
Curva dosis-efecto con Dicloroacetato	23
Curva dosis-efecto con Dicloracetato y 2-Metoxiestradiol	25
Tinción con cristal violeta	26
Ensayo de apoptosis	28
Actividades realizadas	29
Resultados	30
Discusión	46
Referencias	50
Anexos	57

ANTECEDENTES

Cáncer

El cáncer de células no pequeñas de pulmón (NSCLC) se divide en varios tipos, incluyendo adenocarcinoma, carcinoma (Molina et al, 2009). La enfermedad es más propensa a ser diagnosticada en una etapa tardía, en un punto en que sólo el tratamiento paliativo es el disponible (Siegel et al, 2013).

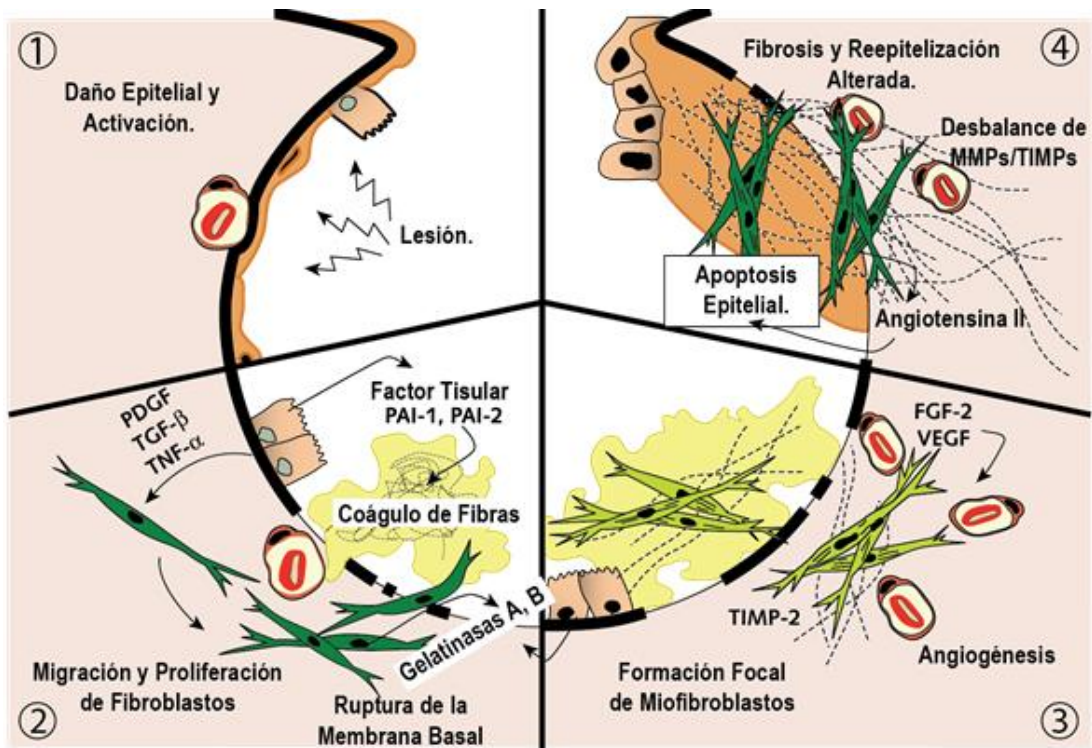
El cáncer pulmonar es el tipo de cáncer más comúnmente diagnosticado a nivel mundial y su incidencia continúa creciendo. En 2012, un estimado de 1.8 millones de casos nuevos de cáncer pulmonar fueron diagnosticados a nivel mundial, aproximadamente 13% del total de cánceres. Entre todos los cánceres, el cáncer pulmonar tiene ahora la más alta tasa de mortalidad en la mayoría de los países, mayormente en países industrializados y Europa (WHO GLOBOCAN, 2012).

Fibrosis

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) se define como la forma específica de neumonía intersticial crónica más común y severa, que se caracteriza por su naturaleza fibrosante y progresiva de origen idiopático (Tzouveleki et al, 2015). Su prevalencia es principalmente en los adultos mayores, la participación exclusivamente pulmonar y patrón de neumonía intersticial usual es diagnosticado por histopatología y / o radiología (Iwai K et al, 1994; Coultas et al, 1994). A nivel mundial se ha encontrado con una prevalencia estimada de 20 casos por cada 100,000 en hombres y 13 casos por cada 100,000 en mujeres (Kim et al, 2006).

Actualmente se estima que los rangos de muerte de la Fibrosis pulmonar idiopática son de 64.3 muertes por millón en hombres y 58.4 muertes por millón en mujeres en los Estados Unidos (Olson et al, 2007).

La aparente incapacidad de metástasis por parte de FPI no es suficiente prueba para excluir una conducta neoproliferativa de las células mesenquimatosas (Kotilgam et al, 2008). Se ha encontrado similitudes citogenéticas entre el cáncer y la FPI relacionadas con alteraciones genéticas y epigenéticas que desregulan el control proliferativo a nivel molecular (Kuwano et al, 1996). Ejemplos de esto es que algunos genes supresores tumorales (TSG), como lo es el gen de la tríada histidina frágil (FHIT), que se encuentra mutado en FPI, juega un papel importante en el cáncer de pulmón (Uematsu et al, 2001). Incluso se ha descrito más recientemente otras mutaciones que solo se habían encontrado en neoplasias, como lo es el acortamiento de telómeros y su expresión, en FPI (Cronkhite, et al 2008; Liu et al 2007). Miofibroblastos presentes en FPI pudieran tener un comportamiento parecido a células neoplásicas, esto resultado de, su alta producción de citocinas como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y su consecuente disminución en la producción de PGE₂ como factor antifibrótico (McAnulty et al, 1997).



Esquema 1.1 Modelo de cicatrización anormal de las heridas para la fibrosis pulmonar idiopática. (Selman, 2006)

Se ha encontrado que TGF- β protege a miofibroblastos de la apoptosis y se cree es debido, en parte, a la activación de fosfoinositol 3-quinasa (PI3K)/AKT (Thannickal et al, 2006). Vancheri y colaboradores demostró que en FPI, las células epiteliales en los alrededores del foco fibrótico sugieren que existe transición epitelio-mesénquima (EMT). La EMT se considera como una forma de metaplasia y en muchos tipos de cáncer, está involucrado en fases tempranas de carcinogénesis y metástasis (De WO et al, 2008). Existen moléculas que promueven la invasión tumoral y están relacionadas con un mal pronóstico para el paciente como lo es laminina, fascina y HSP27 (Moriya et al, 2001; Garrido et al, 2003; Pelosi et al, 2003). Chilosi y colaboradores encontraron que células

epiteliales que rodean focos fibróticos expresan grandes cantidades de laminina, fascina y HSP27 (Chilosi et al, 2006)

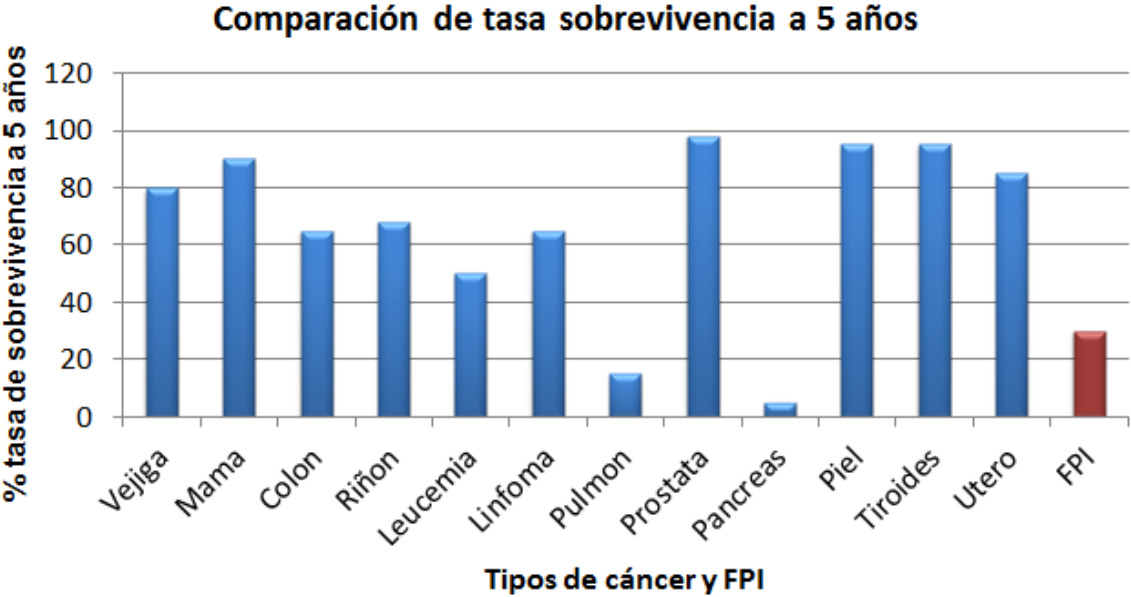
Las similitudes patogénicas entre FPI y cáncer son: Mutaciones de genes supresores de tumores, acortamiento de telómeros, hipermetilación de región promotora Thy-1, autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento, evasión de apoptosis, comunicaciones célula-célula alteradas, reclutamiento y diferenciación de miofibroblastos, habilidad infiltrativa de miofibroblastos, expresión de moléculas invasivas, activación de vía Wnt / β -catenina, activación de vía fosfoinositol 3-quinasa/ fosfatasa y homólogo de tensina-AKT (Vancheri et al, 2010). Por otro lado, existen algunas hipótesis que señalan las diferencias entre ambas enfermedades, por ejemplo la metástasis característica del cáncer que ayuda a la diseminación para invadir otros órganos, mientras que la FPI es auto limitada a los pulmones (Vancheri, 2013).

Fibrosis pulmonar idiopática y cáncer
Similitudes
Mutaciones de genes supresores tumorales
Acortamiento de telómeros
Hipermetilación de región promotora Thy-1
Señales de crecimiento autosuficientes
Evasión de apoptosis
Comunicaciones intercelulares alteradas
Diferenciación y reclutamiento de miofibroblastos
Habilidad infiltrativa de miofibroblastos
Expresión de moléculas invasivas

Tabla1.1 Similitudes entre fibrosis pulmonar idiopática y cáncer. (Modificado de Vancheri, 2010)

Se ha visto que la fibrosis pulmonar idiopática al hacer una comparación de tasa de supervivencia a cinco años frente algunos tipos de cáncer, llega a ser más mortífera que cánceres como de vejiga, mama, colon, leucemia entre otros (Vancheri et al, 2010).

Vancheri y colaboradores también realiza una comparación entre las tasas de mortalidad por cada 100,000 personas de Fibrosis pulmonar idiopática y tipos de cáncer, la FPI llega a tener una mayor tasa de mortalidad que canceres como tiroides, piel, riñón entre otros (Vancheri, 2013).



Gráfica 1.1 Comparación de tasa de supervivencia a 5 años para FPI y diferentes tipos de cáncer. Modificado de Vancheri et al 2010

Apoptosis

La apoptosis ha sido reconocida como un importante regulador del desarrollo tumoral y el crecimiento tumoral neto es dependiente del balance entre proliferación y apoptosis (A.H. et al 1992).

Apoptosis es un suicidio programado intracelular ejecutado por la activación de las caspasas, una familia de proteasas cisteinicas citoplasmáticas, existen dos vías mayores, la vía extrínseca e intrínseca apoptoticas, que inducen la cascada de señalización de caspasas (Olson et al, 2001). La vía intrínseca involucra el estrés celular que provoca procesos dependientes de la mitocondria, resultando en la liberación de citocromo c y activación de la caspasa 9 (Olson et al, 2001). La vía extrínseca involucra la activación de receptores de muerte (DRs) como Fas, receptor 1 de TNF, DR4 y DR5, la interacción con sus respectivos ligandos lleva hacia una cascada de señalización iniciada por el reclutamiento de moléculas asociadas a DR, así como FADD y la subsecuente activación de caspasa 8 (Schulze-Osthoff et al, 1998), esta caspasa luego cataliza una serie de eventos proteolíticos que resultan en los cambios bioquímicos y morfológicos característicos asociados con la apoptosis (Theresa M. L et al, 2003).

Hipoxia

El oxígeno es una molécula esencial para la sobrevivencia celular porque es utilizado como el aceptor final en la respiración mitocondrial para la producción de energía. Hipoxia se refiere a condiciones de oxígeno más bajas de lo normal, con

concentraciones de oxígeno alrededor de 21% en aire ambiental y de 2 al 9% en la mayoría de los tejidos sanos. Hipoxia se define como menos del 2% de oxígeno mientras que anoxia se define como menos de 0.02% de oxígeno (Bertout et al, 2008). La disponibilidad baja de oxígeno se ha asociado con inflamación, necrosis y/o neovascularización (Murdoch et al, 2005). Además células cancerosas altamente proliferativas pueden superar sus suministros sanguíneos y desencadenar hipoxia (Hanahan and Weinber, 2011). Se piensa que la hipoxia promueve la invasividad y metástasis (Harris, 2002).

Para adaptarse a la privación de oxígeno, se alteran vías metabólicas en diversas formas y está bien establecido que HIF-1 α induce dos alteraciones importantes en el metabolismo celular: inducción de la glucólisis e inhibición de la respiración mitocondrial lo que se conoce como el efecto de Warburg, a pesar de esto es claro que la respiración mitocondrial persiste en muchos tipos de cáncer (Bobarykina et al. 2006; Michenko et al. 2005; Obach et al. 2004). En algunos ensayos se ha observado que uno de los genes que se encuentran sobre expresado en la FPI es el factor de transcripción HIF-1 α . De acuerdo con lo anterior, los HIFs pudieran estar implicados en la patogénesis de la FPI (Tzouvelekis et al 2007; Kick et al 2005).

Una hipótesis propuesta es que el incremento en el flujo glucolítico puede ser consecuencia de un descenso en la función mitocondrial y que el descenso de la fosforilación oxidativa puede conferir una ventaja selectiva en células tumorales, de hecho el aumento de glucólisis puede llevar a un descenso en el daño inducido por especies reactivas de oxígeno (ROS) e incrementar las vías anabólicas que

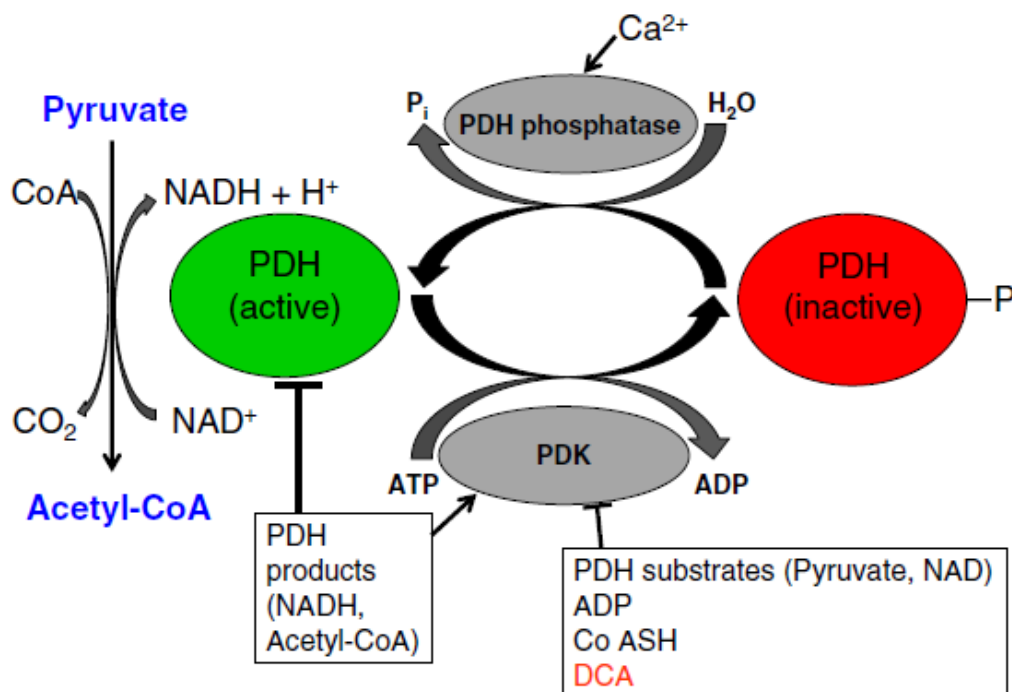
mantienen la proliferación. Estas observaciones fuertemente sugieren que el descenso de la respiración mitocondrial puede ser una ventaja para el crecimiento tumoral (Gottlieb and Tomlinson, 2005).

HIF-1 α afecta la respiración mitocondrial por varios mecanismos: al prevenir la entrada de Acetil-CoA al ciclo de Krebs y participan en la inhibición de la respiración mitocondrial al activar la PDK-1 (Kim et al, 2006). PDK-1 se encarga de fosforilarla PDH e inactivarla, al inactivarse es incapaz de llevar a cabo la conversión de piruvato a Acetil-CoA, provocando que el piruvato se acumule y convierta en lactato (Semenza, 2010).

Dicloroacetato

El Dicloroacetato (DCA) es una molécula pequeña que se ha utilizado durante muchos años para el tratamiento de enfermedades como la acidosis láctica y defectos en el metabolismo mitocondrial la acidosis láctica es común en las células cancerígenas que inactivan el complejo piruvato deshidrogenasa (PDC), estas células generalmente utilizan la glucólisis en lugar de la respiración mitocondrial para generar energía, posiblemente como resultado de la hipoxia que existe en los tumores (Stacpoole et al, 2003). Algunas células cancerosas obtienen más del 50 % de su energía a través de la glucólisis, mientras que la glucólisis en las células normales representan menos del 5% de las necesidades de energía requerida (Warburg, 1956). La piruvato deshidrogenasa (PDH) es la primera enzima catalítica del complejo PDC que se encuentra en la matriz mitocondrial de las células eucariotas, el PDC ofrece el primer vínculo entre la

glucolisis y el ciclo de Krebs al catalizar la conversión del piruvato en acetil-CoA por la descarboxilación del piruvato, llevado a cabo esto la acetil-CoA puede entrar en el ciclo de Krebs para liberar nicotinamida adenina dinucleotido (NADH) que impulsa el proceso del transporte de electrones en la membrana para generar ATP, la PDH es inactivada al ser fosforilada por la enzima piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK) lo cual disminuirá la oxidación del piruvato en la mitocondria y aumentara la conversión de piruvato a ácido láctico en el citosol (Bowker-Kinley, 1998). El DCA reduce la fosforilación del PDC por la enzima PDK, esto provoca un aumento en la actividad del PDC por lo cual se forma mayor cantidad de acetil- CoA y esto redirige el metabolismo hacia el ciclo de Krebs alejándolo de la glucolisis (Stacpoole, 1989).



Esquema1.2 Regulación del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) (Friedrich, 2012)

Existen diversas investigaciones que involucran al Dicloracetato y a diversas líneas celulares cancerosas, en algunos ensayos se muestran tanto resultados favorables como negativos por la administración de este fármaco. Wong y colaboradores realizó estudios con DCA en células de cáncer endometrial obteniendo resultados favorables al observar disminución en la viabilidad celular y un aumento en la apoptosis tardía de la mayoría de las líneas celulares utilizadas (Wong et al, 2008). Por otro lado Shahrzad y colaboradores, obtuvo resultados negativos al determinar que el DCA aparentemente tiene un efecto protector reduciendo la apoptosis en condiciones de hipoxia en algunas líneas celulares de cáncer colorectal (Shahrzad et al, 2010). Bonnet realizó una comparación de varias líneas celulares de cáncer con líneas celulares normales y encontró que las células de cáncer tenían más mitocondrias hiperpolarizadas y los canales Kv eran relativamente deficientes, además determinaron que si esta remodelación eléctrico-metabólica era una respuesta adaptativa, su inversión podría aumentar la apoptosis e inhibir el crecimiento del cáncer, por lo que utilizaron DCA y encontraron que se restauró la función mitocondrial, restaurando así la apoptosis, lo que permite a las células cancerosas autodestruirse y reducir el tumor (Bonnet, 2007).

Después de la administración de DCA se ha demostrado en algunos ensayos que se restaura la función mitocondrial y se promueve selectivamente la apoptosis de células tumorales, sin embargo todavía hay resultados contradictorios y dudas respecto el uso de DCA solo o en combinación con otros fármacos (Zheng et al, 2013). Varios estudios han sugerido la posibilidad de utilizar DCA como un agente

terapéutico para el tratamiento de tumores malignos, su aplicación clínica ha sido limitada debido a la falta de pruebas concluyentes (Cao et al, 2008).

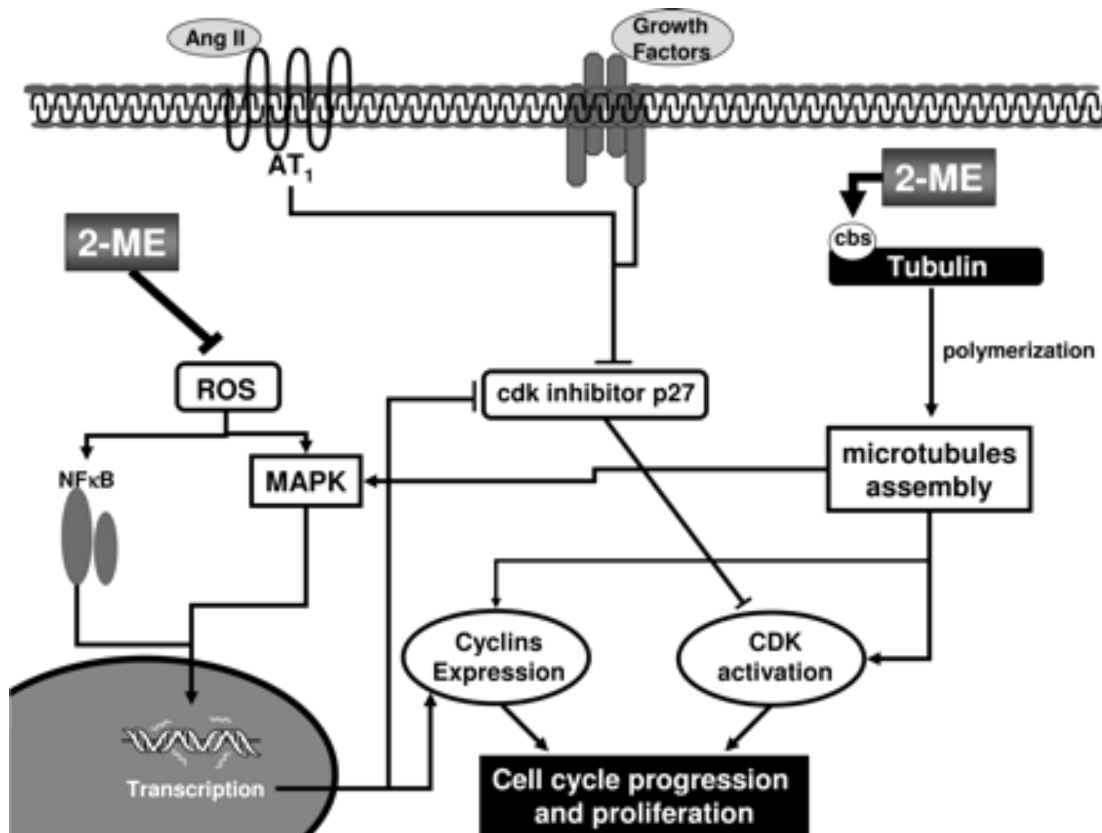
2-Metoxiestradiol

El 2-Metoxiestradiol (2ME) es un metabolito natural de los estrógenos endógenos 17 β -estradiol y 2-hidroxiestradiol (Seegers, et al 1989).

El 2ME es un agente que se ha reportado tiene un efecto antiproliferativo y proapoptótico en varias líneas celulares in vitro (Mabjeesh et al, 2003; Ricker et al, 2004). A pesar de ser un metabolito natural del estradiol (E2), 2-ME se liga pobremente a los receptores estrogénicos (ERs), y por lo tanto, sus efectos antiproliferativos no son mediados por receptores estrogénicos (Er) (Sutherland et al, 2005).

El mecanismo anti-tumoral de 2ME es multifacético, el cual incluye la inducción del arresto de las etapas G1 o G2/M del ciclo celular y apoptosis de células tumorales (Qadan et al, 2001); incremento en la expresión de FAS, p53 y p21WAF1 (Qanungo et al, 2002); formación de radicales libres de oxígeno (ROS) (Lin et al 2000); liberación de citocromo c mitocondrial. Se ha observado la inhibición de la polimerización de tubulina mediante la interacción con el sitio de unión de colchicina (Hamel et al, 1996). También se ha observado la inhibición de la actividad de la super oxido dismutasa (Huang et al, 2000). Se ha visto que células endoteliales tratadas con 2ME muestran signos de apoptosis asociadas a la activación de la cinasa de c-jun N-terminal (JNK) y cinasa de proteína activada por estrés (SAPK) (Attalla et al, 1998). También se ha demostrado que causa

inhibición del crecimiento celular y apoptosis en líneas celulares de tumores pulmonares y pancreáticos (Shizhong et al, 2002).



Esquema 1.3 Mecanismo de acción del 2-Metoxiestradiol (Dantas et al, 2006)

Se ha reportado que 2ME inhibe la acumulación del HIF-1 α mediante la disrupción microtubular, aunque el mecanismo exacto no está claro, este efecto se ha reportado que es independiente de la estabilidad de HIF-1 α , si no que actúa en la inhibición de síntesis de novo del HIF-1 α , por lo tanto, HIF es un factor transcripcional responsable de mediar la adaptación celular y tejidos a bajas concentraciones de oxígeno al incrementar la expresión de genes involucrados con la angiogénesis y glucólisis (Mabjeesh et al, 2003).

El complejo HIF es un heterodímero compuesto por una subunidad α regulada por oxígeno (HIF-1 α o HIF-2 α) y una subunidad β constitutivamente expresada (HIF-1 β). La regulación oxígeno dependiente de HIF-1 α y HIF-2 α ocurre a nivel de su estabilidad proteica, estas se encuentran normalmente hidroxiladas en dos residuos de prolina por proli 4-hidroxilasas dependientes de oxígeno y oxoglutarato (Epstein et al, 2001; Bruick et al, 2009). Proli-hidroxilacion selecciona estas proteínas para la ubiquitinización por la ligasa de ubiquitina E3 asociada a pVHL, resultando en la degradación mediada por proteosoma (Mabjeesh et al, 2003).

A bajas concentraciones de oxígeno, la actividad de proli-hidroxilasa es inhibida, HIF-1 α es estabilizada y dimeriza con HIF-1 β dentro del núcleo para unirse al elemento de respuesta a hipoxia (HRE) (Semenza, 2003). Al interactuar con el co-activador CBP/p300, HIF-1 activa la transcripción de genes blanco que entran en cuatro categorías: Transportadores de glucosa y glucolisis, angiogénesis, proliferación y sobrevivencia, así como invasión y metástasis (Semenza, 2003).

Debido al rol de HIF-1 α en la proliferación celular y apoptosis, es posible que los efectos proapopticos y antiproliferativos de 2ME sean mediados vía inhibición HIF-1 α , frecuentemente se induce un microambiente hipóxico en el centro de tumores sólidos, y canceres con fenotipos inducidos por hipoxia suelen ser resistentes a quimioterapia, radioterapia y suelen tener peor pronóstico (Hockel et al, 2001).

JUSTIFICACIÓN

- En enfermedades como el cáncer y la fibrosis pulmonar idiopática hasta la fecha no existe una cura definitiva y hay muy pocos tratamientos, los cuales solo son efectivos en un número reducido de casos. La Fibrosis pulmonar idiopática, al igual que en muchos casos del cáncer, cuenta con tratamientos paliativos.

HIPÓTESIS

- La combinación de Dicloracetato con 2-Metoxiestradiol estimula la respiración mitocondrial, disminuye el crecimiento celular e incrementa la respuesta apoptótica de células de adenocarcinoma pulmonar A-549 y de fibroblastos MRC-5 en condiciones de normoxia e hipoxia.

OBJETIVOS

General

- Determinar el efecto apoptótico y antiproliferativo del Dicloroacetato en combinación con 2-Metoxiestradiol en las líneas celulares A-549 y MRC5 en condiciones de hipoxia y normoxia.

Específicos

- Cultivar líneas celulares A-549 y MRC-5 en medio DMEM y F-12 respectivamente.
- Determinar la concentración óptima de DCA mediante una curva de dosis-respuesta.
- Administrar DCA y 2ME a líneas celulares A-549 y MRC-5 en condiciones de normoxia e hipoxia a la concentración seleccionada.
- Analizar el crecimiento celular de líneas celulares A-549 y MRC-5 en normoxia e hipoxia mediante la técnica de tinción de cristal violeta.
- Analizar mediante citometría de flujo los niveles de apoptosis obtenidos con la combinación de Dicloroacetato y 2-Metoxiestradiol en las líneas celulares A-549 y MRC5 en condiciones de normoxia e hipoxia.

METODOLOGÍA

Líneas Celulares

Células no pequeñas de cáncer de pulmón A549 y Fibroblastos pulmonares humanos MRC-5.

Cultivos celulares

Las células se mantendrán en condiciones de cultivo estándar a 37°C y a con una concentración de CO₂ del 5% en cajas de cultivo T-75. Para las células de cáncer de pulmón A549 se utilizó medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, penicilina y estreptomina. Para los fibroblastos pulmonares MRC5 se utilizó medio de cultivo F-12 suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, penicilina y estreptomina.

Tripsinización

1. Observar al microscopio las células contenidas en las cajas de cultivo T-75 revisando que la caja tenga una confluencia del 90%.
2. Retirar el medio de cultivo de la caja con ayuda de una pipeta de 1 ml y hacer dos lavados con 5 ml de medio de cultivo sin suero fetal bovino.
3. Agregar 3 ml de tripsina e incubar la caja en la estufa durante 1 minuto, dar pequeños golpes a la caja para ayudar a despegar las células.
4. Verificar con el microscopio que la mayor cantidad de células se han despegado de la caja.

5. Inactivar la tripsina agregando 6 ml de medio suplementado con 10% de suero fetal bovino.
6. Pasar el medio de cultivo con las células a un tubo cónico de 15 ml y centrifugar a 2500rpm durante 10 minutos.
7. Desechar el sobrenadante, agregar 15 ml de medio suplementado con 10% de suero fetal bovino y con ayuda del vortex resuspender el pellet.

Conteo de células con cámara de Neubauer

1. Tomar 9 µl de las células resuspendidas en el medio y colocarlo en un tubo eppendorf.
2. Agregar 1 µl de Azul de Tripano y mezclar con ayuda de la pipeta.
3. Tomar los 10 µl y colocarlos en la cámara de Neubauer.
4. Colocar el cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer evitando hacer burbujas.
5. Contar con ayuda del microscopio las células que están dentro de cada uno de los cinco cuadrantes.
6. Con ayuda de la formula, obtener el número de células que se tiene por mililitro.

$$N^{\circ} \text{ de } \frac{\text{Células}}{\text{mL}} = \frac{\text{Total de células contadas}}{5} \times 10000$$

Preparación de soluciones de Dicloracetato

1. Se prepararon 5 ml de solución stock de Dicloroacetato 2 M.

$$n = (V)(M) = (0.005L)(2M) = 0.01mol$$

$$DCA \text{ requerido (g)} = (n)(pm) = (0.01mol) \left(\frac{150.92g}{mol} \right) = 1.509g$$

2. Con ayuda de una balanza analítica y una espátula se pesaron 1.509 g de Dicloracetato.

3. Se agregan en 5 ml de medio y se deja en agitación hasta su completa disolución.

4. A partir de la solución stock 2 M de Dicloracetato, se prepararon soluciones con DCA a diferentes concentraciones (5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM y 40 mM).

5. Para la solución 5 mM se toman 17.5 μ l de la solución stock 2 M y se afora a 7 ml.

$$V_1 = \frac{(C_2)(V_2)}{C_1} = \frac{(0.005 \text{ M})(7 \text{ ml})}{2 \text{ M}} = 17.5 \mu\text{l}$$

6. Para la solución 10mM se toman 35 μ l de la solución stock 2M y se afora a 7 ml.

$$V_1 = \frac{(C_2)(V_2)}{C_1} = \frac{(0.01 \text{ M})(7 \text{ ml})}{2 \text{ M}} = 35\mu\text{l}$$

7. Para la solución 20mM se toman 70 μ l de la solución stock 2M y se afora a 7ml.

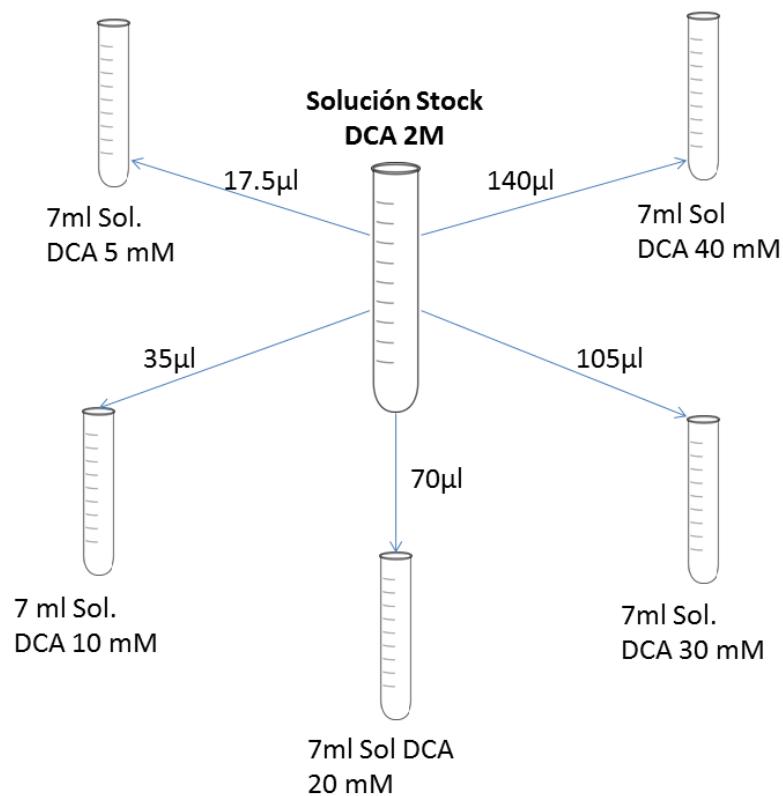
$$V_1 = \frac{(C_2)(V_2)}{C_1} = \frac{(0.02 \text{ M})(7 \text{ ml})}{2 \text{ M}} = 70\mu\text{l}$$

8. Para la solución 30 mM se toman 105 μ l de la solución stock 2 M y se afora a 7 ml.

$$V_1 = \frac{(C_2)(V_2)}{C_1} = \frac{(0.03M)(7ml)}{2M} = 105\mu l$$

9. Para la solución 40 mM se toman 140 μ l de la solución stock 2 M y se afora a 7 ml.

$$V_1 = \frac{(C_2)(V_2)}{C_1} = \frac{(0.04M)(7ml)}{2M} = 140\mu l$$



Esquema 1.4 Preparación de soluciones de Dicloroacetato

Preparación de solución 10 μ M de 2-Metoxiestradiol

1. De una solución stock 33 mM de 2ME tomar 75 μ l y aforar a 100 μ l (24.75 mM) con medio de cultivo (stock 2).
2. Preparar 200 μ l DMSO al 75%: 150 μ l de DMSO + 50 μ l de medio de cultivo.
3. Tomar 6.06 μ l del stock 2 y llevar a 150 μ l con DMSO al 75%.
4. Tomar los 150 μ l y llevarlos a 15ml (10 μ M) con medio de cultivo.
5. Se obtienen 15 ml de una solución 10 μ M de 2-ME.

Curva dosis-efecto de Dicloracetato

1. Sembrar las células A549 y MRC5 en placas de 48 pozos (20,000/pozo para la caja de normoxia y 40,000/pozo para la caja de hipoxia).
2. Se dejan incubar durante 24 horas en la estufa a 37°C con 5% de CO₂.
3. Posteriormente se retira el medio y se agregan 500 μ l nuevo medio el cual contiene el DCA a diferentes concentraciones (5mM, 10mM, 20mM, 30mM, 40mM).

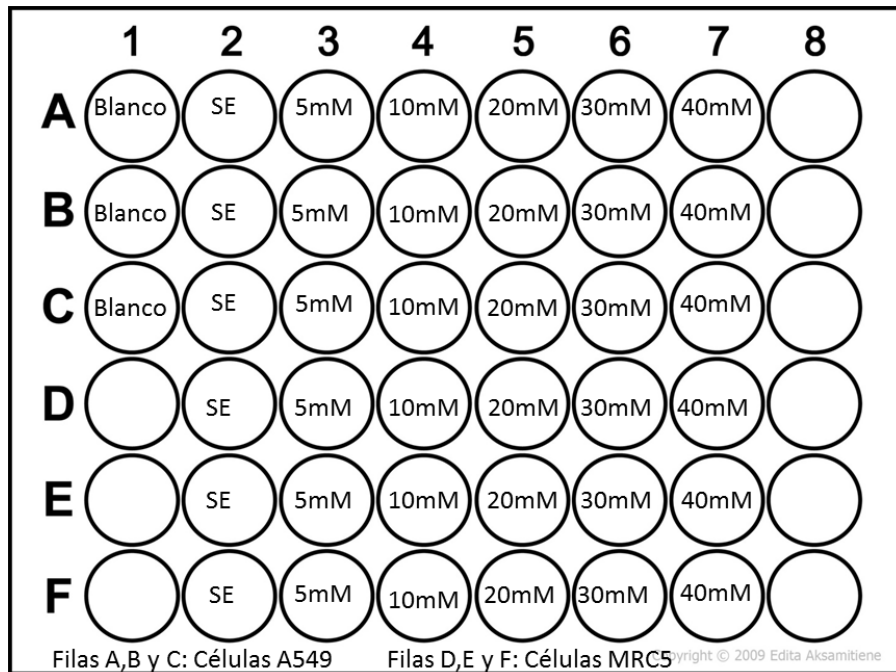


Fig2. Caja de 48 pozos con el acomodo de las células en columnas y los medios con concentraciones diferentes de DCA en las filas, por triplicado para cada línea celular.

5 La caja de normoxia se mete a la estufa en condiciones de 37°C y 5%CO₂.

4. Se deja incubar durante 72 horas.

6. La caja de hipoxia se mete en la cámara de hipoxia (previamente lavada y esterilizada con luz UV) junto a un vaso de precipitado con 100 ml de agua estéril, cerrar la cámara con el seguro.

7. Calibrar el sensor de oxígeno (prenderlo 15 minutos antes de utilizar).

8. Calibrar al 100% conectando la manguera al tanque de oxígeno.

8. Posteriormente una manguera se conectara al medidor de flujo de oxígeno y a la entrada de la cámara con el filtro.
9. La segunda manguera se conectara al tanque de N₂ y al flujometro.
10. Abrir el tanque que contiene el N₂ a un flujo de 15 L/min esperar a que el oxígeno que contiene la cámara sea desplazado por el N₂. Hasta que el medidor de oxígeno marque 1%.
11. Cerrar las pinzas de la cámara de hipoxia y desconectar las mangueras.
12. Llevar la cámara a incubación en la estufa a 37°C durante 72 horas.

Curva dosis-efecto con 2ME y DCA

1. Sembrar las células A549 y MRC5 en placas de 48 pozos (20,000/pozo para la caja de normoxia y 40,000/pozo para la caja de hipoxia).
2. Se dejan incubar durante 24 horas en la estufa a 37°C con 5% de CO₂.
3. Posteriormente se retira el medio y se agregan 500 µl nuevo medio el cual contiene 2ME a una concentración de 10 µM y DCA a diferentes concentraciones (5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM).
- 5 La caja de normoxia se mete a la estufa en condiciones de 37°C y 5% CO₂.
4. Se deja incubar durante 72 horas.
6. La caja de hipoxia se mete en la cámara de hipoxia (previamente lavada y esterilizada con luz UV) junto a un vaso de precipitado con 100 ml de agua estéril, cerrar la cámara con el seguro.

7. Calibrar el medidor de oxígeno (prenderlo 15 minutos antes de utilizar).
8. Calibrar al 100% conectando la manguera al tanque de oxígeno.
9. Posteriormente una manguera ira conecta al medidor de flujo de oxígeno y a la entrada de la cámara con el filtro.
10. La segunda manguera ira conectada al tanque de N₂ y al flujometro.
11. Abrir el tanque que contiene el N₂ a un flujo de 15L/min esperar a que el oxígeno que contiene la cámara sea desplazado por el N₂. Hasta que el medidor de oxígeno marque 1%.
12. Cerrar las pinzas de la cámara de hipoxia y desconectar las mangueras.
13. Llevar la cámara a incubación en la estufa a 37°C durante 72 horas.

Tinción con cristal violeta

1. Pasadas las 72 horas se retira el medio de las cajas de 48 pozos.
2. Se les realiza un lavado con 500 µl de PBS (-) en cada pozo de la caja, se desecha el PBS (-) aspirándolo con una pipeta.
3. Posteriormente se añade 500 µl de glutaraldehido al 1% a cada pozo de la caja.
4. Incubar las cajas durante 15 minutos en agitación constante.
5. Retirar el glutaraldehido.
6. Agregar 500 µl de cristal violeta a cada pozo.

7. Incubar durante 15 minutos en agitación constante.
8. Retirar el cristal violeta y lavar la placa con agua, hasta retirar el exceso de color.
9. Secar la placa.
10. Redissolver las células con 200 μ l de ácido acético al 10% para cada pozo.
11. Incubar durante 10 minutos en agitación constante.
12. Retirar el ácido acético con células de la caja de 48 pozos y pasarlo a una caja de 96 pozos.

Nota: En una placa de 96 pozos caben dos placas de 48 pozos, acomodarlas de acuerdo a su condición o línea celular.

13: Realizar el blanco llevando a cabo todo el proceso por el cual pasaron las células, pero con una muestra sin células.

14. Leer en el lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 590nm, con ayuda del software gen 5.

Ensayo de citometría para detectar apoptosis

1. Sembrar las células A549 y MRC5 en placas de 12 pozos aproximadamente a 50% de confluencia (40,000/pozo para MRC5 y 80,000/pozo para MRC5).
2. Al concluir el experimento (pasadas las 72 horas) recuperar el medio de cada pozo en tubos para citometría de 5 ml utilizando pipeta.
3. Lavar las células agregando 2 ml de PBS a cada pozo. Desechar el PBS.
4. Agregar 300 μ l de tripsina a cada pozo. Incubar 1 minuto en la estufa y monitorear células.
5. Agregar 1 ml de medio (F12 10% SFBi y DMEM 10% SFBi) para inactivar la tripsina. Resuspender suavemente las células con una pipeta.
6. Colocar las células en el tubo en el cual se recuperó el sobrenadante.
7. Centrifugar a 1500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente, eliminar el sobrenadante decantando cuidadosamente.
8. Agregar 4 ml de PBS para lavar las células y resuspender el pellet con golpes suaves.
9. Centrifugar a 1500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente.
10. Eliminar el sobrenadante decantando cuidadosamente.
11. Agregar 100 μ l de buffer de anexina 1X del kit y resuspender con golpes suaves.
12. Agregar a cada tubo 2 μ l de anexina y/o 2 μ l de Aqua Dye. Considerar siempre los siguientes controles para compensación y control positivo:

Tratamiento	Tinción
Control sin tratamiento	Sin teñir
Positivo (sts)	Anexina
Positivo (sts)	7AAD
Control Positivo (sts)	Anexina / 7AAD

NOTA: Los tiempos de tratamiento con staurosporina (sts) y la concentración es de 1 μ M durante una hora aproximadamente.

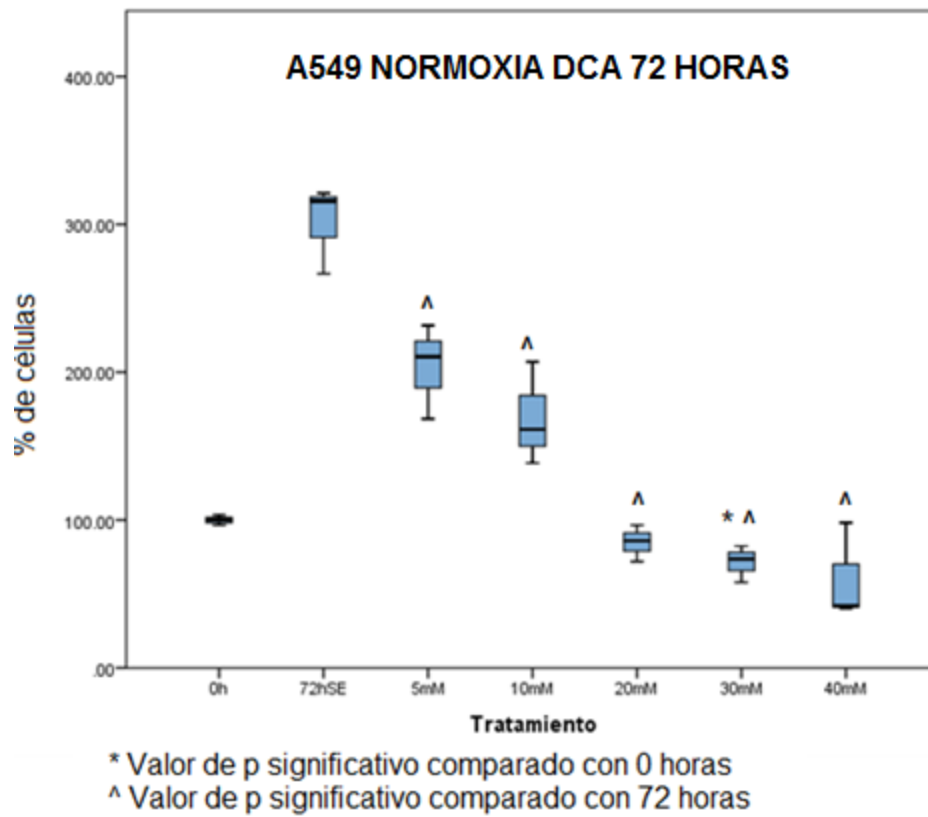
13. Incubar 15 min a temperatura ambiente protegiendo de la luz.

14. Leer en citómetro.

ACTIVIDADES REALIZADAS

- ✓ **Cultivo celular**
- ✓ **Preparación de soluciones**
- ✓ **Curvas dosis- efecto**
- ✓ **Tinción con cristal violeta**
- ✓ **Ensayo de citometría para detectar apoptosis**

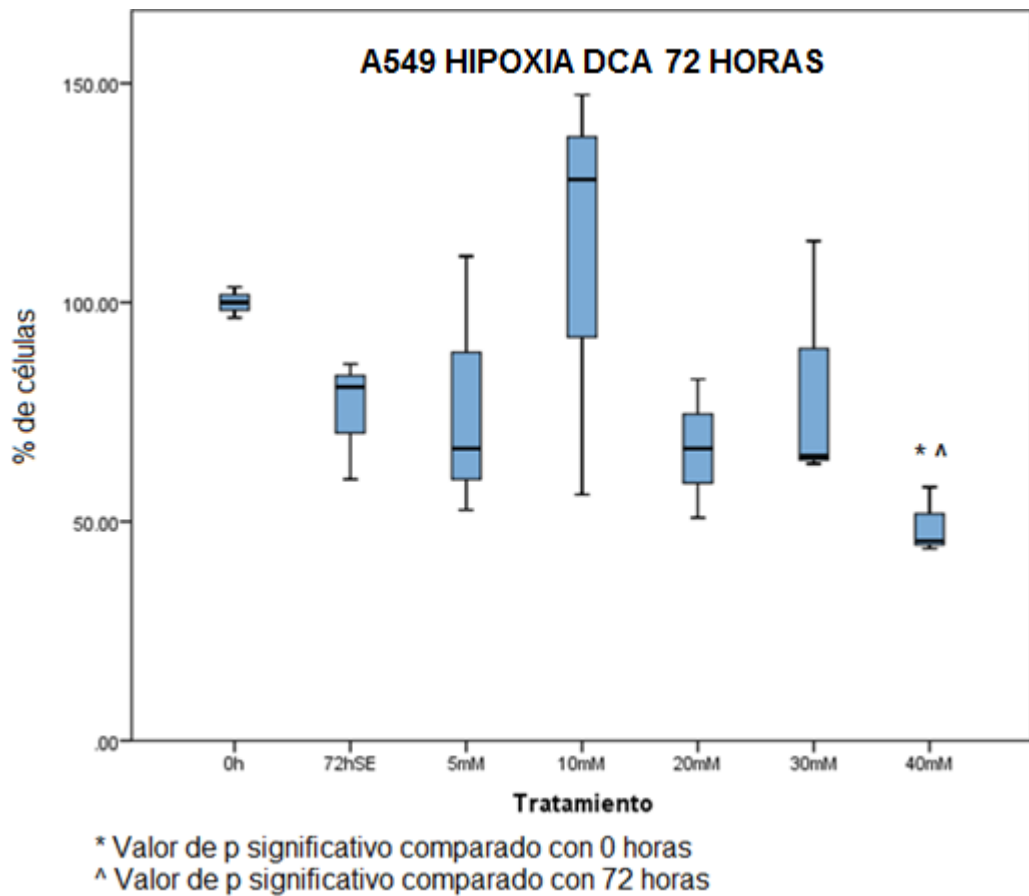
RESULTADOS



Gráfica 2.1 Muestras de células A549 en condiciones de normoxia tratadas con DCA, en ella se observa un decrecimiento celular a partir de la dosis de DCA más baja (5mM) y entre más aumenta la dosis de DCA se obtiene un efecto mayor, lo cual nos indica que hay una relación dosis-efecto.

Comparación	Valor de P
0h vs 20mM	0.115
0h vs 30mM	0.017
0h vs 40mM	0.174
72h vs 5mM	0.019
72h vs 10mM	0.008
72h vs 20mM	0.000
72h vs 30mM	0.000
72h vs 40mM	0.001

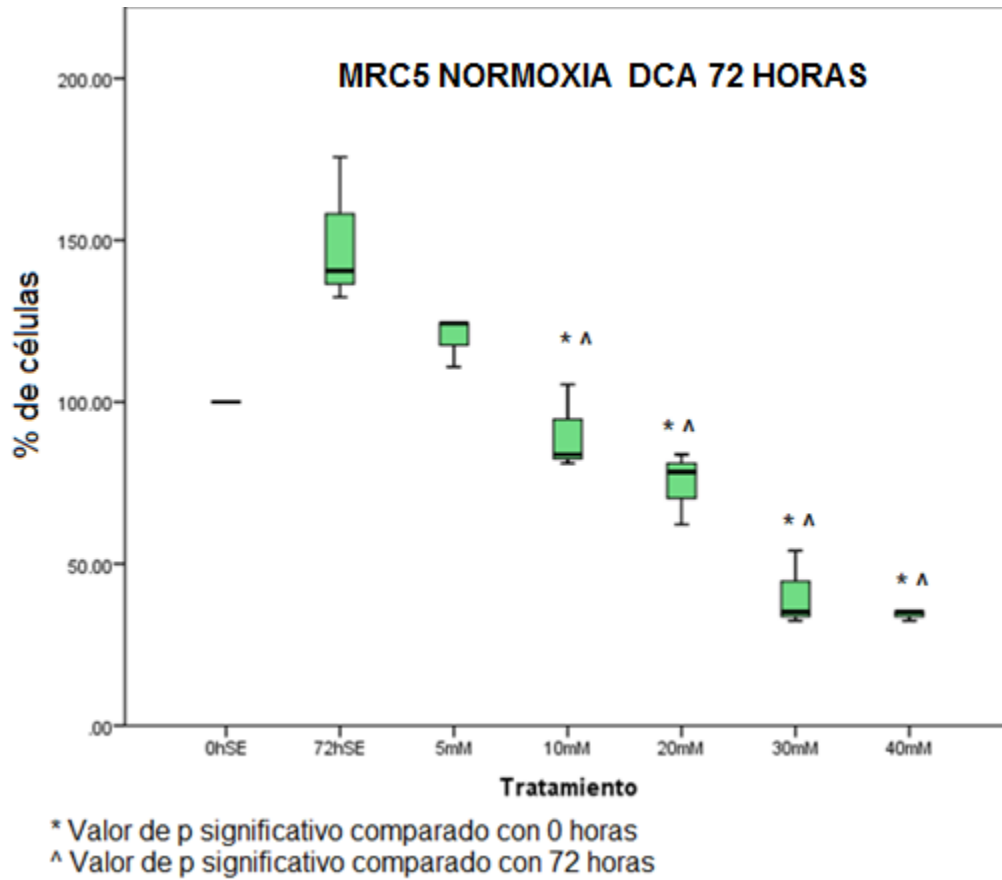
Tabla 2.1. Valores de P para las absorbancias de las muestras de células A549 tratadas con DCA a diferentes concentraciones en condiciones de normoxia, en la cual se observa valores de P menores a 0.05 al comparar con la muestras sin estímulo a 72 horas lo cual nos indica que se obtiene un efecto del DCA desde concentraciones bajas.



Gráfica 2.2 Muestras de A549 en condiciones de hipoxia tratadas con DCA, solo existe un efecto a la concentración más alta de DCA (40 mM), también observamos como el porcentaje de células se mantiene a pesar de aumentar la dosis de DCA hasta 30 mM por lo cual se puede plantear que la hipoxia funciona como un mecanismo de defensa evitando la muerte celular al administrar DCA en bajas Concentraciones.

Comparación	Valor de P
0h vs 20mM	0.025
0h vs 30mM	0.382
0h vs 40mM	0.001
72h vs 5mM	0.966
72h vs 10mM	0.297
72h vs 20mM	0.499
72h vs 30mM	0.793
72h vs 40mM	0.045

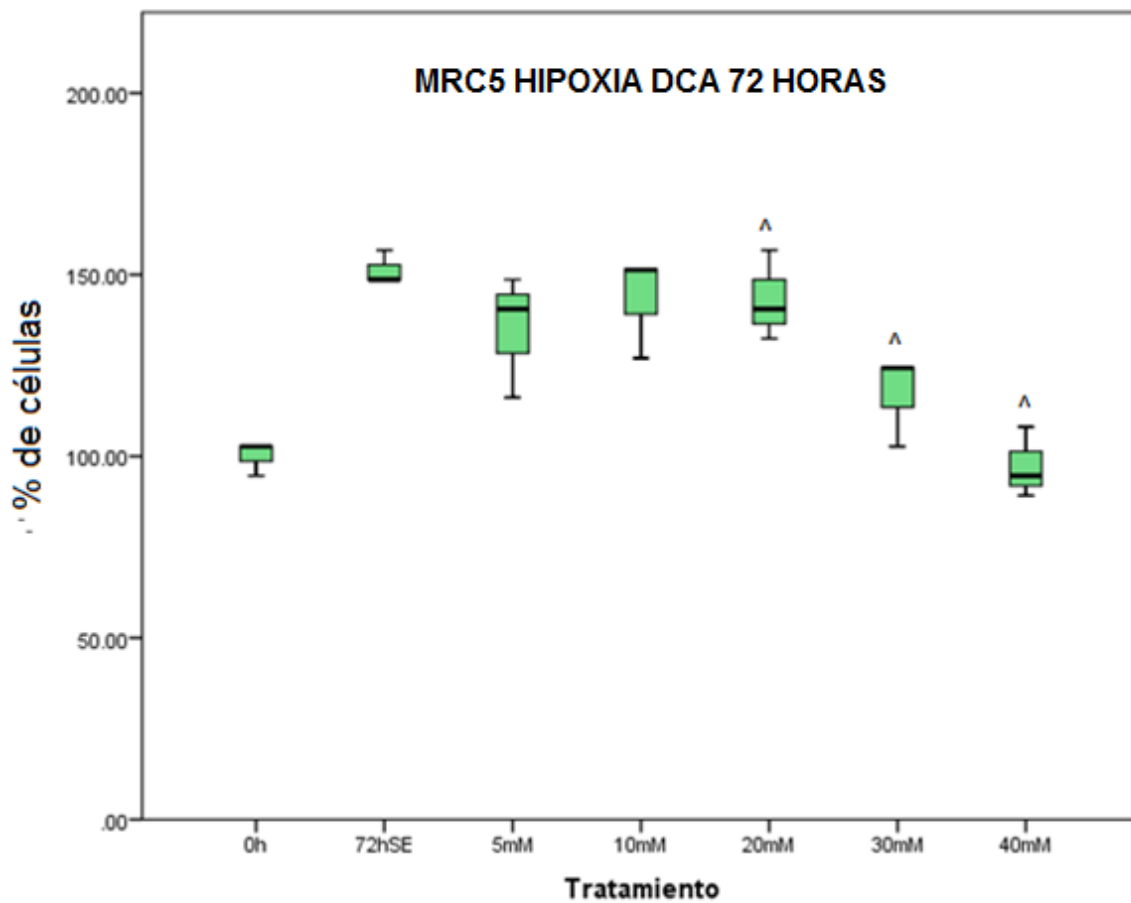
Tabla 2.2 Valores de P para las absorbancias de las muestras de células A549 tratadas con DCA a diferentes concentraciones en condiciones de hipoxia, se observa que el único valor de P menor a 0.05 es el de la muestra tratada con DCA 40mM comparada contra la muestra sin estímulo a 72 horas.



Gráfica 2.3 MRC5 tratados con DCA a diferentes concentraciones en condiciones de normoxia, al igual que con las células A549 se observa una curva dosis-efecto, siendo las dosis más altas las que presentan una inhibición del crecimiento mayor.

Comparación	Valor de P
0h vs 10mM	0.306
0h vs 20mM	0.019
0h vs 30mM	0.001
0h vs 40mM	0.000
72h vs 5mM	0.102
72h vs 10mM	0.018
72h vs 20mM	0.007
72h vs 30mM	0.002
72h vs 40mM	0.012

Tabla 2.3 Valores de P para las absorbancias de las muestras de células MRC5 tratadas con DCA a diferentes concentraciones en condiciones de normoxia se obtienen diferencias significativas a partir de la muestra tratada con DCA 20mM.

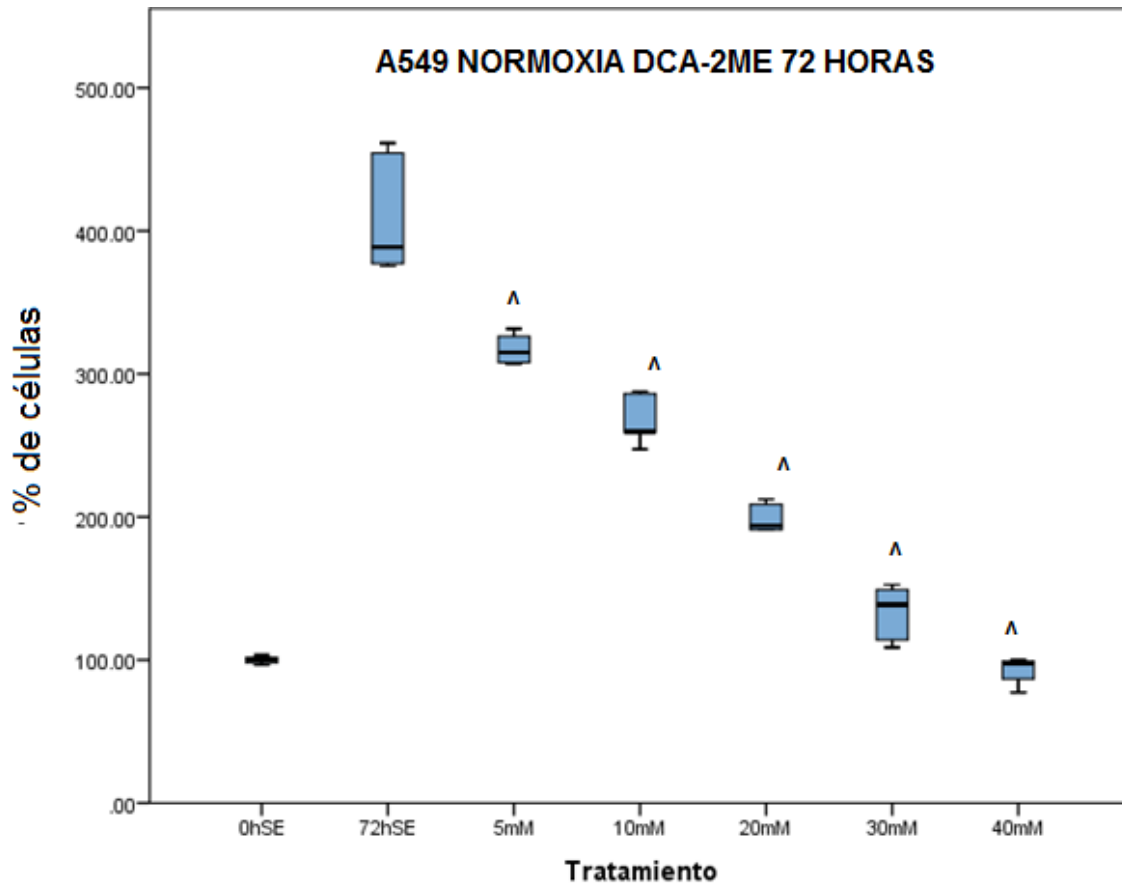


^ Valor de p significativo comparado con 72 horas

Gráfica 2.4 Muestras de fibroblastos MRC5 tratados con DCA a diferentes concentraciones en condiciones de hipoxia, se observa que en las muestras tratadas con las concentraciones de 30 mM y 40 mM existe un efecto significativo.

Comparación	Valor de P
0h vs 40mM	0.802
72h vs 5mM	0.185
72h vs 10mM	0.313
72h vs 20mM	0.030
72h vs 30mM	0.009
72h vs 40mM	0.002

Tabla 2.4 Valores de P para las absorbancias de las muestras de células MRC5 tratadas con DCA a diferentes concentraciones en condiciones de hipoxia, obteniendo valores de P inferiores a 0.05 en las muestras tratadas con concentraciones altas de DCA (30mM y 40mM) al compararlas con la muestra sin estímulo a 72 horas.

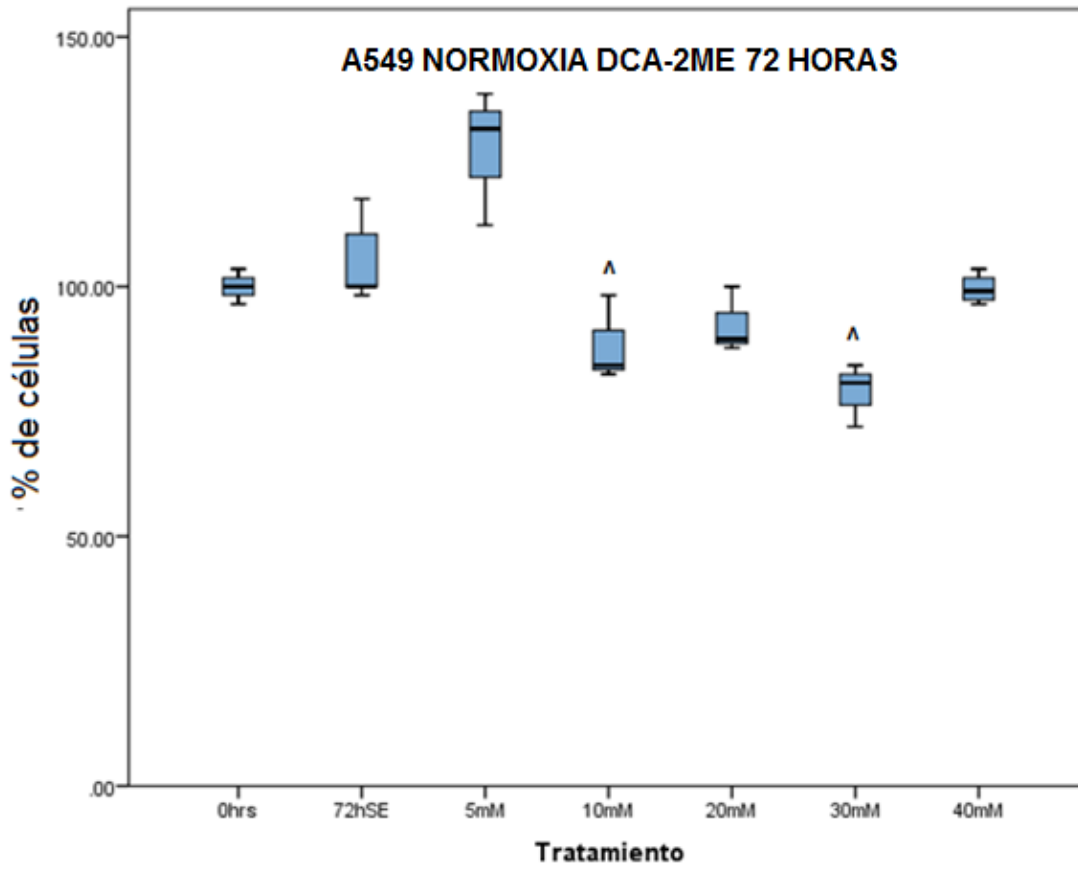


^ Valor de p significativo comparado con 72 horas

Gráfica 2.5 Células A549 en condiciones de normoxia tratadas con DCA-2ME, se observa el mismo comportamiento que en el experimento en el cual solo se agregó DCA, una curva dosis efecto obteniendo el descenso significativo en el crecimiento celular al administrar DCA a la mayor concentración (40 mM).

Comparación	Valor de P
0h vs 40mM	0.331
72h vs 5mM	0.002
72h vs 10mM	0.000
72h vs 20mM	0.000
72h vs 30mM	0.000
72h vs 40mM	0.000

Tabla 2.5 Valores de P para las absorbancia de las muestras de células A549 tratadas con 2ME (10uM) y DCA a diferentes concentraciones en condiciones de normoxia, se obtuvo una diferencia significativa desde las concentraciones más bajas de DCA administradas a las células A549.

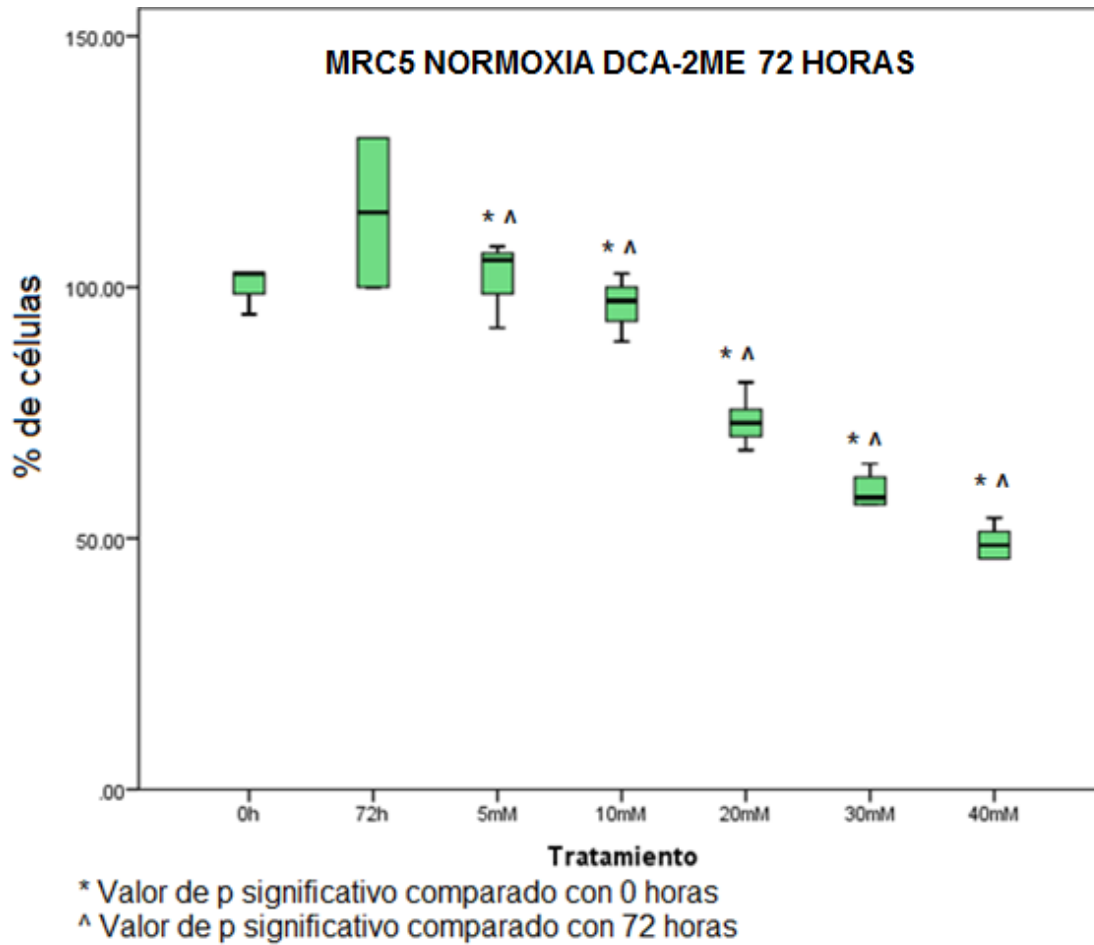


^ Valor de p significativo comparado con 72 horas

Gráfica 2.6 Células A549 en condiciones de hipoxia tratadas con DCA-2ME, se observa un efecto significativo en las concentraciones 10 μ M y 30 μ M de DCA.

Comparación	Valor de P
0h vs 40mM	0.916
72h vs 10mM	0.039
72h vs 20mM	0.060
72h vs 30mM	0.004
72h vs 40mM	0.207

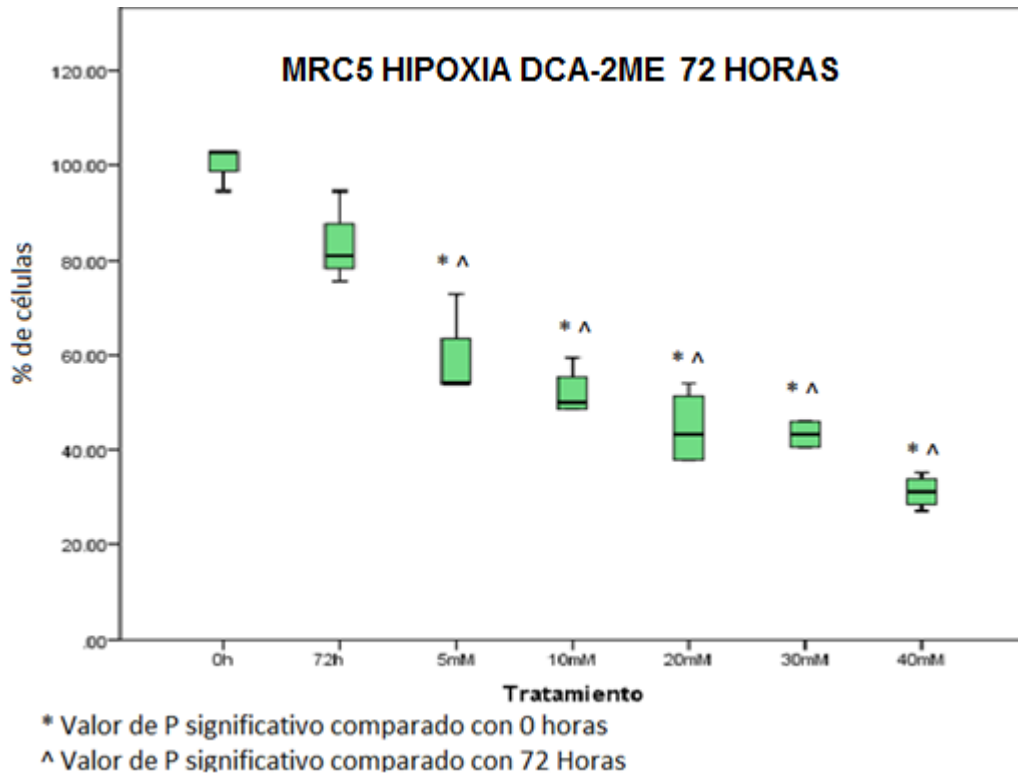
Tabla 2.6 Valores de P para las absorbancia de las muestras de células A549 tratadas con 2ME (10 μ M) y DCA a diferentes concentraciones en condiciones de hipoxia, se observan diferencias significativas en las muestras con concentraciones 10mM, 30mM y 40mM de DCA al compararlas con la muestra sin estímulo a 72 horas.



Gráfica 2.7 Muestras de fibroblastos MRC5 en condiciones de normoxia tratadas con DCA-2ME, se observa un efecto significativo a partir de las concentraciones bajas de DCA combinado con 2ME, manteniendo el comportamiento del experimento en el que solo se agregó DCA.

Comparación	Valor de P
0h vs 5mM	0.001
0h vs 10mM	0.000
0h vs 20mM	0.000
0h vs 30mM	0.000
0h vs 40mM	0.000
72h vs 5mM	0.006
72h vs 10mM	0.004
72h vs 20mM	0.001
72h vs 40mM	0.000

Tabla 2.7 Valores de P para las absorbancia de las muestras de células MRC5 tratadas con 2ME (10 μ M) y DCA a diferentes concentraciones en condiciones de normoxia. En todas las muestras se obtuvo una diferencia significativa al compararlas contra la muestra sin estímulo a 0 horas y a 72 horas.



Gráfica 2.8 Muestras de fibroblastos MRC5 en condiciones de hipoxia tratadas con DCA-2ME, se observa un efecto a partir de las concentraciones bajas de DCA combinado con 2ME, lo cual no se presentó en el experimento donde solo se agregó DCA, con esto se puede plantear que el 2ME potencializa el efecto del DCA en fibroblastos MRC5 en condiciones de hipoxia.

Comparación	Valor de P
0h vs 5mM	0.001
0h vs 10mM	0.000
0h vs 20mM	0.000
0h vs 30mM	0.000
0h vs 40mM	0.000
72h vs 5mM	0.027
72h vs 10mM	0.018
72h vs 20mM	0.007
72h vs 30mM	0.015
72h vs 40mM	0.000

Tabla 2.8 Valores de P para las absorbancia de las muestras de células MRC5 tratadas con 2ME (10 μ M) y DCA a diferentes concentraciones en condiciones de hipoxia. En todas las muestras se obtuvo una diferencia significativa al compararlas contra la muestra sin estímulo a 0 horas y a 72 horas.

DISCUSIÓN

El presente estudio es una extensión de un trabajo anterior realizado en este laboratorio, en el cual se administraron diferentes concentraciones de 2ME en células de adenocarcinoma humano A549 a diferentes tiempos demostrando que la dosis de 2ME a la cual se obtiene una mayor inhibición del crecimiento celular es 10 μ M en condiciones de normoxia (Anexo 2), también se determinó que el 2ME tiene un efecto sobre la expresión de HIF, por estos motivos se planteó que el 2ME puede ser eficaz si es utilizado en combinación con otros agentes terapéuticos (Aquino-Gálvez et al, 2015).

El Dicloroacetato (DCA) es una molécula pequeña que se ha utilizado durante muchos años para el tratamiento de enfermedades como la acidosis láctica y defectos en el metabolismo mitocondrial la acidosis láctica es común en las células cancerígenas que inactivan el complejo piruvato deshidrogenasa (PDC), la característica del metabolismo de un tumor indica que las células tumorales utilizan rápidamente la glucosa y convierten la mayor parte de ella a lactato, incluso en presencia de oxígeno, esto es conocido como efecto Warburg (Stacpoole et al, 2003). la PDH es un interruptor metabólico que determina si debe ocurrir la respiración mitocondrial o la glucólisis, estas células generalmente utilizan la glucólisis en lugar de la respiración mitocondrial para generar energía, posiblemente como resultado de la hipoxia que existe en los tumores (Shanmugam et al, 2006).

El DCA es un potente estimulador del complejo PDC, el restablecimiento de la función de PDH normaliza la actividad glucolítica en las células cancerosas y la dirección de carbonos de glucosa a través de las vías de la fosforilación oxidativa mitocondrial (Garber, 2006; Papandreou et al, 2011). El metabolismo aeróbico es mucho más eficiente, ya que genera más ATP por molécula de glucosa (36 ATP) en comparación con la glucólisis (2 ATP) (Michelakis, 2008). Al activarse la mitocondria se abren los poros de transición mitocondrial lo cual facilita la translocación de mediadores pro-apoptóticos como el citocromo c y el factor inductor de apoptosis (FIA), ambos estimulan la apoptosis celular (Bonnet et al, 2007).

En el presente estudio analizamos los efectos de diferentes concentraciones de DCA y la combinación de DCA-2ME en la tasa de crecimiento de células de adenocarcinoma humano A549 y fibroblastos MRC5 bajo condiciones de normoxia e hipoxia. Se determino el tiempo y las concentraciones a las cuales se evaluaría el DCA después de consultar varios estudios en los cuales éste había sido utilizado para tratar células de diferentes tipos de cáncer (Anexo 1). En condiciones de normoxia se observa una inhibición del crecimiento celular dependiente de la dosis administrada en ambas líneas celulares. En condiciones de hipoxia se obtuvo un inhibición celular de los fibroblastos MRC-5 a las concentraciones más altas de DCA en ambos tratamientos, Por lo cual se puede plantear que el DCA solo y en combinación con 2ME podría tener un efecto sobre los factores inducibles por hipoxia (HIF) ya que en algunos ensayos se ha observado que uno de los genes que se encuentran sobre expresado en la FPI es

el factor de transcripción HIF-1 α . De acuerdo con lo anterior, los HIFs pudieran estar implicados en la patogénesis de la FPI (Tzouvelekis et al 2007; Kick et al 2005). Los HIFs también son responsables de la expresión de la piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK) (Kim et al, 2006) enzima que fosforila e inactiva a la PDH evitando así la entrada de piruvato en la mitocondria, esta enzima también ha sido asociada con la quimiorresistencia, por lo tanto la inactivación de PDH a través de la sobreexpresión de PDK es una importante vía de supervivencia para las células cancerosas y fibroblastos en condiciones de hipoxia (Lu et al, 2008)

Esto también apunta al hecho de que los efectos de DCA pueden ser dependientes de las líneas celulares utilizadas en el experimento, nuestros datos sugieren que los fibroblastos MRC-5 son más susceptibles al tratamiento con DCA a concentraciones de 40 mM. Sin embargo se deben realizar más pruebas para determinar la actividad proapoptótica y el mecanismo por el cual el DCA inhibe el crecimiento de los fibroblastos MRC5.

Conclusión

Es importante recalcar que las células epiteliales A549 en condiciones de hipoxia no responde ningún tratamiento con ambas moléculas, esta situación ya ha sido ampliamente reportada con otros fármacos, es decir que la hipoxia interfiere con la respuesta a los tratamientos, en el caso de la respuesta de estos tratamientos en normoxia, en ambas líneas celulares (A549 y MRC5), se observa que si responden incluso con dosis bajas, en el caso de los fibroblastos MRC5 en condiciones de hipoxia la respuesta es mucho mejor cuando se administra la combinación DCA-2ME, de una manera dosis dependiente, en resumen se

observó una mayor inhibición del crecimiento celular en los fibroblastos MRC5 en ambos tratamientos (DCA y DCA-2ME) y al compararlos se puede concluir que el 2ME potencializa el efecto del DCA en fibroblastos MRC5 en condiciones de hipoxia, debido a que la mayoría de los pacientes con FPI no responden a los tratamientos antiinflamatorios y el uso de corticosteroides con inmunosupresores solo ayuda en algunos casos, el DCA puede ser una alternativa viable como tratamiento para la fibrosis pulmonar idiopática.

REFERENCIAS

1. Theresa M. L, Xiaoguo H. Z, Michelle S. J, Chris J. H, Glenn S, Mark S. W, Wendy A. H, Shawn J. G, and Victor S. P. 2003. 2-Methoxyestradiol Up-Regulates Death Receptor 5 and Induces Apoptosis through Activation of the Extrinsic Pathway. *CANCER RESEARCH* 63; 468–475
2. D'Amato RJ, Lin CM, Flynn E, Folkman J, Hamel E. 2-Methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site. *ProcNatlAcadSci USA* 91: 3964-3968, 1994.
3. Bu S, Blaukat A, Fu X, Heldin NE, Landström M. Mechanisms for 2-methoxyestradiol-induced apoptosis of prostate cancer cells. *FEBS Lett* 531: 141–151, 2002.
4. Chua YS, Chua YL, Hagen T. Structure activity analysis of 2-methoxyestradiol analogues reveals targeting of microtubules as the major mechanism of antiproliferative and proapoptotic activity. *Mol Cancer Ther*9: 224–235, 2010.
5. Lu X, Kang Y. Hypoxia and hypoxia-inducible factors: master regulators of metastasis. *Clin Cancer Res* 16: 5928-5935, 2010.
6. Xu, L., Lan, H., Su, Y., Li, J., &Wan, J. (2015). Clinicopathological significance and potential drug target of RUNX3 in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *DrugDesign, Development and Therapy*, 9, 2855–2865
7. Dimou, A., &Papadimitrakopoulou, V. (2014). Non-Small Cell Lung Cancer beyond Biomarkers: The Evolving Landscape of Clinical Trial Design. *Journal of Personalized Medicine*, 4(3), 386–401.
8. Iwai K, Mori T, Yamada N, Yamaguchi M, Hosoda Y. Idiopathicpulmonary fibrosis. Epidemiologic approaches to occupational exposure. *Am J Respire Crit Care Med*. 1994; 150:670-675.
9. Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC, Sobonya RE. The epidemiology of interstitial lung disease. *Am J RespirCrit Care Med*. 1994; 150:967-972.
10. Tzouvelekis, A., Bonella, F., &Spagnolo, P. (2015). Update on therapeutic management of idiopathic pulmonary fibrosis. *Therapeutics and ClinicalRisk Management*, 11, 359–370.
11. Chilosi M, Zamo A, Doglioni C, et al. Migratory marker expression in fibroblast foci of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* 2006; 7:95.

12. Vancheri Carlo, 2013. Common pathways in idiopathic pulmonary fibrosis and cancer.
13. Stacpoole P.W., N.V. Nagaraja, A.D. Hutson, Efficacy of dichloroacetate as a lactate-lowering drug, *J. Clin. Pharmacol.* 43 (2003) 683–691.
14. Bowker-Kinley MM, Davis WI, Wu P, Harris RA, Popov KM (1998) Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem J* 329(Pt 1):191–196
15. Wong Jason Y.Y., Gordon S. Huggins, Marcella DeBidda, Nikhil C. Munshi, Immaculata De Vivo. Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells 2008
16. Cao W., S. Yacoub, K.T. Shiverick, K. Namiki, Y. Sakai, S. Porvasnik, C. Urbanek, C.J. Rosser, Dichloroacetate (DCA) sensitizes both wild-type and overexpressing Bcl-2 prostate cancer cells in vitro to radiation, *Prostate* 68 (2008) 1223–1231.
17. Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science* 123: 309–314.
18. Bonnet S, et al. (2007) A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell* 11:37–51.
19. Stacpoole PW: The pharmacology of dichloroacetate. *Metabolism* 38: 1124-1144, 1989.
20. Olson AL, Swigris JJ, Lezotte DC, Norris JM, Wilson CG, Brown KK. Mortality from pulmonary fibrosis increased in the United States from 1992 to 2003. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 Aug 1. 176(3):277-84.
21. Kim DS, Collard HR, King TE Jr. Classification and natural history of the idiopathic interstitial pneumonias. *Proc Am Thorac Soc.* 2006 Jun. 3(4):285-92.
22. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. International Agency for Research on Cancer. Available at <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>. Accessed: July 13, 2014.
23. Greer JA, Jackson VA, Meier DE, Temel JS. Early integration of palliative care services with standard oncology care for patients with advanced cancer. *CA Cancer J Clin.* 2013 Sep. 63(5):349-63.

24. Tzouveleakis A, Harokopos V, Paparountas T, et al. Comparative expression profiling in pulmonary fibrosis suggests a role of hypoxia-inducible factor-1alpha in disease pathogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176:1108-1119.
25. Krick S, Eul BG, Hänze J, et al. Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 32:395-403.
26. Bertout JA, Patel SA, Simon MC (2008) The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* 8(12):967–975
27. Murdoch C, Muthana M, Lewis CE (2005) Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *J Immunol* 175(10):6257–6263
28. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646–674
29. Semenza GL (2012) Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 33(4):207–214
30. Gottlieb E, Tomlinson IP (2005) Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update. *Nat Rev Cancer* 5(11):857–866
31. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV (2006a) HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3(3):177–185
32. Jemal, A., Ma, J., Rosenberg, P. S., Siegel, R., & Anderson, W. F. (2012). Increasing Lung Cancer Death Rates Among Young Women in Southern and Midwestern States. *Journal of Clinical Oncology*, 30(22), 2739–2744. doi:10.1200/JCO.2012.42.6098.
33. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc.* 2008 May. 83(5):584-94.
34. Siegel, R., Naishadham, D. and Jemal, A. (2013), Cancer statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 63: 11–30. doi: 10.3322/caac.21166
35. Kotiligam D, Lazar AJ, Pollock RE, et al. Desmoid tumor: a disease opportune for molecular insights. *Histol Histopathol* 2008; 23:117–126.
36. Kuwano K, Kunitake R, Kawasaki M, et al. P21Waf1/Cip1/Sdi1 and p53 expression in association with DNA strand breaks in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:477–483

37. Uematsu K, Yoshimura A, Gemma A, et al. Aberrations in the fragile histidine triad (FHIT) gene in idiopathic pulmonary fibrosis. *Cancer Res* 2001; 61: 8527–8533
38. Cronkhite JT, Xing C, Raghu G, et al. Telomere shortening in familial and sporadic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 729–737
39. Liu T, Chung MJ, Ullenbruch M, et al. Telomerase activity is required for bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Clin Invest* 2007; 117: 3800–3809
40. McAnulty RJ, Hernandez-Rodriguez NA, Mutsaers SE, et al. Indomethacin suppresses the anti-proliferative effects of transforming growth factor- β isoforms on fibroblast cell cultures. *Biochem J* 1997; 321: 639–643.
41. Thannickal VJ, Horowitz JC. Evolving concepts of apoptosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 350–356
42. De WO, Pauwels P, De CB, et al. Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochem Cell Biol* 2008; 130: 481–494
43. Moriya Y, Niki T, Yamada T, et al. Increased expression of laminin-5 and its prognostic significance in lung adenocarcinomas of small size. An immunohistochemical analysis of 102 cases. *Cancer* 2001; 91: 1129–1141
44. Garrido C, Schmitt E, Cande C, et al. HSP27 and HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors. *Cell Cycle* 2003; 2: 579–584
45. Pelosi G, Pastorino U, Pasini F, et al. Independent prognostic value of fascin immunoreactivity in stage I nonsmall cell lung cancer. *Br J Cancer* 2003; 88: 537–547
46. Chilosi M, Zamo A, Doglioni C, et al. Migratory marker expression in fibroblast foci of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* 2006; 7: 95
47. Wyllie, A.H. (1992) *Cancer Metast. Rev.* 11, 95-103.
48. Olson, M., and Kornbluth, S. Mitochondria in apoptosis and human disease. *Curr. Mol. Med.*, 1:91–122, 2001
49. Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., and Peter, M. E. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.*, 254:439–459, 1998
50. Seegers JC, Aveling ML, Van Aswegen CH, Cross M, Koch F, Joubert WS. The cytotoxic effects of estradiol-17 β , catecholestradiols and methoxyestradiols on dividing MCF-7 and HeLa cells. *J Steroid Biochem* 1989; 32:797–809

51. Mabeesh NJ, Escuin D, LaVallee TM, et al. 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell* 2003;3:363–75
52. Ricker JL, Chen Z, Yang XP, Pribluda VS, Swartz GM and Van Waes C: 2-Methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor 1 alpha, tumor growth, and angiogenesis and augments paclitaxel efficacy in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 10: 8665-8673, 2004
53. Sutherland TE, Anderson RL, Hughes RA, Altmann E, Schuliga M, Ziogas J et al. 2-Methoxyestradiol—a unique blend of activities generating a new class of anti-tumour/anti-inflammatory agents. *Drug Discov Today* 2007; 12:577–584.
54. Qadan LR, Perez-Stable CM, Anderson C, D'Ippolito G, Herron A, Howard GA et al. 2-Methoxyestradiol induces G2/M arrest and apoptosis in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285:1259–1266
55. Qanungo S, Basu A, Das M, Haldar S. 2-Methoxyestradiol induces mitochondria dependent apoptotic signaling in pancreatic cancer cells. *Oncogene* 2002;21:4149–4157
56. Lin HL, Liu TY, Chau GY, Lui WY, Chi CW. Comparison of 2-methoxyestradiol-induced, docetaxel-induced, and paclitaxel-induced apoptosis in hepatoma cells and its correlation with reactive oxygen species. *Cancer* 2000;89:983–994
57. Hamel E, Lin CM, Flynn E, D'Amato RJ. Interactions of 2-methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, with unpolymerized tubulin and with tubulin polymers. *Biochemistry* 1996; 35:1304–1310.
58. Huang P, Feng L, Oldham EA, Keating MJ, Plunkett W. Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature* 2000;407:390–395
59. Attalla H, Westberg JA, Andersson LC, Adlercreutz H, Makela TP. 2-Methoxyestradiol-induced phosphorylation of Bcl-2: uncoupling from JNK/SAPK activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247:616–619.
60. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, et al. EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 2001; 107:43–54
61. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 2001;294:1337–40

62. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Rev Cancer*. 2003; 3:721–2
63. Kim, D. S., Collard, H. R., & King, T. E. (2006). Classification and Natural History of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(4), 285–292. doi:10.1513/pats.200601-005TK
64. Olson, A. L., Swigris, J. J., Lezotte, D. C., Norris, J. M., Wilson, C. G., & Brown, K. K. (2007). Mortality from pulmonary fibrosis increased in the United States from 1992 to 2003. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 176(3), 277–284. doi:10.1164/rccm.200701-044OC
65. Cancer, W. A. (2013). Take free quizzes online at acsjournals.com / ce Early Integration of Palliative Care Services With Standard Oncology Care for Patients With Advanced Cancer, 63(5), 349–363. doi:10.3322/caac.21192.
66. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2015*. American Cancer Society. Disponible en <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@editorial/documents/document/acspc-044552.pdf>. Acceso: 8 Julio, 2015.
67. Shahrzad S1, Lacombe K, Adamcic U, Minhas K, Coomber BL. Sodium dichloroacetate (DCA) reduces apoptosis in colorectal tumor hypoxia. *Cancer Lett*. 2010 Nov 1;297(1):75-83. doi: 10.1016
68. Aquino-gálvez, a., gonzález-ávila, g., delgado-tello, j., castillejos-lópez, m., mendoza-milla, c., zúñiga, j. Gutiérrez-gonzález, I. H. (2016). Effects of 2-methoxyestradiol on apoptosis and HIF-1 α and HIF-2 α expression in lung cancer cells under normoxia and hypoxia. *Oncology Reports*, 35(1), 577–583.
70. Michelakis, E.D., Webster, L., Mackey, J.R. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *Br J Cancer*. 2008;99:989–994.
72. Shanmugam M, McBrayer SK, Rosen ST. Targeting the Warburg effect in hematological malignancies: from PET to therapy. *Curr Opin Oncol*. 2009;21(6):531–536.
73. Garber K (2006) Energy deregulation: licensing tumors to grow. *Science* 312(5777):1158–1159.
74. Papandreou I, Goliassova T, Denko NC (2011) Anticancer drugs that target metabolism: is dichloroacetate the new paradigm? *Int J Cancer* 128(5):1001–10

75. Kim J.W., I. Tchernyshyov, G.L., Semenza, C.V. Dang HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia *Cell Metab*, 3 (2006), pp. 177–185
76. Dantas Ana Paula V., Kathryn Sandberg, Does 2-Methoxyestradiol Represent the New and Improved Hormone Replacement Therapy for Atherosclerosis?
77. Lu CW, Lin SC, Chen KF, Lai YY, Tsai SJ (2008) Induction of pyruvate dehydrogenase kinase-3 by hypoxia-inducible factor-1 promotes metabolic switch and drug resistance. *J Biol Chem* 283(42):28106–28114.
doi:10.1074/jbc.M803508200

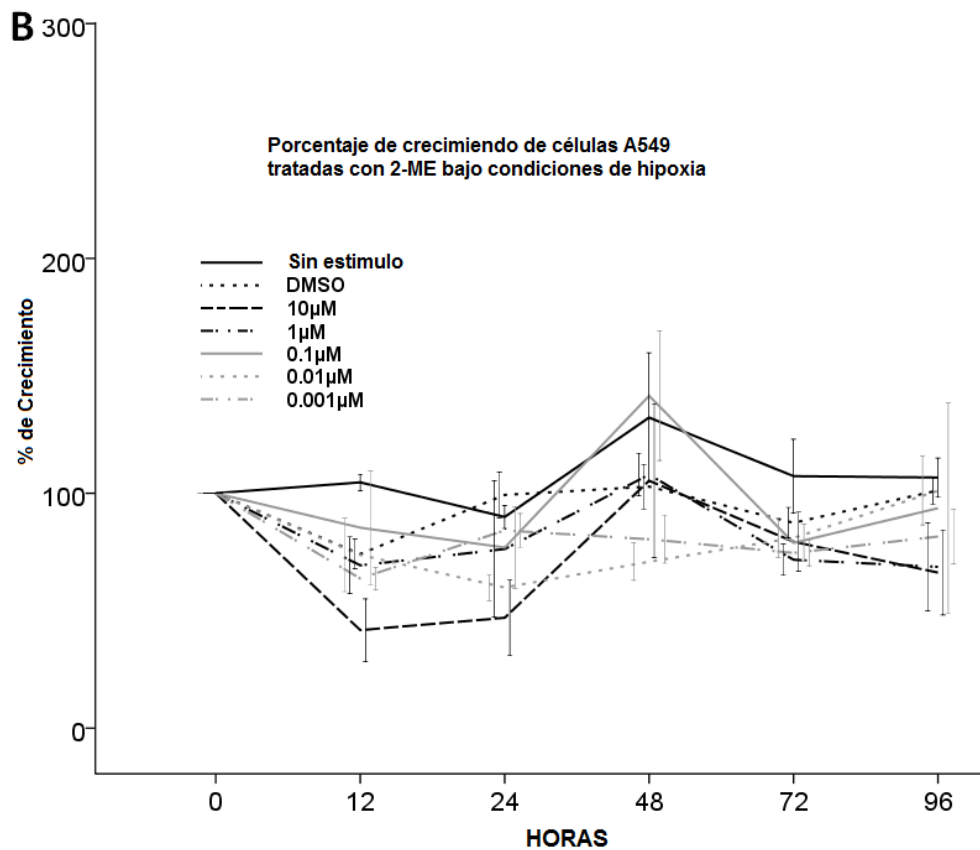
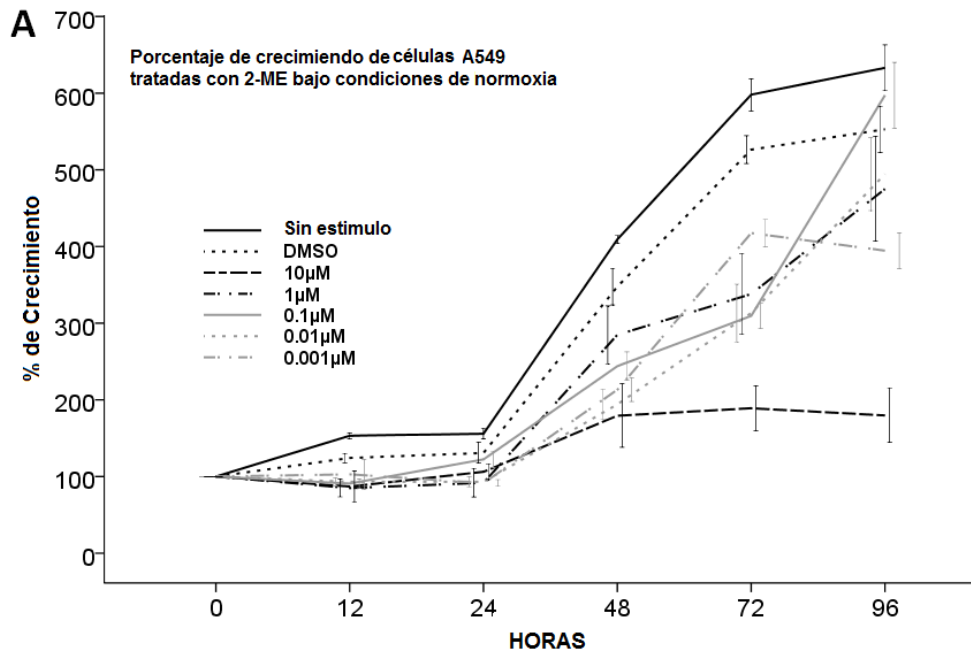
ANEXOS

Anexo 1

Líneas celulares	Tiempo (h)	Concentración (mM)	Oxigenación	Referencia
AN3CA, Ishikawa, RL95-2, y SKUT1B Células cancer endometrial	40	5 y 10	Normoxia	Jason Y.Y. Wong, 2008 Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells
C6 Células de glioma	24	IC50: 27+-3	Normoxia	Yu Duan,2013 Antitumor activity of dichloroacetate on C6 glioma cell
LS174T, SW480, HCT116, DLD-1, Y Caco-2 Células cáncer colorectal	48	10	Anoxia/ Normoxia	SiranoushShahrzad 2010, (DCA) reduces apoptosis in colorectal tumor hypoxia
AGS Y MKN45 Células de cáncer gástrico	24	20	Hipoxia/Normoxia	Yi Xuana, 2013 DCA attenuates hypoxia-induced resistance to 5-fluorouracil in gastric cancer through
A549 Y SCC25	48	A549: 20 Y 30 SCC25: 10 Y 15	Normoxia	KasirajanAyyanathan 2012 Combination of Sulindac and Dichloroacetate Kills Cancer Cells via Oxidative Damage
MCF7 and T47D	MCF7: 48 T47D: 72	0.5 a 5	Normoxia	Allison B. Haugrud,2014 Dichloroacetate enhances apoptotic cell death via oxidative damage and attenuates lactate production in metformin-treated breast cancer cells
SW480 y LS174T células de cáncer colorectal	72	10	Anoxia/ Normoxia	NelsonHo,BrendaL.Coombe 2014. Pyruvate dehydrogenase kinase expression and metabolic changes following dichloroacetate exposure in anoxic human colorectal cancer cells
HeLA y PANC-1	Comparación 24 y 96 Hipoxia/Normoxia	12.5	Hipoxia/ Normoxia	Anderson K.M. 2009. In Vitro Effects of Dichloroacetate and CO2 on hypoxic HeLa Cells.

Tabla.3 Referencias utilizadas para delimitar el tiempo y las concentraciones a las que se evaluó el DCA

Anexo 2



Gráficos 3.1 Curvas de crecimiento de células A549 tratadas con 2-ME bajo condiciones de normoxia e hipoxia.